

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR
FACULTAD DE MEDICINA
CARRERA DE BIOQUÍMICA CLÍNICA**

**DISERTACIÓN PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
BIOQUÍMICA CLÍNICA**

**“DISEÑO DE UNA MICOTECA DE IMPORTANCIA CLÍNICA A
PARTIR DE CEPAS REACTIVADAS EN EL LABORATORIO DE
MICOLOGÍA CLÍNICA DE LA CARRERA DE BIOQUÍMICA CLÍNICA
DE LA PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR”**

Por: Alicia Isabel Figueroa Carrasco

Daniela Alexandra Soria Aguirre

Director: Mtr. Andrés Zabala Parreño

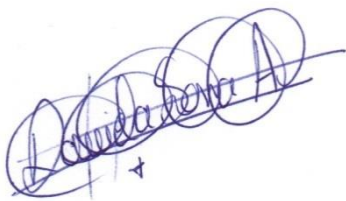
Quito, 2017

DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, Daniela Alexandra Soria Aguirre, C.I.;172270195-8 autora del trabajo de graduación intitulado: “Diseño de una micoteca de importancia clínica a partir de cepas reactivadas en el laboratorio de Micología Clínica de la carrera de Bioquímica Clínica de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador”, previa a la obtención del grado académico de BIOQUÍMICA CLÍNICA en la Facultad de Medicina:

1.- Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.

2.- Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador a difundir a través de sitio web de la Biblioteca de la PUCE el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de la Universidad.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Daniela Soria A.', with a small cross-like mark below it.

Daniela Soria

CI: 172270195-8

DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, Alicia Isabel Figueroa Carrasco, 171669101-7; autora del trabajo de graduación intitulado: "Diseño de una micoteca de importancia clínica a partir de cepas reactivadas en el laboratorio de Micología Clínica de la carrera de Bioquímica Clínica de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador", previa a la obtención del grado académico de BIOQUÍMICA CLÍNICA en la Facultad de Medicina:

1.- Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.

2.- Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador a difundir a través de sitio web de la Biblioteca de la PUCE el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de la Universidad.



Alicia Figueroa

171669101-7

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mi familia por ser un apoyo, sobre todo a mi madre Jenny Aguirre por guiarme en cada paso que doy y ser una fuente de inspiración y fortaleza para seguir siempre adelante.

Daniela Soria A.

Dedico este trabajo a mis padres y hermanos por su apoyo, comprensión y sobre todo paciencia no solo en la realización de este proyecto sino en el transcurso de esta carrera.

Alicia Figueroa C.

AGRADECIMIENTOS

Al culminar nuestro proyecto queremos expresar el más sincero agradecimiento a las siguientes personas que nos apoyaron siempre:

A nuestros Padres, por ser un ejemplo a seguir e inculcarnos valores que de una u otra manera han servido en nuestras vidas.

A nuestros novios Andrés González y Pablo Aldaz por sus valiosos aportes, apoyo y orientación brindada a lo largo de este trabajo colaborando desinteresadamente, para la culminación de nuestro proyecto.

A nuestros amigos y compañeros que nos motivaron e incentivaron para seguir adelante con los objetivos del proyecto.

A la señora Silvia Benalcazar, por brindarnos sobre todo su amistad, sus conocimientos y ayudarnos en las dificultades que teníamos al momento de preparar medios.

Al señor Luis Pillajo, por colaborarnos en todo lo que ha podido y ofrecernos su apoyo y amistad.

Al MSc. Oscar Puente, por ser un gran profesor y ayudarnos con su conocimiento en todo lo posible en el transcurso del proyecto.

Al MSc. Andrés Zabala, nuestro director de tesis, por el apoyo al realizar el proyecto.

A nuestros maestros de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, que nos impartieron sus conocimientos y experiencias durante todo el tiempo de aprendizaje y que nos ayudaron de una u otra forma para la culminación del proyecto.

Pontificia Universidad Católica del Ecuador por prestarnos sus instalaciones para la realización de este proyecto.

RESUMEN

Diseño de una micoteca de importancia clínica a partir de cepas reactivadas en el laboratorio de Micología Clínica de la carrera de Bioquímica Clínica de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador

Introducción: Las micotecas a nivel mundial son consideradas centros para la conservación de hongos, las cuales permiten salvaguardar su integridad y así poder realizar nuevas investigaciones, generar nuevas técnicas para la enseñanza de la micología médica y así garantizar un adecuado diagnóstico fúngico encaminado a establecer un control y/o erradicación de la mayoría de los patógenos. Se efectuó un proyecto cuyo objetivo fue diseñar una micoteca de hongos de importancia clínica a partir de cepas ya colectadas y almacenadas en el laboratorio de Micología Clínica de la carrera de Bioquímica Clínica de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador.

Materiales y Métodos: De un total de 89 hongos se caracterizaron fenotípicamente 66 cepas disponibles en el laboratorio de Micología Clínica, los 23 hongos restantes solo fueron caracterizados microscópicamente debido a la falta de cepas. Para la caracterización fenotípica de los hongos se ejecutaron 6 técnicas de identificación con el fin de describir las características macroscópicas y microscópicas de cada hongo y como apoyo para todos los procesos se implementaron 4 procedimientos operativos estándar (POE's) de ingreso de nuevas cepas, identificación de hongos filamentosos, identificación de hongos levaduriformes y por último el de codificación-almacenaje de los mismos, siendo cada uno de ellos apoyado con registros e instructivos. **Resultados:** Fueron aislados un total de 66 cepas, 61 hongos filamentosos los cuales fueron caracterizados fenotípicamente a través de la técnica de cinta adhesiva y microcultivo; además de ser almacenados por los métodos de agua destilada y papel filtro, también se aislaron 5 hongos levaduriformes que fueron identificados a través de las técnicas de Gram, API 20 C AUX, tubo germinal, técnica de clamidosporas y tinta china para *Cryptococcus neoformans* con su posterior almacenamiento a través de la técnica de repique en agar agar. Los 23 hongos restantes representan únicamente a los caracterizados microscópicamente debido a la falta de cepas para su aislamiento por lo tanto contamos únicamente con la técnica de identificación en placa. Cada uno de los hongos fue codificado con etiquetas de identificación según el tipo de hongo y el método de almacenamiento para ayudar a su rápido acceso, además de que cada proceso fue guiado con POE's de cada uno de ellos. **Conclusiones y Recomendaciones:** A partir de la realización de la micoteca se obtuvieron productos como las placas generadas a partir

de los microcultivos, los tubos obtenidos en el método de conservación de agua destilada al igual que los de papel filtro y repique en agar agar, cada uno de ellos codificado y almacenado en cajas porta placas, tuberas y cajas porta crioviales respectivamente. Finalmente para una mayor conservación de los hongos se recomienda usar métodos a largo plazo como la liofilización, además de la aplicación de técnicas moleculares para realizar una clasificación taxonómica de los mismos logrando mayor diversidad en la micoteca. También es importante seguir cada procedimiento operativo estándar para garantizar el mantenimiento de la micoteca.

Palabras clave: Micoteca, filamentosos, levaduriforme, conservación, codificación, procedimiento operativo estándar (POE).

ABSTRACT

Design of a fungal inventory with clinical interest from reactivated strains in the Clinical Mycology Laboratory of Clinical Biochemistry department at the Pontificia Universidad Católica del Ecuador.

Introduction: Worldwide fungal databases are considered as a center for the conservation of fungus that allow to safeguard their integrity, thus enabling new research to be carried out, and generating new medical mycology teaching techniques to assure an accurate fungal diagnosis aimed to establish control and/or eradication of most pathogens. A project was made whose objective was to design a fungal database with clinical importance from strains already collected and stored in the laboratory of Clinical Mycology of the career of Clinical Biochemistry from the Pontifical Catholic University of Ecuador. **Materials and Methods:** Out of a total of 89 fungal, 66 strains available in the laboratory of Clinical Mycology were phenotypically characterized, the remaining 23 fungus were only characterized using optical microscope due to the lack of strains. 6 identification techniques were executed for the phenotypical characterization of the fungus aiming to describe the macroscopic and microscopic characteristics of each fungus; four standard operating procedures (SOPs) were implemented as a support for all the processes: For the entry of new strains, identification of filamentous fungi, identification of yeast-forms fungi, and finally their store codification, each of them being supported by records and instruction manuals. **Results:** A total of 66 strains were isolated, 61 were filamentous fungi phenotypically characterized using the adhesive tape technique and microculture; besides being stored by the distilled water and filter paper methods, 5 yeast-form fungus were also isolated and identified through Gram, API 20 C AUX, germinal tube, chlamyospore and Chinese ink for *Cryptococcus neoformans* techniques, with its subsequent storage through the agar streaking technique. The remaining 23 fungi represent only those characterized by optical microscope due to the lack of strains for their isolation; meanwhile, we rely only on the plaque identification technique. Each fungus was coded with identification labels according to the type of fungus and its storage method to help to provide a quick access. In addition, each process was guided with POE's. Finally, 10 technical sheets were made with the macroscopic and microscopic characteristics of the fungi strains stored in the fungal database. **Conclusions and Recommendations:** From the realization of the database some products were obtained, such as plates generated from the microcultures, tubes in the distilled water preservation

method, as well as the filter paper method and the agar streaking. Each of them coded and stored in plate boxes, tubes, and cryovial boxes respectively; finally, for a greater conservation of the fungi it is recommended to use long-term methods, such as lyophilization. Furthermore, the application of molecular techniques to perform a taxonomic classification obtaining greater diversity in the fungal database. It is important to follow each standard operating procedure to ensure the maintenance of the fungal inventory.

Key words: Fungal database, filamentous fungi, yeast-fungi, conservation, coding, standard operating procedure (POE).

TABLA DE CONTENIDO

CAPÍTULO I.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 OBJETIVOS	6
1.2 OBJETIVO GENERAL.....	6
1.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	6
CAPITULO II	7
2.1 MARCO TEÓRICO Y CONCEPTUAL.....	7
2.2 MARCO TEÓRICO.....	7
2.2.1 Generalidades y taxonomía de los hongos	7
2.2.2 Hongos de importancia clínica	8
2.2.3 Generalidades de las micotecas	11
2.2.4 Micotecas en Latinoamérica	12
2.2.5 Lineamiento para la elaboración de Micotecas dispuesta por la Federación Internacional de Colecciones de Cultivos (WFCC)	15
2.2.6 Métodos para el mantenimiento y viabilidad de hongos de importancia clínica	16
2.2.7 Reactivación e identificación de hongos.....	20
2.2.8 Documentación de un cepario de hongos	20
2.2.9 Plan de seguimiento de las cepas conservadas en la micoteca.....	22
2.2.10 Elaboración de procedimientos operativos estándar (POE's).....	22
2.2.11 Como se estructura un procedimiento operático estandarizado.....	23
2.3 MARCO CONCEPTUAL.....	24
CAPÍTULO III	25
3 MARCO METODOLÓGICO.....	25
3.1 Procedimientos de laboratorio.....	25
3.1.1 Medios e insumos.....	25
3.1.2 Procedimiento de reactivación de hongos.....	26
3.1.3 Identificación macroscópica y microscópica de los hongos y levaduras	26
3.2 Codificación y almacenaje	31
3.2.1 Codificación de almacenaje	31
3.3 Procedimiento operativo estándar	32

3.4	Control de calidad de medios y colorantes.....	33
3.4.2	Control de esterilidad de medios y agua destilada	34
CAPÍTULO IV		35
4.1	MARCO LÓGICO	36
4.2	CRONOGRAMA	38
4.3	PRODUCTOS OBTENIDOS DE LA TESIS	40
4.4	CONCLUSIONES.....	46
4.5	RECOMENDACIONES.....	47
ANEXOS		48
BIBLIOGRAFÍA.....		79

LISTA DE TABLAS

Tabla 1 <i>Tabla de la clasificación general de los hongos y pseudohongos.</i>	8
Tabla 2 <i>Tabla de la clasificación clínica de las micosis en seres humanos.</i>	9
Tabla 3 <i>Micotecas en Latinoamérica hasta el 2014.</i>	12
Tabla 4 <i>Reactivos, medios, materiales y equipos para los procesos de identificación, almacenaje y codificación de hongos.</i>	25
Tabla 5 <i>Procedimiento para la tinción de Gram.</i>	29
Tabla 6 <i>Matriz de marco lógico.</i>	36
Tabla 7 <i>Cronograma de actividades.</i>	39
Tabla 8 <i>Tabla de la clasificación de hongos aislados .</i>	40
Tabla 9 <i>Técnica de identificación de hongos filamentosos y levaduriformes .</i>	41
Tabla 10 <i>Tabla de los métodos de conservación para hongos filamentosos y levaduriformes .</i>	42
Tabla 11 <i>Tabla del total de placas entregadas por tipo de hongo.</i>	42
Tabla 12 <i>Tabla de la evaluación de la viabilidad de hongos filamentosos por el método de agua destilada. .</i>	43
Tabla 13 <i>Tabla de evaluación de la viabilidad de hongos filamentosos por el método de papel filtro.</i>	43
Tabla 14 <i>Tabla de evaluación de la viabilidad de hongos levaduriformes por el método de repique en agar agar.</i>	44
Tabla 15 <i>Lista detallada de los procedimientos operativos estándar, registros e instructivos que corresponden a cada POE .</i>	445

LISTA DE GRÁFICOS

Figura 1 Formato de etiquetas para el almacenamiento de hongos filamentosos y levaduriformes, para las técnicas de papel filtro, agua destilada, repique agar-agar y placas	31
Figura 2 Formato para la identificación de documentos ¡Error! Marcador no definido.	
Figura 3 Formato para la identificación de registros	33

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1: Proceso de ingreso de nuevas cepas, adjuntado en un segundo CD.....	49
Anexo 2: Proceso de identificación de hongos filamentosos, adjuntado en un segundo CD.	50
Anexo 3: Proceso de identificación de hongos levaduriformes, adjuntado en un segundo CD.	51
Anexo 4: Proceso de codificación y almacenaje de hongos filamentosos y levaduriformes, adjuntado en un segundo CD.	52
Anexo 5: Ejemplo de las fichas técnicas de un hongo caracterizado fenotípicamente. ...	53
Anexo 6: Caracterización fenotípica de los hongos aislados en el laboratorio de Micología.	56
Anexo 7: Se adjuntan los registros e instructivos que corresponden a los procedimientos operativos estándar adjuntados en el segundo CD.	61
Anexo 8: Lista de Verificación como primera línea del análisis de las condiciones del Laboratorio de Micología y su micoteca.	62
Anexo 9: Inserto API 20 C AUX.	63
Anexo 10: Listado de hongos filamentosos almacenados.	66
Anexo 11: Listado de hongos levaduriformes almacenados.....	73
Anexo 12: Metodología para la realización de la micoteca.....	74

LISTA DE SIGLAS

BPL: Buenas Prácticas de Laboratorio.

CEBI: Centro de Estudios de Biotecnología Industrial.

CEREMIC: Centro de Referencia de Micología.

CINVESTAV-IPN: Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.

CITMA: Ministerio de Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente.

FELACC: Federación Latinoamericana de Colecciones de Cultivos.

IPK: Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri”.

NTP: Notas técnicas de prevención.

PDA: Agar papa dextrosa.

PUCE: Pontificia Universidad Católica del Ecuador.

WFCC: La Federación Mundial de Colecciones de Cultivos.

CAPÍTULO I

1. INTRODUCCIÓN

El pensum de la carrera de Bioquímica Clínica de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (PUCE), contempla el estudio de diversas áreas del laboratorio clínico: Bioquímica e Inmunología Clínica, Hematología, Aseguramiento de la Calidad, Administración, Investigación, Epidemiología y áreas de formación general. Las áreas encargadas del estudio de patógenos son: Microbiología, Parasitología, Bacteriología, Micología y Virología Clínica.

La materia de Micología Clínica que se imparte en el octavo nivel de la carrera, tiene una intensidad de 6 horas semanales de las cuales 2 son de aplicación práctica y experimental. Los objetivos de la asignatura son: que el estudiante desarrolle la capacidad de identificar los hongos capaces de afectar el estado de salud del ser humano e introducir al estudiante en el manejo de buenas prácticas de laboratorio. El contenido temático enfatiza el estudio de la etiología, morfología, estructura, clasificación, crecimiento, reproducción y técnicas de aislamiento de las principales micosis (superficiales, cutáneas, sistémicas y oportunistas).

El laboratorio de docencia de Micología Clínica cuenta con equipos, materiales, reactivos en diversas condiciones y un número limitado de cepas preservadas; pero además no contaba con protocolos para la conservación, mantenimiento, almacenaje de las cepas de hongos clínicos, como tampoco de integración de nuevos hongos al cepario, lo que conllevó a una desorganización y confusión al momento de disponer de las mismas, condiciones que podemos analizar en la lista de verificación en el **Anexo 8**. De acuerdo a las publicaciones se sabe que uno de los principios más importantes para la conservación de cultivos fúngicos es el mantenimiento de los medios de cultivo, de tal manera que se garantice el ambiente y los nutrientes necesarios para conservar las características genotípicas y fenotípicas del hongo a corto o largo plazo (Fernández, 2005). Las colecciones de cultivos además de proveer un lugar para la preservación de los microorganismos, cumple la principal tarea de establecer protocolos relacionados con la conservación y almacenaje; ya que al realizar únicamente el aislamiento y caracterización de los hongos, no es suficiente para su preservación y posterior utilización (Panizo et al., 2015).

Uno de los principales contaminantes en los cultivos son los ácaros que influyeron directamente en la calidad de las cepas (Martínez, 2009), por esta razón es importante seleccionar adecuadamente los métodos de conservación y almacenaje. Ciertas publicaciones reportaron que el método de conservación en agua destilada (método de Castellani) es usado para grandes colecciones de hongos alrededor del mundo, debido a su bajo costo y eficiencia al mantener la viabilidad y pureza de las cepas de hongos, evitando así el pleomorfismo y la contaminación por ácaros (Fernández, 2005). Grandes micotecas como las del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri” (IPK) y la del Instituto Nacional de Higiene “Rafael Rangel”, han utilizado el Método de Castellani como uno de los métodos para preservar cultivos de hongos filamentosos por una media de 30 años; evidenciando un alto porcentaje de viabilidad (Fernández, 2005 & Panizo, 2015).

La Federación Mundial de Colecciones de Cultivos (WFCC) recomienda emplear técnicas de codificación que ayuden a registrar eficientemente la información de cada hongo almacenado y de esta manera llevar un seguimiento y un control de las actividades (WFCC, 2010).

Frente a los problemas detectados en el laboratorio de docencia de Micología Clínica, el estudio se enfocó en la realización de una moderna micoteca que se centró en la organización, identificación, reactivación, conservación, codificación y almacenaje de las muestras de hongos clínicos que son de interés para el laboratorio de Micología Clínica de la carrera de Bioquímica Clínica, así como de la realización de procedimientos operativos estándar que nos permitieron establecer protocolos para la realización de cada proceso que conlleva a la ejecución y conservación de la micoteca.

Según Carlos Fernández del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri” la tarea principal que deben tener en común los laboratorios de micología es la elaboración de un cepario, que es un instrumento valioso y de uso permanente (Fernández, 2005). La función primordial de una micoteca es la conservación adecuada de los hongos, para lo cual se requiere el seguimiento de ciertas normas básicas: (Fernández et al, 2005)

- 1) Preservación y mantenimiento de los cultivos puros, viables y fieles a su identificación.
- 2) Mantenimiento de estabilidad genética.
- 3) Conservación de la biodiversidad.

4) Utilización de al menos dos métodos de preservación, que sean los más adecuados de acuerdo a las características de los hongos a conservar (González, 2006).

5) Mantenimiento de sus características de patogenicidad.

Otra función de la micoteca es la adecuada codificación de las cepas de hongos aislados, la documentación y sistematización de toda la información de las características fenotípicas; lo que condujo a una mejor organización, fácil acceso y manejo de los mismos.

De acuerdo a lo expuesto anteriormente, el presente proyecto se justificó porque los productos obtenidos del mismo sirvieron para atender al laboratorio de docencia de Micología Clínica de la carrera de Bioquímica Clínica y de otras unidades académicas si así lo requirieron, ya que :

- Se estableció como una herramienta didáctica que mejoró las estrategias pedagógicas del docente y de esta manera se desarrollaron y optimizaron las destrezas del estudiante en la identificación macroscópica y microscópica de hongos de importancia clínica.
- Permitted la implementación de procesos de almacenamiento de cepas de hongos.
- Se Protocolizaron los métodos de almacenamiento, conservación y mantenimiento del cepario.
- Se organizó y sistematizó la información sobre los hongos caracterizados.
- Se atendió a otras Carreras relacionadas con el área en requerimientos de cepas y procedimientos ensayados.

En la realización de la micoteca para el área de Micología Clínica de la carrera de Bioquímica Clínica, se seleccionaron los métodos de Castellani y desecación de papel filtro para la conservación de las cepas de hongos clínicos filamentosos; el método de Castellani fue avalado por garantizar altos porcentajes de estabilidad, viabilidad y pureza de las cepas, al igual que su bajo costo y reducida utilización de equipamiento y personal especializado, por lo que constituye una alternativa para los laboratorios de bajo presupuesto (Panizo, 2005 & Fernández, 2013).

La complementación del método de Castellani para la realización de la micoteca fue la utilización del método por desecación en papel filtro que consistió en utilizar papel absorbente estéril sobre el cual se impregnó una solución de células, y se dejó secar al

aire en condiciones estériles, este método tiene el principio de la desecación lo que provoca la conservación de las características propias del hongo (García, 2001).

Dentro de este proyecto se manipularon cepas que pueden constituirse como biopeligrosas para el personal del laboratorio generando posibles infecciones según el tejido donde se localiza, ya sea una micosis profunda (en menor medida), micosis subcutánea, micosis cutáneas y superficiales que son las que podemos encontrar en mayor proporción dentro de la micoteca. La inoculación de las formas levaduriformes o miceliales son los principales focos de infección que se pueden encontrar en el laboratorio, por lo que es necesario seguir ciertas normas establecidas por la NTP 539 dentro de la prevención del riesgo biológico en el manejo de cepas fúngicas (Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo, 2008). Estas normas destacan el uso de equipos de protección personal (guantes, mascarilla, protección ocular, batas y ropa de trabajo para prevenir la exposición), además de establecer un nivel de contención frente a los microorganismos obtenidos (Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo, 2008). Para las cepas de este proyecto se utilizó un nivel de contención tipo 2 para la manipulación de material infeccioso, en el que se recomendó el uso de cabinas de seguridad biológica, además el estudio y posterior uso minucioso de los POE's para la correcta manipulación de las cepas (Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo, 2008).

Cláusula para el manejo de los productos obtenidos en el trabajo de grado titulado “Diseño de una micoteca de importancia clínica a partir de cepas reactivadas en el laboratorio de Micología Clínica de la carrera de Bioquímica Clínica de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador”

En el presente estudio se explican los procedimientos de cómo fueron realizados todos los productos obtenidos en un periodo de tiempo determinado. Por lo cual todos y cada uno de los productos, datos y resultados (POE's, registros, instructivos, cajas de placas, cajas de crioviales, tuberas y fotografías macroscópicas y microscópicas con los diferentes tipos de hongos) que se obtuvieron en el presente estudio, serán entregados a la coordinación de la Carrera de Bioquímica Clínica de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, en forma de archivos digitales para su posterior manejo y utilización solo en el caso de estudio del presente trabajo de grado.

Nosotras, Daniela Alexandra Soria Aguirre C.I.;172270195-8 y Alicia Isabel Figueroa Carrasco, 171669101-7 como autoras del presente estudio autorizamos el uso de los productos obtenidos únicamente para propósitos académicos.

La coordinación de la carrera de Bioquímica Clínica de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador se compromete a instruir al personal que estará encargado de recibir, manejar y mantener en óptimas condiciones todos los productos, datos y resultados obtenidos en el presente estudio.

1.1 OBJETIVOS

1.2 OBJETIVO GENERAL

- Diseñar una micoteca de importancia clínica a partir de cepas colectadas y almacenadas en el laboratorio de Micología Clínica, de la carrera de Bioquímica Clínica de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador – Quito.

1.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar fenotípicamente las cepas de hongos y levaduras de importancia clínica disponibles en el laboratorio de Micología Clínica de la carrera de Bioquímica Clínica.
- Describir las características macroscópicas y microscópicas mediante el uso de fichas técnicas con un registro fotográfico y teórico de las cepas.
- Implementar métodos estandarizados de conservación y almacenaje para las cepas de hongos reactivados en el laboratorio de Micología Clínica.
- Implantar y sistematizar la información obtenido a partir de las cepas de hongos y levaduras de importancia clínica.
- Elaborar procedimientos operativos estándar (POE's) de conservación, almacenaje e integración de nuevas cepas de hongos y levaduras de importancia clínica del laboratorio de Micología Clínica de la carrera de Bioquímica Clínica.
- Evaluar la viabilidad y pureza de las cepas de hongos y levaduras de importancia clínica, almacenados y caracterizados.

CAPITULO II

2.1 MARCO TEÓRICO Y CONCEPTUAL

2.2 MARCO TEÓRICO

2.2.1 Generalidades y taxonomía de los hongos

Los hongos son organismos eucariontes que constituyen un complejo grupo de organismos, para apreciar las características morfológicas básicas de los hongos estos pueden ser macroscópicos (setas) o microscópicos (causantes de las micosis) (Arenas, 2014).

La micología médica es una rama de la microbiología la cual está encargada de estudiar las enfermedades producidas por los hongos. La nomenclatura y clasificación en los últimos años han cambiado, para evitar confusiones se aplica una taxonomía numérica en la cual se consideran una anaerobia y siete aerobios (Arenas, 2014).

La taxonomía de los hongos está basada en las características de las estructuras de reproducción asexual y en los criterios morfológicos. La clasificación de los hongos puede generar confusión porque están en permanente desarrollo ya que cada día se descubren nuevas especies, por tal motivo para mayor facilidad y comprensión **Ver Tabla 1**, en el cual se presenta la clasificación simplificada de hongos y pseudohongos (Arenas, 2014).

Tabla 1

Tabla de la clasificación general de los hongos y pseudohongos.

Reino Protista	Reino Eumycota
(inferiores/cenocíticos)	(superiores/septatos)
<i>Acrasiomycota</i>	<i>Chytridiomycota</i>
<i>Myxomycota</i>	<i>Zygomycota</i>
<i>Oomycota</i>	<i>Ascomycota</i>
<i>Mesomycetozoa</i>	<i>Basidiomycota</i>
<i>Hyphocytriomycota</i>	
<i>Labyrinthulomycota</i>	

Fuente: Arenas, R. (2014). *Micología Médica Ilustrada*. (M. G. Hill, Ed.) (5a Edición). México.

2.2.2 Hongos de importancia clínica

A las infecciones causadas por hongos microscópicos se las denomina micosis y toman el nombre de la parte afectada o el hongo que lo causa. Según su localización se distinguen las micosis superficiales que afecta piel y mucosas por contacto directo con el hongo; las micosis subcutáneas que se adquieren del ambiente y el hongo ingresa por alguna herida; las micosis sistémicas donde las esporas del hongo ingresan por inhalación, colonizan y generan infecciones pulmonares y las micosis oportunistas son causadas por hongos que forman parte de la flora normal pero que antes diferentes situaciones como la inmunosupresión se vuelven patógenos (Arenas, 2014). En la **Tabla 2** se puede observar la clasificación clínica de las micosis.

Tabla 2

Tabla de la clasificación clínica de las micosis en seres humanos

Tipos	Enfermedad	Género del hongo
Superficial: Capas externas de piel (epidermis), cabello, uñas, mucosas	Pitiriasis versicolor	<i>Malassezia</i>
	Tiña negra	<i>Hortaea</i>
	Dermatofitosis	<i>Trichophyton</i>
		<i>Microsporum</i>
		<i>Epidermophyton</i>
Subcutáneo: Dermis, tejido subcutáneo y músculo	Eumicetoma	<i>Madurella</i>
	Esporotricosis	<i>Sporothrix</i>
	Cromoblastomicosis	<i>Fonsecaea</i>
Sistémico o profundo: Uno o más órganos / tejidos profundos	Histoplasmosis	<i>Histoplasma</i>
	Paracoccidioidomicosis	<i>Paracoccidioides</i>
	Coccidioidomicosis	<i>Coccidioides</i>
Oportunista: En un sujeto susceptible, <i>cualquier</i> hongo puede ser un oportunista	Candidosis	<i>Candida</i>
	Criptococosis	<i>Cryptococcus</i>
	Zigomicosis	<i>Rhizopus</i>

Fuente: Arenas, R. (2014). *Micología Médica Ilustrada*. (M. G. Hill, Ed.) (5a Edición). México.

2.2.2.1 Características macroscópicas de hongos filamentosos y levaduriformes

Las características macroscópicas de los hongos, corresponden a las descripciones de los aspectos fenotípicos de las colonias. Los hongos presentan una gran diversidad de colonias que van desde pequeñas producidas por levaduras, hasta grande y algodonosas producidas por hongos filamentosos. Las características especialmente de hongos filamentosos pueden variar debido a la constitución nutritiva de los medios de cultivo, temperatura y el tiempo de incubación (Universidad Nacional del Noreste, 2010).

De acuerdo a (Arenas, 2014), en el análisis macroscópico de levaduras, se debe considerar:

- Color (frente y revés): blanca, rosada, gris, anaranjada, verde, rojiza, negra, etc.
- Textura: yesosa, terrosa, granulosa, vellosa, algodonosa, cérea, aunque predomina el aspecto cremoso y opaco.
- Superficie: elevada o plana, levantamiento central.
- Aspecto: plegado, radiado, cerebriforme, crateriforme.
- Consistencia: suave, firme, membranosa.
- Borde: regular e irregular.
- Rapidez de crecimiento 24 – 72 horas: horas.

En el análisis macroscópico de hongos filamentosos se debe considerar:

- Medio de cultivo
- Tamaño: 10 – 30 mm de diámetro.
- Coloración (frente y revés): blanca, rosada, gris, verde, café, rojiza, negra.
- Textura: algodonoso, vellosa, aterciopelado, polvoso.
- Superficie: elevada con micelio aéreo, plana, levantamiento central.
- Borde: regular e irregular
- Rapidez de crecimiento: lento (15-30 días)
moderado (7-10 días)
rápido (6 días o menos)

2.2.2.2 Características microscópicas de hongos filamentosos y levaduriformes

Las características microscópicas de los hongos hacen referencia a la determinación de las características relacionadas con el tipo y la forma de las células vistas al microscopio óptico. Según (Arenas, 2014) en el análisis microscópico de levaduras se debe considerar la presencia o ausencia de:

- Pseudohifa: conjunto de células levaduriformes que no se han separado después de la gemación.
- Blastosporas: espora formada por la gemación
- Clamidosporas: espora de pared gruesa que sobrevive en condiciones desfavorables.

Según (Arenas, 2014) en el análisis microscópico de hongos filamentosos se debe considerar la presencia o ausencia de:

- Micelio macrosifonado hialino y cenocítico: micelio con diámetro mayor a 1 μm , carece de tabiques y pigmento.
- Micelio macrosifonado hialino y tabicado: micelio con diámetro mayor a 1 μm , carece de pigmento y presenta tabiques.
- Micelio microsifonado: micelio con diámetro menor a 1 μm .
- Modalidad de las hifas: candelabro fávico, cuerpos nodulares, espirales, pectinadas, zarcillos, rizoides, estolón.
- Microconidios: células ovoides o globosas de tamaño pequeño.
- Macroconidios: células globosas, ovoides o en forma de hoja de gran tamaño.
- Clamidoconidios: células globosas u ovoides que se localizan a nivel terminal e intercalar. Producidas en condiciones adversas.

2.2.3 Generalidades de las micotecas

Las micotecas son consideradas como centros de conservación de hongos, que permite custodiar y conservar la integridad de las cepas, con el fin de garantizar un material biológico adecuado para el diagnóstico y la realización de nuevas investigaciones y para la enseñanza de la micología médica (Morales, 2007 & Fernández, 2012).

La función principal de una micoteca se basa en la adecuada recolección, ordenamiento, sistematización y conservación de todos los hongos que se encuentran en la colección. La información obtenida de cada uno de los hongos se debe mantener en una base de datos digital e impresa, siendo un apoyo tanto técnico como científico para investigaciones posteriores (Panizo et al., 2015).

La realización de una micoteca y la conservación de los diferentes hongos es una solución para enfrentar grandes problemas de la humanidad, que están relacionados con la salud y el medio ambiente, al preservar cepas que atentan contra la integridad de las personas con una alta significancia clínica (Panizo et al., 2015), por lo que es importante garantizar el producto de dichas colecciones aplicando medidas de aseguramiento y control de calidad apoyándose en las normas internaciones ISO, para garantizar su correcto funcionamiento (Oca, 2008).

2.2.4 Micotecas en Latinoamérica

Las colecciones de cultivos en Latinoamérica varían desde, pequeños centros de investigación hasta grandes centros de servicios, la mayoría tiene diferentes objetivos, intereses y políticas e incluso los microorganismos que se conservan pueden tener diferentes usos (AAM, 2016).

Dentro de las micotecas más importantes en Latinoamérica en el año 2014 tenemos:

Tabla 3

Micotecas en Latinoamérica hasta el 2014

ENTIDAD	ESPECIES	SERVICIOS
ARGENTINA		
Universidad Nacional de Rosario Centro de Referencia de Micología (CEREMIC).	1369 hongos filamentosos y 465 hongos levaduriformes.	Docencia, investigación y asesoramiento.
Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas “Dr. Carlos G. Malbrán”. ANLIS, Departamento de Micología.	425 levaduras, 734 hongos miceliales y 458 hongos dimórficos.	Identificación, caracterización y distribución de cepas a nivel local.
El Instituto de Investigaciones en Biodiversidad y Medioambiente (INIBIOMA, CONICET- UNComahue).	35 géneros de levaduras y hongos dimórficos de ambientes naturales y patológicos.	Asesoramiento y de investigación.
Instituto de Medicina Regional del Departamento Micología de la Universidad Nacional del Noreste de Argentina.	600 hongos filamentosos, 706 levaduras.	Investigación, asesoramiento y docencia.

Laboratorio de Micología. DBBE de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad Nacional de Buenos Aires.	Hongos filamentosos nativos	Investigación, distribución de cultivos, entrenamiento.
Instituto Spegazzini de Facultad de Ciencias Naturales y Museo de Universidad Nacional de La Plata de Argentina.	1195 especies, fundamentalmente de hongos filamentosos de <i>Ascomycota</i>	Investigación, mantenimiento, repositorio de referencia y para la docencia.

CUBA

Ministerio de Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente (CITMA).	95 cepas de hongos, 120 de bacterias y 2 de levaduras.	Investigación.
Centro de Estudios de Biotecnología Industrial (CEBI) de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad de Oriente de Cuba.	134 cultivos, conformado por bacterias, hongos filamentosos y levaduras.	Investigación, docencia, suministro de cepas, conservación e identificación de las bacterias.
Facultad de Biología de la Universidad de la Habana en Cuba.	573 cepas de bacterias, 439 de hongos filamentosos, 22 levaduras y 10 microalgas.	Investigación y docencia.

MÉXICO

Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN).	1313 bacterias, hongos filamentosos, levaduras y microalgas.	Aislamiento, caracterización, identificación y distribución de cultivos a nivel Nacional.
--	--	---

URUGUAY

Laboratorio de Micología del Departamento de Bioingeniería del Instituto de Ingeniería Química perteneciente a la Facultad de Ingeniería de Uruguay.

735 cepas de bacterias nativas, levaduras, 2845 cepas de hongos filamentosos patógenos.

Asesoramiento identificación y caracterización de microorganismos, y suministra microorganismos para docencia, investigación.

COLOMBIA

Pontificia Universidad Javeriana de Colombia.

598 especies de bacterias y hongos.

Caracterización, preservación, identificación molecular, de igual manera suministra cepas con fines de investigación y docencia.

ECUADOR

Hospital Vozandes en Ecuador

1296 bacterias y hongos de aislamientos clínicos.

Facultad de Biología de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador.

2068 levaduras

Investigación y docencia, caracterización e identificación de aislamientos.

Fuente: Asociación Argentina de Microbiología. (2014). Base de Colecciones de Cultivos Microbianos - FELACC.

La Federación Latinoamericana de Colecciones de Cultivos (FELACC), constituye una red global para la preservación de la diversidad microbiana que sostiene la vida en la tierra, las actividades principales son la continuidad y asesoramiento para establecer nuevas colecciones, la (FELACC) es una organización sin fines de lucro, se ha ocupado

de afiliar permanentemente a colecciones privadas y públicas de países de la región, actualmente están asociadas 51 colecciones de cultivos de Brasil, Cuba, Argentina, Ecuador, México, Colombia, Perú, Venezuela y Uruguay (AAM, 2016).

2.2.5 Lineamiento para la elaboración de Micotecas dispuesta por la Federación Internacional de Colecciones de Cultivos (WFCC)

La máxima organización que representa las colecciones de cultivos es la Federación Internacional de Colecciones de Cultivos (WFCC), por lo que ha implementado ciertos lineamientos para garantizar las buenas prácticas de laboratorio, enfatizando que el equipamiento sofisticado no es un requisito y que los principios de dichos lineamientos se deben aplicar a cualquier micoteca independientemente de su tamaño y disponibilidad económica (WFCC, 2010).

El contenido de dichos lineamientos incluye (WFCC, 2010):

- La organización debe estar dispuesta a aceptar las responsabilidades de establecer una micoteca (Costos, modificaciones, personal, etc) a corto y largo plazo.
- El establecimiento de los objetivos a cumplirse a corto y largo plazo.
- Determinar el contenido de la micoteca empezando por la cantidad de cepas y las políticas de acceso hacia las mismas.
- El personal que tiene acceso al cepario debe estar capacitado para mantener las normas de buenas prácticas de laboratorio.
- Los métodos idóneos para su preservación.
- La autenticación de los cultivos a través de la correcta identificación de los mismos.
- El suministro de cultivos en el caso de ofrecer dicho servicio.
- La documentación que nos permita obtener toda la información relacionada al hongo aislado y conservado.
- Los catálogos ya sean impresos u on-line debidamente renovados.
- La realización de investigaciones que nos permita obtener personal de calidad y genere nuevas contribuciones a la micoteca.
- Mantener una capacitación constante la cual permita obtener actualizado un personal en cuanto a técnicas e identificación de las cepas.
- Los aspectos de bioseguridad llevados a cabo en cada uno de los procedimientos realizados, además de ciertos lineamientos establecidos para entidades que ofrecen servicios de distribución de cultivos.

2.2.6 Métodos para el mantenimiento y viabilidad de hongos de importancia clínica

La utilización de métodos de conservación y almacenaje para los cultivos de hongos es de gran importancia para evitar la degeneración y el envejecimiento de los mismos. Realizar aislamiento o resiembras no es suficiente para conservar la integridad de los hongos, por lo que es necesario el uso de métodos de conservación y almacenaje correctos para preservarlos sin cambios fenotípicos y genotípicos permitiendo así estudio posteriores (Panizo,2015). En la actualidad se manejan diversos métodos de conservación, los cuales dependen fundamentalmente de las especies de hongos que se quieren mantener y de los recursos, económicos y de espacio que estén disponibles (Fernández, 2005).

Por lo tanto los cultivos de hongos deben ser aislados y conservados por al menos dos técnicas y ubicadas en lugares diferentes para asegurar así su rápido acceso, la disponibilidad de cepas viables y de referencia única lo que ayudará a su disponibilidad en el futuro (Panizo,2015).

2.2.6.1 Métodos de conservación a largo plazo para hongos filamentosos y levaduriformes

Los métodos de conservación a largo plazo para los hongos filamentosos y levaduriformes, son los métodos que generan mejores resultados ya que detienen el crecimiento de las células, sin provocar su muerte. Así se ha logrado garantizar la estabilidad genética de los hongos por largos períodos de tiempo. Para minimizar la pérdida de cepas, estas deben ser almacenadas por al menos dos métodos diferentes siendo uno de ellos la liofilización o la congelación, ya que estos ayudan a minimizar el riesgo de cambios genéticos (González, 2006).

Los métodos de conservación a largo plazo son: liofilización, criocongelación (congelación ordinaria, congelación ultra fría, congelación con nitrógeno líquido) (González, 2006).

➤ *Liofilización*

La liofilización es un método a largo plazo para preservar bacterias, hongos, levaduras y virus. El principio del método para conservar hongos es congelar la suspensión conidial y

remover el agua por sublimación mediante vacío. Para este proceso se realizan 3 etapas (González, 2006):

- Pre-congelación: permite asegurar que las estructuras estén completamente congeladas.
- Secado primario: aquí se elimina la mayor cantidad de agua por sublimación.
- Secado secundario: remueve el agua que quedo ligada.

Este método permite lograr una estabilidad y viabilidad de los hongos por períodos mayores a 40 años (Alarcon, 2006). Este método es conveniente para los ceparios de producción masiva, ya que no requiere de atención constante luego de almacenar los cultivos liofilizados, además que no requiere mucho espacio. No obstante este proceso es caro y complejo, y aunque no tiene la necesidad de usar equipos sofisticados, se requiere un sistema de vacío, por lo tanto no es aplicable a laboratorios con recursos limitados (González, 2006).

➤ **Criocongelación**

La criocongelación es un método de conservación y almacenamiento a largo plazo que garantiza la máxima estabilidad genética (Gato, 2010). Consiste en recolectar las estructuras fúngicas con un agente crioprotector a temperaturas muy bajas. El agua en el interior de las células se congela reduciendo la actividad metabólica del hongo favoreciendo así la estabilidad y viabilidad por períodos mayores a 30 años (Macas, 2014).

El método de criocongelación se clasifica según la temperatura en la que se va a llevar a cabo: congelación ordinaria, congelación ultra fría, congelación con nitrógeno líquido.

– **Congelación ordinaria**

La congelación ordinaria se realiza a temperaturas entre -50°C y -20°C . Los microorganismos permanecen viables y mantienen sus características por uno o dos años, no se recomienda por períodos de almacenamiento mayores (Hernández & Loaiza, 2014). Esta temperatura es aconsejable debido a que aún con una alta concentración de solutos en la suspensión, alcanza un punto de congelación alto (ATTC, 2001).

– ***Congelación ultra fría***

La congelación ultra fría se realiza a partir de la centrifugación de una suspensión conidial, la cual se suspende en un medio con agente crioprotector como el glicerol. Esta suspensión se coloca en tubos especiales la cual con ayuda de congeladores mecánicos a temperaturas entre -50°C y -80°C empieza el proceso de congelación ultra fría (Hernández & Loaiza, 2014).

– ***Congelación con nitrógeno líquido***

El método de congelación con nitrógeno líquido es el más recomendado porque usa temperaturas de -150°C a 196°C, lo que permite detener por completo el metabolismo celular. La velocidad de congelación va de 1 a 2°C/min hasta alcanzar los -30°C, luego 1°C/min hasta alcanzar -56°C, y posteriormente se coloca en nitrógeno líquido (Hernández & Loaiza, 2014). La principal ventaja de este método es que no tiene riesgo de contaminación y cambios genéticos, sin embargo, los requerimientos de equipamiento del método hacen de este uno de los más costosos (Hernández & Loaiza, 2014).

➤ ***Agente crioprotectores***

Los agentes crioprotectores son sustancias que protegen a las células, en el momento de la congelación evitando la formación de cristales que pueden dañar las células. Existen varios compuestos que se pueden utilizar, pero el más utilizado es el glicerol al 15 o 20% (Macas, 2014).

2.2.6.2 Métodos de conservación a corto plazo para hongos filamentosos y levaduriformes

Estos métodos de conservación ayudan al mantenimiento de las cepas, siendo estos los más utilizados cuando se requiere reactivar las cepas frecuentemente. Hay que tener en cuenta que no se debe usar solo un método a corto plazo sino que debe estar acompañado de un método de conservación a largo plazo (Alarcon, 2006).

Los métodos de conservación a corto plazo son: cultivo seriado, suspensión en agua destilada, aceite mineral estéril.

➤ **Cultivo seriado**

El cultivo seriado consiste en resembrar el microorganismo en un medio de cultivo fresco, en periodos que aseguren la viabilidad del hongo. Este es un método simple con el que se puede mantener las características de muchos microorganismos por varios años. Se recomienda utilizarlo para trabajar en colecciones pequeñas debido a su bajo costo, reducido equipamiento y el tiempo de realización (González, 2006).

➤ **Suspensión en agua destilada**

El método de Castellani, también llamado método de agua destilada, es una de las técnicas de conservación de hongos a corto plazo, más simple y más utilizada en la elaboración de micotecas. Este método trabaja a temperaturas de 2 a 8°C y ha logrado mantener la pureza, estabilidad y viabilidad de hongos patógenos por periodos entre 2 y 8 años (López et al., 2012). El agua destilada es capaz de suprimir los cambios morfológicos de la mayoría de hongos. Dentro de las ventajas de este método es que es simple de realizar, económico, seguro y no requerir de personal y material especializado para su realización. Entre las ventajas que brinda este método están garantiza la estabilidad de las características morfológicas, el mantenimiento de la viabilidad y de la pureza del hongo, evitando el pleomorfismo y la posible contaminación por ácaros. El método permite un manejo más eficiente y simple de las formas filamentosas de ciertos hongos patógenos con menor riesgo de contaminación en el laboratorio (Gato, 2010).

➤ **Aceite mineral estéril**

Este método consiste en cubrir con aceite mineral estéril el cultivo, el cual está compuesto por aceite lubricante producido a partir de petróleo (Alarcon, 2006). El fin de la técnica es disminuir la deshidratación del medio, retardar la actividad metabólica del cultivo por la pérdida de tensión del oxígeno, además que reduce las posibilidades de infestación por ácaros (Alarcon, 2006). Este método es utilizado para formas estrictamente miceliales que no pueden ser conservadas por liofilización o criopreservación por ser métodos de costos elevados (González, 2006).

2.2.6.3 Métodos restringidos

Los métodos restringidos no son habitualmente empleados, pero son útiles para preservar microorganismos que no resisten a la liofilización o la congelación. Estos

métodos se basan en detener el crecimiento del hongo a partir de la eliminación del agua que se encuentra dentro de las células (García, 2001).

Dentro de los métodos restringidos uno de los más importantes es el de desecación en papel filtro.

➤ ***Desecación en papel filtro***

La desecación en papel filtro es un método utilizado para conservar microorganismos incapaces de resistir la liofilización y congelación. Consiste en utilizar papel absorbente estéril, el cual será impregnado con una solución de células y posteriormente se dejará secar al aire en condiciones estériles, esto producirá la desecación de las células conservando así las características propias del hongo (García, 2001).

2.2.7 Reactivación e identificación de hongos

La reactivación es la técnica que a través de la resiembra logra obtener la mayor viabilidad posible de una cepa conservada (Arenas, 2014).

La identificación de los hongos empieza por la descripción macroscópica de las cepas de hongos, determinando el tamaño, coloración, textura, superficie, borde, medio de cultivo para los hongos filamentosos y la determinación del color, textura, superficie, aspecto consistencia, borde y rapidez de crecimiento para hongos levaduriformes. Posteriormente se realiza la identificación microscópica realizada a través de la técnica de microcultivo para hongos filamentosos a temperatura ambiente, que permite observar a través del microscopio óptico (40X) las partes y formas del hongo determinando así el género y la especie, mientras que para la identificación de levaduras se realiza la siembra a 37°C y posterior análisis de tubo germinal, chromagar o a través de pruebas de asimilación de azúcares (API 20 C AUX) para la determinación de la especie (Arenas, 2014).

2.2.8 Documentación de un cepario de hongos

Uno de los lineamientos más importantes establecidos por la WFCC es la documentación adecuada del cepario, en el cual se lleva registros de cada cepa conservada, incluyendo información importante como (WFCC, 2010):

- Lugar
- Huésped
- Fecha de aislamiento
- Nombre de la persona que aisló
- Depositante (otra fuente de la cepa, como otra colección)
- Nombre de la persona que identificó la cepa
- Método de conservación empleado
- Medio de crecimiento óptimo y temperatura
- Datos sobre características bioquímicas de haberlas

2.2.8.1 Codificación o sistematización

Todas las micotecas deben tener una correcta identificación de sus colecciones de hongos, ya que si no fuera así, el personal corre el riesgo de usar microorganismos equivocados y de esta manera provocaría una pérdida de tiempo, publicaciones de resultados erróneos y pérdida de presupuesto (Culture & Collection, 2010).

2.2.8.2 Técnica de codificación o sistematización

Las técnicas de codificación consisten en suministrar códigos, ya sean numéricos o alfanuméricos. Esta es una de las formas para que la información de las cepas sea registrada eficientemente y posibilite llevar a cabo un seguimiento y/o control de actividades realizadas con las mismas (Culture & Collection, 2010).

Al momento de realizar una codificación se debe llevar un registro manual y digital de cada una de las cepas que están conservadas en la micoteca, estas deberían incluir por lo menos la fecha de aislamiento, el nombre de la persona que realizó el aislamiento, el nombre de la persona que identificó la cepa, el método que se está empleando para su conservación, el medio óptimo para su crecimiento y su temperatura. Por seguridad para el laboratorio, todos estos registros se deben computarizar y duplicar para que sea más fácil su acceso. Todo el personal que está a cargo de la colección de hongos, debe estar familiarizado con el sistema operativo y los protocolos de tal manera que, en ausencia del personal encargado, los otros analistas sepan encontrar información de la micoteca (Culture & Collection, 2010).

2.2.8.3 Foto documentación

Una vez finalizada toda la identificación tanto macro como microscópica de los diferentes hongos clínicos, se debe realizar una foto-documentación con registros digitales o impresos, los cuales deben estar en forma clara y ordenada.

2.2.9 Plan de seguimiento de las cepas conservadas en la micoteca

El plan de seguimiento hace referencia al chequeo continuo de la viabilidad de las cepas conservadas, lo cual ayuda a no perder el material que ha sido almacenado. Este monitoreo puede realizarse por diferentes métodos, en el caso de la preservación por métodos a corto plazo es suficiente realizar una resiembra en un medio fresco, siendo este incubado y posteriormente determinar la viabilidad del mismo. En caso de métodos de preservación a largo plazo como es el caso de las levaduras se realiza cuantitativamente por el método de conteo en placa por diluciones seriadas (González, 2006).

El tiempo en el que se conserven los diferentes hongos ya sean miceliales como levaduriformes va a depender del medio en el que se realiza la siembra, los nutrientes, el método de preservación, el tamaño del inóculo y la capacidad del hongo para desarrollarse en el medio sin perder las características fenotípicas y genotípicas (González, 2006). Para determinar la viabilidad de las cepas ya conservadas es necesario realizar un seguimiento periódico el cual se puede realizar cada 3 meses eligiendo cepas al azar, aunque ya ha sido probado que el método de Castellani aseguran la viabilidad de las cepas por períodos mayores a los 10 años (Fernández, 2005 & Panizo, 2015).

2.2.10 Elaboración de procedimientos operativos estándar (POE´s)

Los POE´s son considerados como herramientas para asegurar la reproducibilidad y consistencia de las características de los productos o procesos realizados por diferentes entidades, a partir de la asignación de funciones y responsabilidades al personal encargado. Dichos POE´s son requeridos por las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL) y organismos como la ISO para garantizar la calidad de los procesos a través de registros y además que ayuden a minimizar o eliminar errores (ANMAT, 2011).

2.2.10.1 Que son y cuál es la función de los (POE´s)

Los POE´s son documentos que describen detalladamente los procedimientos a realizarse en cada proceso con el fin de obtener diferentes productos, permitir al personal desempeñarse mejor al aplicar prácticamente el contenido del POE, y de la misma forma evaluar al personal al conocer su desempeño (ANMAT, 2011).

2.2.11 Como se estructura un procedimiento operativo estandarizado

Como primera instancia para la elaboración de un POE se deben responder las siguientes preguntas (ANMAT, 2011):

- ¿Por qué está siendo realizada la tarea?
- ¿Quién está realizando la tarea?
- ¿Qué están haciendo?
- ¿Con qué frecuencia?
- ¿Cuáles son los límites?
- ¿Cuáles son las medidas correctivas y preventivas?

Después de responder las preguntas planteadas anteriormente, se deben seguir los siguientes pasos:

- Escribir en tercera persona, lo que se va a realizar, esto debe estar en forma sencilla, clara y precisa
- Identificar las tareas que se van a realizar
- Registrar todo lo que se ha hecho
- Verificar todo el procedimiento realizado
- Corregir y mejorar si es necesario

Los POE´s deben ser probados antes de ser puestos en vigencia ya que su aplicación contribuirá a garantizar un mantenimiento de los niveles de la calidad y minimizar o eliminar errores del personal a cargo (ANMAT, 2011).

Los POE´s por lo general son elaborados por instituciones que están vinculadas con la investigación, a laboratorios e industrias afines (Cataldi, 2011).

2.3 MARCO CONCEPTUAL

- **Auxonograma:** prueba que se utiliza para evaluar la capacidad que tiene las levaduras de asimilar diferentes carbohidratos (glucosa, maltosa, sacarosa, galactosa, lactosa, celobiosa, trehalosa, etc) (Linares & Solís, 2007).
- **Crioprotectores:** sustancia que penetra los tejidos impidiendo la formación de cristales de hielo cuando baja la temperatura (Hernández & Loaiza, 2014).
- **Desecación:** Eliminar el agua disponible para las células paralizando su crecimiento (García, 2001).
- **Foto documentación:** es una documentación en forma fotográfica la cual debe llevar un registro digital.
- **Hongos de importancia clínica:** son hongos principalmente de interés médico que causan micosis en los humanos (Fernández, 2013).
- **Micoteca o cepario:** es una colección de hongos tanto microscópicos como macroscópicos (Panizo et al., 2015).
- **POE'S:** procedimientos Operativos Estandarizados, son documentos que describen pasos en orden secuencial de todas las operaciones (Cataldi, L. Guelfand, 2011).
- **Sistematización:** son técnicas de codificación que proporcionan códigos, numéricos como alfanuméricos (Culture & Collection, 2010).
- **Sublimación:** paso de estado sólido a gaseoso sin pasar por el líquido.

CAPÍTULO III

3 MARCO METODOLÓGICO

El presente proyecto se realizó en cinco fases de trabajo en el laboratorio:

1. Reactivación de las cepas de hongos.
2. Identificación microscópica y macroscópica de los hongos.
3. Foto documentación.
4. Codificación, almacenamiento y conservación.
5. Elaboración de POE's de ingreso de cepas nuevas, identificación de hongos filamentosos, identificación de hongos levaduriformes y de conservación y almacenaje.

3.1 Procedimientos de laboratorio

3.1.1 Medios e insumos

Tabla 4

Reactivos, medios, materiales y equipos para los procesos de identificación, almacenaje y codificación de hongos

COLORANTES Y SOLUCIONES	MEDIOS DE CULTIVO	MATERIALES	EQUIPO
Azul de lactofenol	Agar papa dextrosa	Asas en L y calibradas	Microscopio óptico LEICA CME y Leitz wetzlar Microscopio óptico OLYMPUS CX31
Ácido láctico	Agar avena	Pinzas	Estereomicroscopio SEMCA
Agua destilada	Agar sabouraud	Agujas de disección	Incubadora a temperatura ambiente Incubadora memmert 37°C
Tinta china	Agar - Agar	Cajas Petri de	Refrigeradora Indurama 2

	plástico y vidrio	a 8°C
API 20 C AUX x 25 galerías	Porta y cubre objetos	Cámara canon t2i semi- profesional
Agar harina de maíz	Tubos tapa rosca	Cámara Sony Cyber shot 16.2 Mega pixels
	Crioviales de 2ml	Cámara OLYMPUS U- CMAD3 (INFINITY 2)
	Papel de parafina	
	Esmalte transparente	

Elaboración: (Figueroa & Soria, 2017)

3.1.2 Procedimiento de reactivación de hongos

A partir de las cepas colectadas y almacenadas en el laboratorio de Micología Clínica, se realizó la reactivación empleando la técnica de repique en medios nutritivos y que faciliten la esporulación como el agar avena y papa dextrosa (Rezusta, 2011) para hongos filamentosos y agar sabouraud para levaduras. El gran contenido de glucosa y bajo pH del medio ayudó al crecimiento selectivo de los hongos evitando de esta manera la contaminación por bacterias. Esta técnica nos permitió recuperar las cepas que fueron almacenadas en el laboratorio de Micología Clínica, mediante la extracción de un borde de la colonia que contenía micelios o levaduras respectivamente el cual fue sembrado en el agar.

3.1.3 Identificación macroscópica y microscópica de los hongos filamentosos y levaduras

Para el estudio de los hongos filamentosos y levaduras de importancia clínica se realizó la identificación de cada especie, mediante la descripción macroscópica de la colonia y la identificación de las estructuras microscópicas de los hongos, como podemos ver los **Anexos 5-6.**

3.1.3.1 Identificación macroscópica

La identificación macroscópica de hongos filamentosos y levaduras de importancia clínica se realizó a partir de la observación de las colonias fúngicas ya desarrolladas, y con la ayuda de atlas y micologías médicas se describió el color, forma y aspecto de cada colonia.

3.1.3.2 Identificación microscópica

La identificación microscópica de hongos filamentosos se realizó a partir de montajes en azul de lactofenol por medio de las técnicas de cinta adhesiva y microcultivo, además de la utilización de ácido láctico para hongos dematáceos, las cuales permitieron la identificación de las estructuras fúngicas.

Para la identificación microscópica de levaduras como técnica preliminar se realizó la tinción de Gram sobre un montaje en placa de cada levadura con el fin de asegurar la pureza de la cepa, posteriormente se emplearon técnicas como las pruebas fisiológicas y dentro de estas el tubo germinal que permite diferenciar las especies de *Candida albicans/Candida dubliniensis* de las no *albicans*, y su confirmación a través de la técnica de clamidosporas que a través de la formación de clamidoconidios nos permitió diferenciar *Candida albicans* de las no *albicans*, el uso del API 20 C AUX mediante la fermentación de hidratos de carbono contribuyó a la identificación de todas las especies de levaduras y la identificación de *Cryptococcus neoformans* a través de la tinción de tinta china visualizando la cápsula de polisacárido de la levadura (Ministerio de Salud Perú, 2007).

➤ Identificación microscópica de hongos filamentosos

Para la identificación microscópica de hongos filamentosos se emplearon las técnicas de cinta adhesiva y microcultivo.

– Técnica de cinta adhesiva

Esta técnica fue una de las más utilizadas por conservar las estructuras originales de las esporas e hifas y se la trabajó como primer indicio en determinar el género y especie de los hongos ya sembrados. La técnica se realizó a partir de la obtención de conidios mediante la cinta adhesiva que posteriormente se colocó sobre un portaobjetos con una

gota de azul de lactofenol y se procedió a la visualización con el objetivo 40X las estructuras microscópicas del hongo en estudio.

– **Técnica de micro-cultivo**

Uno de los métodos más precisos y que permitió observar las estructuras fúngicas *in situ* es el microcultivo; en el cuál se sembró el hongo alrededor de una capa de agar avena en forma circular que estuvo sobre una caja del mismo agar, se cubrió con una placa cubre objetos y posteriormente se incubo a temperatura ambiente por aproximadamente 7 días, en una placa portaobjetos se colocó una gota de azul de lactofenol o ácido láctico (hongos dematáceos) y se colocó la placa cubreobjetos, posteriormente se observó con el objetivo 40X todas sus estructuras microscópicas; dicha identificación fue apoyada en atlas y micologías médicas.

➤ **Identificación microscópica de levaduras**

Para la identificación de levaduras se realizaron las técnicas de tubo germinal, la técnica para determinar la producción de clamidosporas, perfil de asimilación de azúcares y la tinción de tinta china.

– **Tinción Gram**

La tinción de Gram es una técnica preliminar para la identificación de levaduras que nos permitió constatar la pureza de la cepa. Para la tinción se tomó un inóculo con la punta del asa redonda y se mezcló sobre una gota de agua destilada en una placa porta objetos dejando secar a temperatura ambiente por 5 min. Posteriormente se fijó la placa al fuego del mechero y se realizó la tinción como se observa en la **Tabla 5**.

Tabla 5

Procedimiento para la tinción de Gram.

Reactivos	Tiempo
Cubrir el inóculo con cristal violeta	
	Dejar 1 min
Lavar la placa con abundante agua	
Cubrir el inóculo con lugol	Dejar 1 min
Lavar la placa con abundante agua	
Cubrir con alcohol cetona	Dejar 30 seg
Lavar la placa con abundante agua	
Cubrir el inóculo con safranina	Dejar 1 min
Lavar la placa con abundante agua	
Dejar secar y visualizar al microscopio con el lente objetivo de 40X para enfocar y 100X con aceite de inmersión para identificar.	

Elaboración: (Figuroa & Soria, 2017)

– ***Técnica de tubo germinal***

La técnica de tubo germinal nos permitió diferenciar las especies de *Candida albicans/Candida dubliniensis* de las no *albicans*. Para esta técnica se suspendió un inóculo de la cepa del género *Candida* con la ayuda de un asa de platino esterilizada en 200 µl de suero humano y se incubó a 37°C por 2 horas. Se colocó una gota de esta suspensión en una lámina porta objetos y una lámina cubre objetos sobre la misma. Su posterior visualización al objetivo de 40X nos permitió diferenciar las especies de *Candida*

albicans de las no *albicans*, mediante el desarrollo de una estructura tubular a partir de la levadura (Ministerio de Salud Perú, 2007).

– ***Técnica de identificación de clamidosporas***

En la técnica de identificación de clamidosporas se utilizó un medio pobre como el Agar Harina de Maíz. Con ayuda de una aguja de inoculación o asa redonda esterilizada se inoculó atravesando el agar una parte de la colonia y se colocó un cubre objetos sobre el inóculo, incubándola a 28°C por 24 a 72 horas en aerobiosis. Posteriormente se visualizó al microscopio óptico con el objetivo de 40X la formación de esporas asexuales con paredes gruesas refringentes denominadas clamidosporas (Duarte, 2009).

– ***Perfil de asimilación de azúcares***

El perfil de asimilación de azúcares se basó en el auxonograma de carbohidratos que nos permitió diferenciar las especies de levaduras más frecuentes, a partir de 19 ensayos 0, D-GLUCosa, GLYCerol, 2-ceto-Gluconato cálcico, L-aARAbinosa, D-XYLosa, ADOnitol, XyLiTol, D-GALactosa, INOsitol, D-SORbitol, Metil- α D-Glucopiranosida, N-Acetil-Glucosamina, D-CELLobiosa, D-LACtosa (origen bovino), D-MALtosa, D-SACarosa, D-TREhalosa, D-MeLeZitosa, D-RAFinosa. La lectura de estas reacciones se las realizó por comparación con los testigos de crecimiento y la identificación se obtuvo con la ayuda del catálogo analítico **Ver Anexo 6**. Para estos perfiles de asimilación de azúcares se utilizó un sistema comercial de identificación como es el API 20C AUX (método manual) (BIOMÉRIEUX, 2010).

➤ ***Técnica de tinta china para la identificación de *Cryptococcus neoformans****

La tinta china es una técnica para identificación de *Cryptococcus neoformans*, en la que se mezcló parte de la colonia con una gota de tinta china y se visualizó con el objetivo de 10 X y 40X. Se evidenció la presencia de *Cryptococcus* mediante la visualización de un halo claro y grueso alrededor de la levadura que hace referencia a la cápsula que es propia de esta levadura (Ministerio de Salud Perú, 2007).

3.2 Codificación y almacenaje

La información obtenida se organizó en una hoja electrónica para facilitar el análisis de la información como podemos ver en los **Anexo 10-11**. A las cepas de hongos que fueron identificadas y foto documentadas se las codificó (códigos numéricos y alfanuméricos) para que en el futuro el personal del laboratorio encuentre con mayor facilidad y rapidez las cepas que se encuentran en diferentes métodos de conservación; esta codificación incluye: el código de almacenamiento del hongo, el nombre, el lugar y posición donde se encuentra según el método de almacenamiento y la fecha de almacenamiento como podemos observar en el **Gráfico 1** (Culture & Collection, 2010).

3.2.1 Codificación de almacenaje

Formato de etiquetas para el almacenamiento de hongos filamentosos y levaduriformes, para las técnicas de papel filtro, agua destilada, repique agar-agar y placas, donde la etiqueta 1 corresponde al almacenamiento de placas, la etiqueta 2 corresponde al almacenamiento de hongos levaduriformes en tubos con agua destiladas, la etiqueta 3 corresponde al almacenamiento de hongos filamentosos en papel filtro, y cada uno de ellos colocados en un criovial, la etiqueta 4 corresponde al almacenamiento de levaduras en crioviales, como se puede ver en la **Figura 1**.

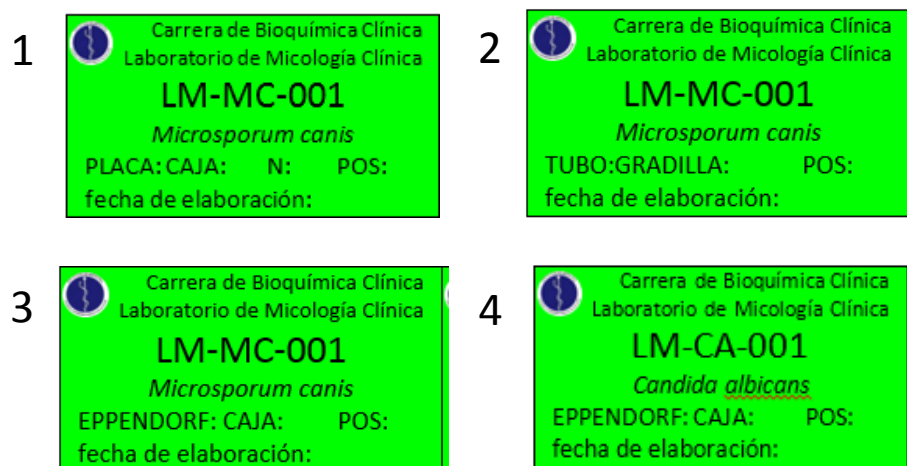


Figura 1. LM: Laboratorio de micología, **Género y especie:** *Microsporium canis* / *Candida albicans*, **001:** el número de aislamientos de la misma especie, **Etiqueta verde:** Corresponde al proceso de codificación y almacenaje, **Fecha de elaboración:** Es la fecha en que se almacena el hongo.

Elaboración: (Figueroa & Soria, 2017)

El almacenaje de las cepas de hongos filamentosos se realizó por los siguientes métodos:

- Método de desecación en papel filtro: Se obtuvieron círculos de papel filtro poro grueso con la ayuda de una perforadora, y se colocaron a autoclavar en cajas Petri de vidrio, por 15 min. Posteriormente se incubaron las cajas a 40°C hasta que estén completamente secas y listas para utilizarse. En la práctica se impregnó en los círculos de papel filtro estéril una solución de células fúngicas y dejó secar a temperatura ambiente en cajas Petri de vidrio por cada hongo en condiciones estériles y se almaceno en crioviales de 2ml como se observa en la **Imagen 5 del Anexo 12** (García, 2001).
- Método de agua destilada estéril (Castellani): Se obtuvieron tubos tapa rosca y se colocó en cada uno de ellos 5ml de agua destilada y se autoclavaron por 15 min. Se colocaron los tubos en gradillas y a refrigeración de 2 a 8°C hasta su uso. Sobre los mismos se suspendieron fragmentos miceliales del hongo en agua destilada estéril, y se lo almaceno a temperaturas (2° a 8°C) como procedimiento propio de la técnica como se observa en la **Imagen 4 del Anexo 12** (López et al., 2012).

El almacenaje de las cepas de hongos levaduriformes se realizó por el siguiente método:

- Repique en agar agar: En crioviales se dispensó 1ml de solución agar agar y se dejó solidificar a temperatura ambiente. Con un asa en punta se tomó una muestra de la levadura y se introdujo verticalmente en el medio realizando la inoculación del mismo.

3.3 Procedimiento operativo estándar

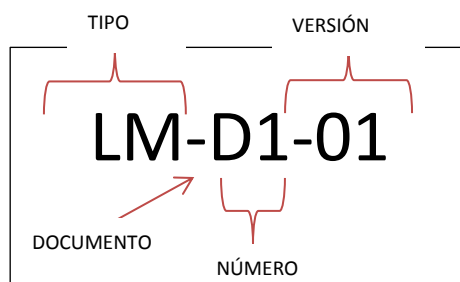
Una vez que los métodos y técnicas para la identificación, conservación, almacenaje e integración de nuevas cepas fueron realizados y se haya garantizado su efectividad al conservar las características fenotípicas propias de los hongos, se elaboraron POE's para cada proceso, de una manera clara y concreta siguiendo los pasos establecidos en el **literal 2.2.11**.

Cada POE consta de un código de identificación como podemos observar en el **literal 3.3.1**, un objetivo general, definiciones puntuales que ayuden al entendimiento del mismo, el personal encargado y el alcance de los POE's, el procedimiento de cada proceso realizado con flujogramas como podemos ver en los **Anexos 1-2-3-4**, etiquetas para codificación de cepas ya sea de ingreso o de almacenamiento si es que el procedimiento

lo requiere y criterios de aceptación - rechazo de cepas como de eliminación de material contaminado.

De igual manera para cada POE se elaboraron registros e instructivos como material de apoyo y control de calidad de procesos **Ver Anexo 7.**

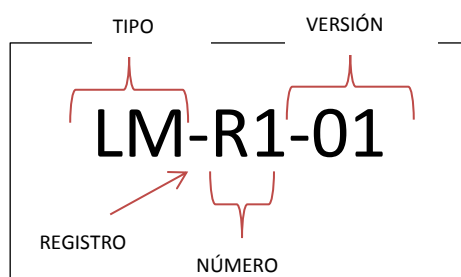
3.3.1 Identificación de documentos y registros.



Laboratorio de micología – documento 1 – versión 01

Figura 2. Formato para la identificación de documentos

Elaboración: (Figueroa & Soria, 2017)



Laboratorio de micología – registro 1 – versión 01

Figura 3. Formato para la identificación de registros

Elaboración: (Figueroa & Soria, 2017)

3.4 Control de calidad de medios y colorantes

Se obtuvo una cepa pura de *Candida albicans* como cepa control con la cual se verificó que los medios de cultivo cumplan con los requerimientos necesarios para el óptimo crecimiento, de tal manera se constató que la cepa control se desarrolló con las características macroscópicas y microscópicas típicas de la especie así mismo se evaluó

que el crecimiento no se vea interrumpido por el crecimiento de otros hongos o bacterias (Meyer & Traynor, 2012).

El control que evito la contaminación por ácaros se lo realizo a través de una continua descontaminación con hipoclorito de sodio en el área en la que se almacenó la micoteca.

3.4.2 Control de esterilidad de medios y agua destilada

Una vez preparados los medios de cultivo y a un número de cajas al azar se puso a incubar a 35°C durante 24 horas. Como criterios de aceptación de los medios es que no debe haber ningún crecimiento ya sea bacteriano como fúngico, si existe crecimiento se rechaza todo los medios realizados (Méndez, 2016).

Dentro del control del agua destilada al igual que los medios de cultivo se colocó una alícuota a incubar, siendo el mismo criterio de aceptación o rechazo.

CAPÍTULO IV

4.1 MARCO LÓGICO

Tabla 6

Matriz de marco lógico

OBJETIVO	INDICADOR	FUENTE DE VERIFICACIÓN	FACTOR EXTERNO O SUPUESTO	ACTIVIDADES INSUMOS
Caracterizar fenotípicamente las cepas de hongos y levaduras clínicos disponibles en el laboratorio de Micología Clínica de la carrera de Bioquímica Clínica.	Se caracterizaron fenotípicamente 66 cepas, de un total de 89 hongos.	Fotografías macroscópicas y microscópicas de cada cepa de hongo *. Registros del total de hongos filamentosos y levaduriformes Ver Anexo 10-11.	Falta de cepas para realizar los aislamientos y caracterización	Fotografías macro y microscópicas. Bases de datos de sus aislamientos**.
Describir las características macroscópicas y microscópicas mediante el uso de técnicas con registro fotográfico y teórico de las cepas.	Se evidenciaron fotos macroscópicas y microscópicas de los 89 hongos.	Fotografías macroscópicas y microscópicas de cada cepa de hongo*. Bases de datos de sus aislamientos**.	Falta de viabilidad de las cepas.	Fotografías macro y microscópicas.
Implementar métodos estandarizados de conservación	Elaboración de POE´s de	POE de conservación y almacenaje con registros e	NA	POE de conservación y

y almacenaje para las cepas de hongos reactivados en el laboratorio de Micología Clínica.	conservación y almacenaje.	instructivos Ver Anexos 4-7.		almacenaje con registros e instructivos ***.
Implantar y sistematizar la información obtenida a partir de las cepas de hongos y levaduras clínicos.	Sistematización de la información de los 89 hongos.	Formato de Excel con información ordenada de cada hongo Ver Anexos 10-11.	NA	Formato de Excel con información ordenada de cada hongo **.
Elaborar procedimientos operativos estándar de conservación, almacenaje e integración de nuevas cepas de hongos y levaduras clínicos del laboratorio de Micología Clínica de la carrera de Bioquímica Clínica.	Elaboración de POE'S de conservación, almacenaje e integración de nuevas cepas.	POE's, instructivos y registros de cada proceso Ver Anexos 1-2-3-4-7.	NA	POE's, instructivos y registros de cada proceso ***.
Evaluar la viabilidad y pureza de las cepas de hongos y levaduras clínicos, almacenados y caracterizados.	Reactivación de las 66 cepas de hongos.	Fotos del crecimiento de cada cepa Ver Anexo 12, Imagen 8.	Falta de viabilidad de las cepas en la comprobación del método.	Fotos del crecimiento de cada cepa.

*Material fotográfico, ** Base de datos en formato de Excel de la información de cada hongo, *** Archivo PDF de POE's, registros e instructivos, NA no aplica.

Elaboración: (Figueroa & Soria, 2017).

4.2 CRONOGRAMA

A continuación se detallan las actividades que se realizaron en este proyecto durante el período de febrero del 2016 a marzo del 2017. Las cuales fueron desarrolladas en las fechas establecidas en la tabla 7 con el cumplimiento de los objetivos planteados al inicio de este proyecto.

Tabla 7

Cronograma de actividades

CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES															
ACTIVIDADES		PERIODO 2016										PERÍODO 2017			
		FEB	MAR	ABR	MAY	JUN	JUL	AGO	SEP	OCT	NOV	DIC	ENE	FEB	MAR
1	Aprobación del Tema y Designación de director	■	■												
2	Redacción del Plan de Trabajo de Titulación	■	■	■	■	■									
3	Aprobación del Plan de Trabajo de Titulación						■								
4	Selección de muestras	■													
5	Recolección de muestras					■	■	■	■						
6	Reactivación de las Muestras		■	■	■	■	■	■	■						
7	Realización de Pruebas de identificación		■	■	■	■	■	■	■						
8	Foto documentación de las muestras		■	■	■	■	■	■	■						
9	Codificación y Almacenamiento de las Muestras									■	■				
10	Realización de los POE´s							■	■	■	■	■			
11	Redacción de la Trabajo de Titulación							■	■	■	■	■	■	■	
12	Presentación y defensa del Trabajo de Titulación														■

4.3 PRODUCTOS OBTENIDOS DE LA TESIS

Como se indica en la tabla 8, de total de 89 cepas caracterizadas 84 (94,38%) pertenecen a hongos filamentosos y 5 (5,62%) a hongos levaduriformes.

Tabla 8

Tabla de la clasificación de hongos aislados

TIPO DE HONGO		
Filamentoso	84	94,38%
Levaduriformes	5	5,62%
Total general	89	100,00%

Elaboración: (Figueroa & Soria, 2017)

En el análisis en la Tabla 9, se puede observar que de los (89) hongos aislados, 84 (94,38%) corresponden a hongos filamentosos, de los cuales 61 (68,54%) fueron identificados macroscópicamente mediante el aislamiento en agar avena y agar papa dextrosa (PDA), y reconocidos microscópicamente a través de las técnicas de cinta adhesiva y microcultivo. Mientras que los 23 (25,56%) restantes competen únicamente a la caracterización microscópica del hongo debido a la falta de cepas para su aislamiento. Y solo existe la conservación por placa. También podemos observar que de los (89) hongos aislados, solo 5 (5,62%) corresponden a hongos levaduriformes, los cuales fueron aislados en agar sabouraud comprobando su pureza a través de la tinción de Gram. De este 5,62% solo 1 (1,12%) corresponde a *Cryptococcus neoformans*, el cual fue identificado mediante la técnica de API 20 C AUX y tinción con tinta china, el otro 1,12% corresponde a *Rhodotorula spp*, que fue identificado únicamente por la técnica de API 20 C AUX y por último se puede observar que las 3 (3,37%) levaduras restantes concuerda con la caracterización género *Cándida* las cuales fueron identificadas a través de las técnicas de API 20 C AUX, tubo germinal y técnica de clamidosporas.

Tabla 9*Técnica de identificación de hongos filamentosos y levaduriformes*

MÉTODO DE IDENTIFICACIÓN		
Filamentoso	84	94,38%
Microcultivo, Cinta adhesiva	61	68,54%
Técnica en placa	23	25,84%
Levaduriforme	5	5,62%
Técnica API	1	1,12%
Técnica API, Tinta China	1	1,12%
Técnica API, Tubo germinal, Clamidosporas	3	3,37%
Total general	89	100,00%

Elaboración: (Figueroa & Soria, 2017)

En la tabla 10, se observa un análisis detallado de los métodos de conservación que se utilizaron para las 89 cepas aisladas. De un total de 84 (94.38%) hongos filamentosos, 61 (68,54%) corresponden a hongos que fueron conservados por los métodos de agua destilada, papel filtro y placas, y 23 (25,84%) que pertenecen a hongos de los cuales no existen cepas aisladas y solo existe la conservación por placa. De los 5 (5,62%) que corresponden a hongos levaduriformes se los conservó por el método de repique en medio agar agar.

Tabla 10*Tabla de los métodos de conservación para hongos filamentosos y levaduriformes*

TIPO DE CONSERVACIÓN		
Filamentoso	84	94,38%
Agua destilada / Papel filtro	61	68,54%
No aplica	23	25,84%
Levaduriformes	5	5,62%
Tubos 2ml agar-agar	5	5,62%
Total general	89	100,00%

Elaboración: (Figueroa & Soria, 2017)

Se detalla en la tabla 11, el número total de placas que existe por cada tipo de hongo, es decir que de los 84 hongos filamentosos existe un total de 159 placas teñidas con azul de lactofenol o ácido láctico indiferentemente, que corresponde a un 96,95%, y para los 5 hongos levaduriformes existen 5 placas en total con un porcentaje de 3,05%.

Tabla 11*Tabla del total de placas entregadas por tipo de hongo*

Número de Placas por hongo			
Filamentoso	84	159	96,95%
Levaduriforme	5	5	3,05%
Total general	89	164	100,00%

Elaboración: (Figueroa & Soria, 2017)

En la tabla 12 se puede observar que de los 61 hongos conservados por el método de agua destilada o método de Castellani, 51 (83,61%) cepas presentaron características de alta viabilidad y pureza ya que hubo desarrollo sin muestra de contaminación; mientras que 10 (16,39%) cepas expresaron crecimientos diferentes a los propios de cada uno de los hongos almacenados, lo que nos indicó que estaban contaminados.

Tabla 12

Tabla de la evaluación de la viabilidad de hongos filamentosos por el método de agua destilada.

AGUA DESTILADA		
Cepa contaminada	10	16,39%
Cepa pura	51	83,61%
Total general	61	100,00%

Elaboración: (Figuroa & Soria, 2017)

En el análisis de la tabla 13 se puede visualizar que de los 61 hongos conservados por el método de papel filtro, 57 (93,44%) cepas presentaron características de pureza y viabilidad ya que no se expresó ningún crecimiento ajeno al de cada hongo, lo que nos indica que las cepas están completamente puras; en las 4 (6,56%) cepas restantes se manifestó una contaminación, indicando un crecimiento impropio de las características macroscópicas de cada hongo.

Tabla 13

Tabla de evaluación de la viabilidad de hongos filamentosos por el método de papel filtro

PAPEL FILTRO		
Cepa contaminada	4	6,56%
Cepa pura	57	93,44%
Total general	61	100,00%

Elaboración: (Figuroa & Soria, 2017)

En la tabla 14 se puede observar que de los 5 hongos levaduriformes conservados por el método de repique en agar – agar, las 5 (100%) cepas presentaron características de viabilidad y pureza ya que no mostraron ningún crecimiento diferente a los propios de cada uno de los hongos almacenados.

Tabla 14

Tabla de evaluación de la viabilidad de hongos levaduriformes por el método de repique en agar agar

AGAR – AGAR		
Cepa pura	5	100,00%
Total general	5	100,00%

Elaboración: (Figueroa & Soria, 2017)

Cada proceso fue realizado siguiendo procedimientos operativos estándar, los cuales fueron apoyados con registros e instructivos, cada uno de ellos mencionados en la tabla 15; los cuales nos permitieron y permitirán al personal encargado de mantener la micoteca y a quienes hagan uso de la misma, llevar un control de calidad de cada proceso asegurando la correcta identificación y conservación de los hongos.

Tabla 15

Lista detallada de los procedimientos operativos estándar, registros e instructivos que corresponden a cada POE

<p>(LM-D1-01) Procedimiento operativo estándar de ingreso de nuevas cepas</p>	<p>(LM-R1-01) Ingreso de nuevas cepas</p>
	<p>(LM-R2-01) Registro de temperaturas</p>
	<p>(LM-R3-01) Instructivo de cultivo y subcultivo de nuevas cepas de hongos filamentosos y levaduriformes</p>
<p>(LM-D2-01) Procedimiento operativo estándar de identificación de hongos filamentosos</p>	<p>(LM-R2-01) Registro de temperatura</p>
	<p>(LM-R4-01) Registro de identificación de hongos filamentosos</p>
	<p>(LM-R5-01) Instructivo de identificación de hongos filamentosos</p>
<p>(LM-D3-01) Procedimiento operativo estándar de Identificación de hongos levaduriformes</p>	<p>(LM-R2-01) Registro de temperaturas</p>
	<p>(LM-R6-01) Instructivo de identificación de hongos levaduriformes</p>
	<p>(LM-R7-01) Registro de identificación de hongos levaduriformes</p>
<p>(LM-D4-01) Procedimiento operativo estándar de Codificación y almacenaje de hongos filamentosos y levaduriformes</p>	<p>(LM-R2-01) Registro de temperaturas</p>
	<p>(LM-R8-01) Instructivo de codificación y almacenaje de hongos filamentosos y levaduriformes</p>

Elaboración: (Figuroa & Soria, 2017)

4.4 CONCLUSIONES

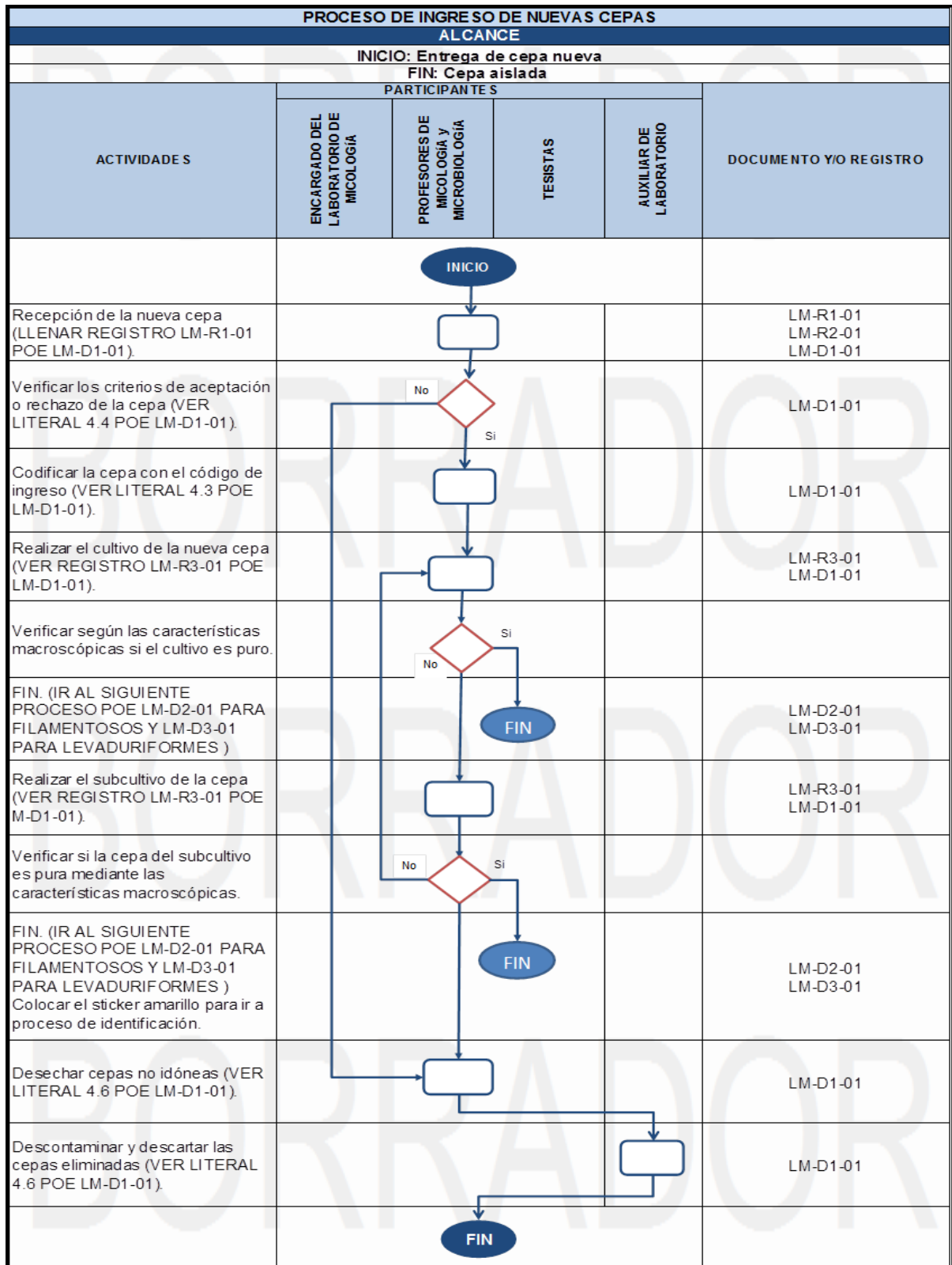
- Las micotecas son centros de conservación de hongos que permiten proteger la integridad propia de los mismos, garantizando a un laboratorio de docencia una herramienta didáctica que mejore las estrategias de enseñanza, optimizando las destrezas del estudiante en la identificación macroscópica y microscópica de una gran variedad de hongos.
- A partir de las 66 cepas obtenidas de los hongos almacenados en el laboratorio de micología clínica, se recuperaron 61 hongos filamentosos de los cuales predominan los hongos oportunistas, y se recuperaron 5 hongos levaduriformes de los cuales todos son patógenos oportunistas.
- La información recolectada de los 89 hongos contiene género y especie, codificación, fecha de almacenamiento y condiciones de siembra en caso de ser necesario y la ubicación de cada uno según su método de conservación y placas, se entrega en formato digital como material de apoyo para el fácil acceso del hongo.
- Gracias a la sistematización y organización de los 89 hongos caracterizados se puede acceder a los mismos como una herramienta de docencia, la cual es entregada en formato digital.
- Después de la evaluación y comprobación de los métodos de conservación para hongos filamentosos se obtuvo el 83,61% de viabilidad por el método de agua destilada y 93,44% por el método de papel filtro concluyendo que el método de papel filtro además de ser accesible permite conservar hongos por periodos mayores a 4 meses reduciendo al mínimo su contaminación.
- En la evaluación de la viabilidad de hongos levaduriformes a partir del método de conservación se obtuvo el 100% de recuperación, por lo que se le considero un medio óptimo para su almacenamiento.

4.5 RECOMENDACIONES

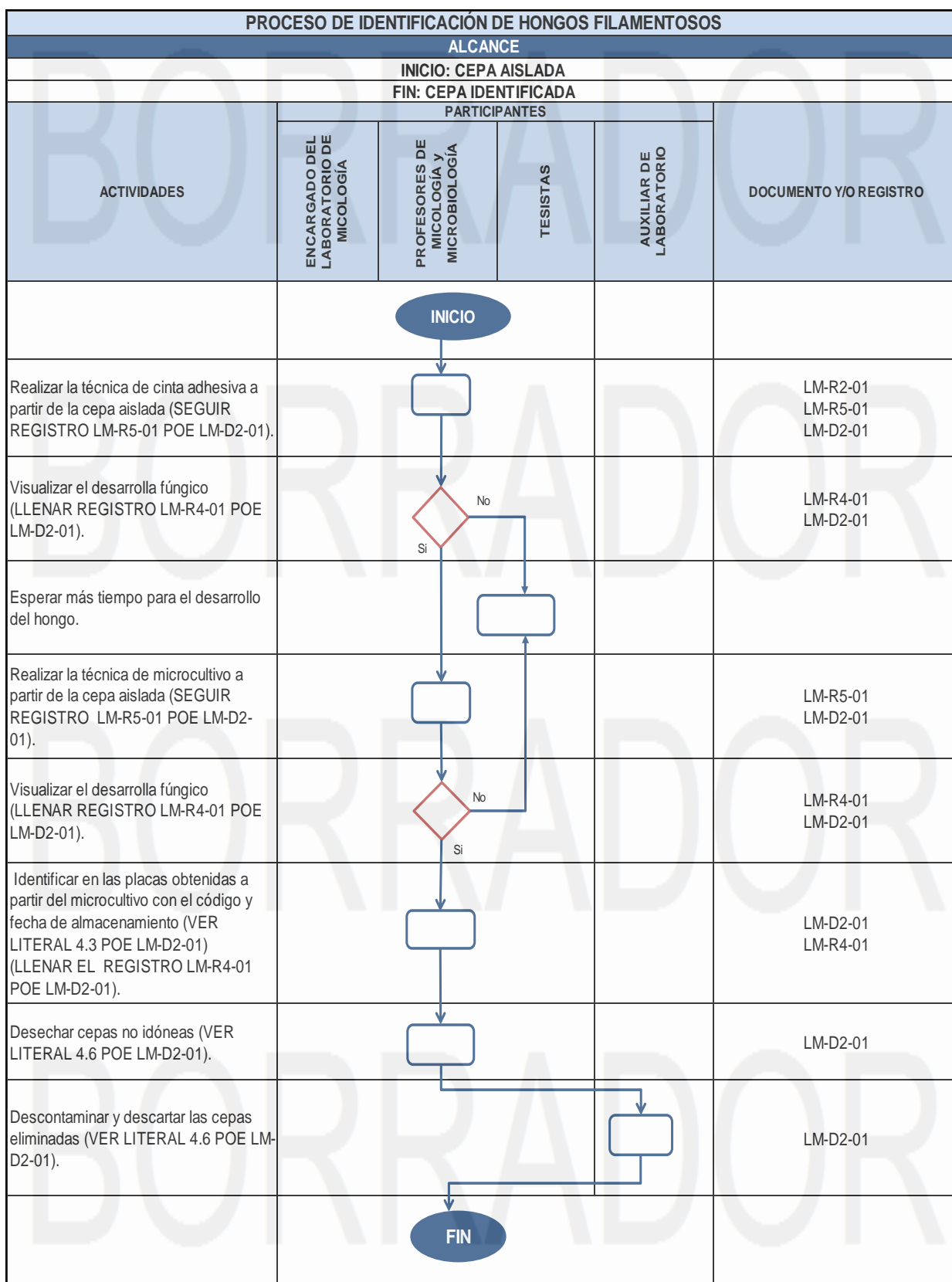
- Posteriormente se recomendaría utilizar métodos de conservación a largo plazo como la liofilización que nos permita preservar cada una de las cepas por un tiempo prolongado a comparación que los métodos a corto plazo utilizados en este proyecto.
- Aplicar métodos moleculares para la identificación genotípica que a largo plazo permitan a la micoteca establecerse como ayuda diagnóstica.
- La aplicación de procedimientos operativos estándar en el manejo de la micoteca ayudaría a mejorar las técnicas y así evitar la contaminación de las cepas garantizando la pureza y desarrollo de la micoteca.
- Con todos los productos obtenidos en este proyecto se recomienda elaborar un atlas que facilite a las personas el acceso a esta micoteca y a la identificación macro/micro de cada una de las cepas almacenadas.

ANEXOS

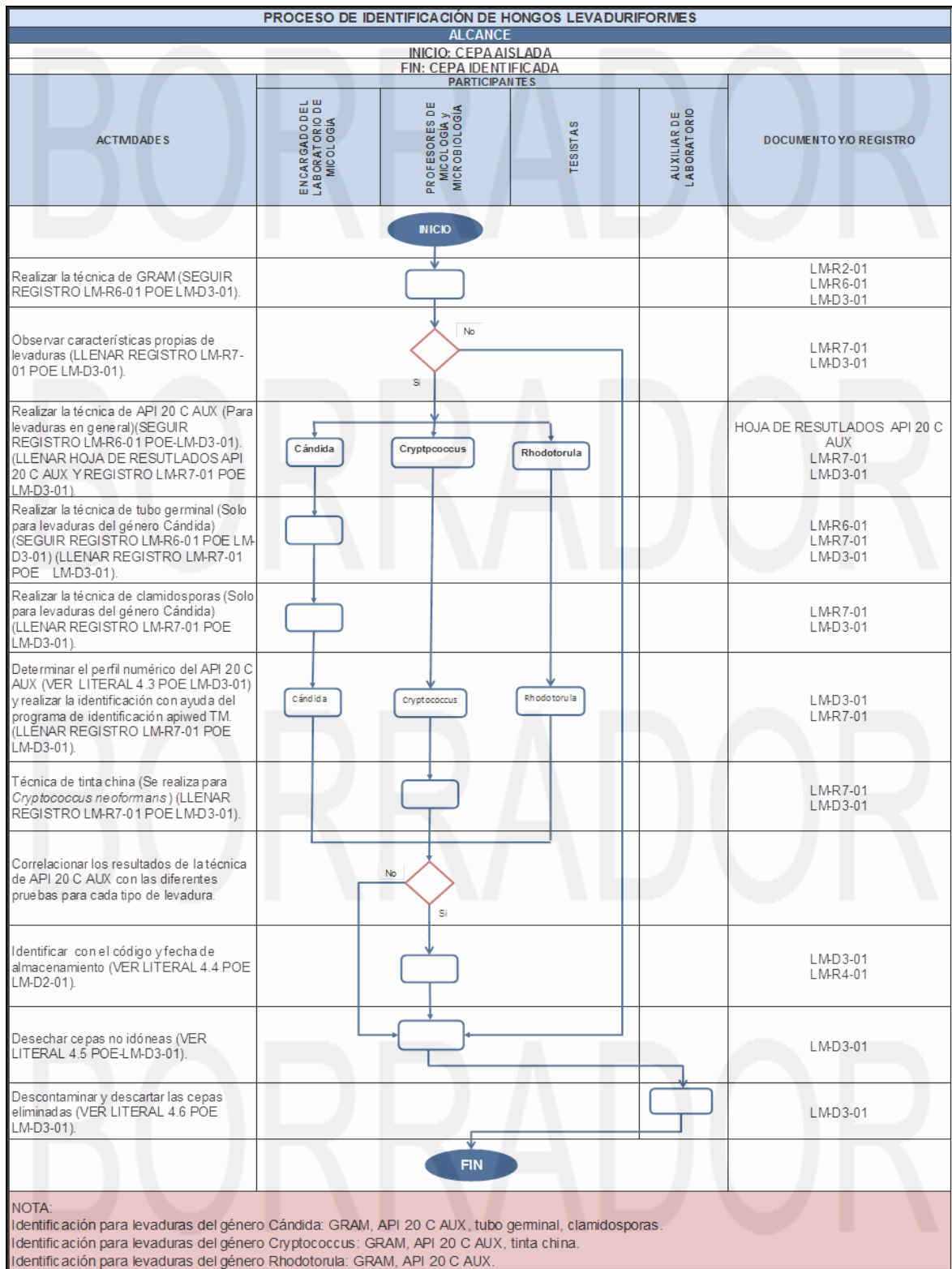
Anexo 1: Proceso de ingreso de nuevas cepas, adjuntado en un segundo CD.



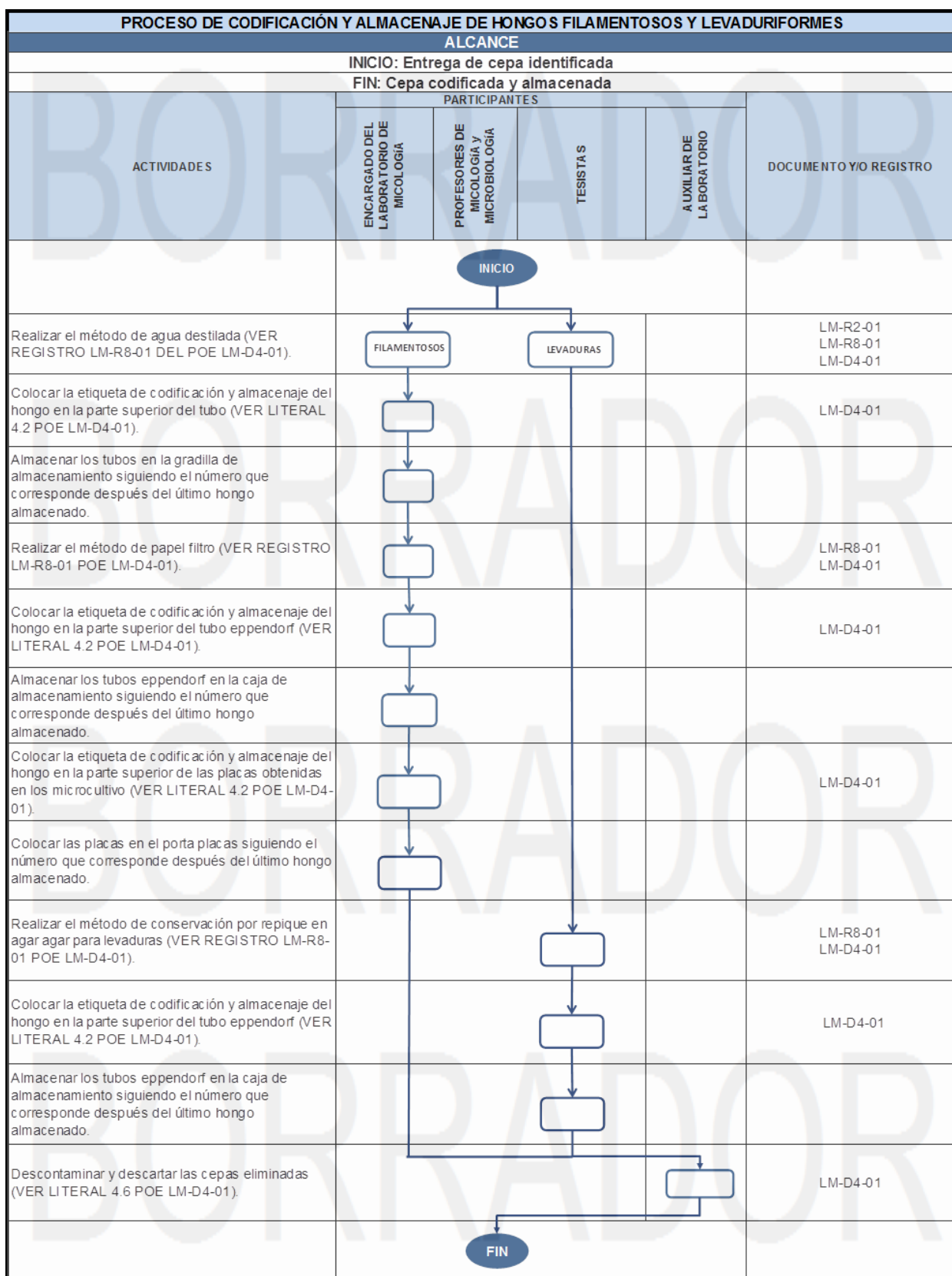
Anexo 2: Proceso de identificación de hongos filamentosos, adjuntado en un segundo CD.



Anexo 3: Proceso de identificación de hongos levaduriformes, adjuntado en un segundo CD.



Anexo 4: Proceso de codificación y almacenaje de hongos filamentosos y levaduriformes, adjuntado en un segundo CD.



Anexo 5: Ejemplo de las fichas técnicas de un hongo caracterizado fenotípicamente.


 FACULTAD DE MEDICINA CARRERA DE BIOQUÍMICA CLÍNICA		REGISTRO DE IDENTIFICACION DE HONGOS FILAMENTOSOS		CÓDIGO: LM-R4 VERSIÓN: 01	
FECHA DE EDICIÓN: 28/04/2017					
Técnico: Alicia Figueroa / Daniela Soria Fecha de inicio: 28/04/2017 Fecha de terminación: 28/04/2017					
NOMBRE DE LA CEPA YA IDENTIFICADA (GÉNERO Y ESPECIE): <i>Alternaria spp.</i>					
TIPO DE MICOSIS: Contaminante					
TAXONOMÍA: Filo: Ascomycota					
CÓDIGO DE INGRESO		LM-NC-004			
CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS	MEDIO DE CULTIVO		PDA		
	COLOR	FRENTE	Grisaseo a negro		
		REVÉS	Negro		
	TEXTURA		Afelpada - terrosa		
	SUPERFICIE		Plana		
	BORDE		Regular		
CRECIMIENTO	LENTO				
	MODERADO		7-10 días		
	RÁPIDO				
CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS	TÉCNICA CINTA ADHESIVA		Micelio septado y pigmentado con conidióforos septados de los cuales nacen macroconidios elipsoidales septados transversal y longitudinalmente, forman cadenas largas.		
	TÉCNICA MICROCULTIVO		Micelio septado y pigmentado con conidióforos septados de los cuales nacen macroconidios elipsoidales septados transversal y longitudinalmente, forman cadenas largas.		
CODIFICACIÓN DE ALMACENAJE		LM-AI-004			
OBSERVACIONES					
RESPONSABLE (NOMBRE Y APELLIDO)		Alicia Figueroa Daniela Soria		COORDENADAS: X 140 ; Y 5	

FOTO MACROSCÓPICA:


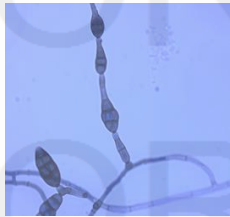


FOTO MICROSCÓPICA:




 FACULTAD DE MEDICINA CARRERA DE BIOQUÍMICA CLÍNICA		REGISTRO DE IDENTIFICACION DE HONGOS FILAMENTOSOS		CÓDIGO: LM-R4 VERSIÓN: 01	
FECHA DE EDICIÓN: 28/04/2017					
Técnico: Alicia Figueroa / Daniela Soria Fecha de inicio: 28/04/2017 Fecha de terminación: 28/04/2017					
NOMBRE DE LA CEPA YA IDENTIFICADA (GÉNERO Y ESPECIE): <i>Curvularia spp.</i>					
TIPO DE MICOSIS: Contaminante					
TAXONOMÍA: Filo: Ascomycota					
CÓDIGO DE INGRESO		LM-NC-021			
CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS	MEDIO DE CULTIVO		PDA		
	COLOR	FRENTE	Grisaseo a negro		
		REVÉS	Negro		
	TEXTURA		Algodonosa		
	SUPERFICIE		Plana		
	BORDE		Regular		
CRECIMIENTO	LENTO				
	MODERADO		7-10 días		
	RÁPIDO				
CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS	TÉCNICA CINTA ADHESIVA		Micelio septado y pigmentado con conidióforos septados de los cuales nacen macroconidios de apariencia curva, septados transversalmente dividiendo cada conidio en alrededor de 4 células.		
	TÉCNICA MICROCULTIVO		Micelio septado y pigmentado con conidióforos septados de los cuales nacen macroconidios de apariencia curva, septados transversalmente dividiendo cada conidio en alrededor de 4 células.		
CODIFICACIÓN DE ALMACENAJE		LM-Cu-021			
OBSERVACIONES					
RESPONSABLE (NOMBRE Y APELLIDO)		Alicia Figueroa Daniela Soria		COORDENADAS: X 138 ; Y 6	

FOTO MACROSCÓPICA:


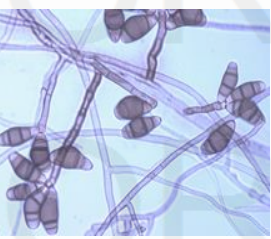




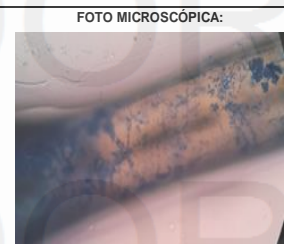
FOTO MICROSCÓPICA:


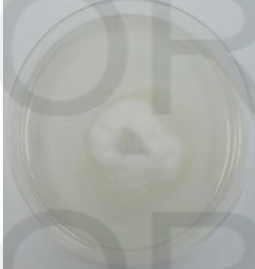
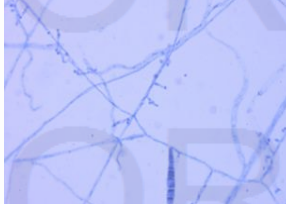


 FACULTAD DE MEDICINA CARRERA DE BIOQUÍMICA CLÍNICA		REGISTRO DE IDENTIFICACION DE HONGOS FILAMENTOSOS		CÓDIGO: LM-R4	
FECHA DE EDICIÓN: 28/04/2017				VERSIÓN: 01	
Técnico: Alicia Figueroa / Daniela Soría					
Fecha de inicio: 28/04/2017 Fecha de terminación: 28/04/2017					
NOMBRE DE LA CEPA YA IDENTIFICADA (GÉNERO Y ESPECIE): <i>Scopulariopsis brevicaulis</i>					
TIPO DE MICOSIS: Contaminante y superficial					
TAXONOMÍA: Filo: Ascomycota					
CÓDIGO DE INGRESO		LM-NC-065			
CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS	MEDIO DE CULTIVO		PDA		
	COLOR	FRENTE	Café con borde blanco		
		REVÉS	Crema con centro café		
	TEXTURA		Tierrosa		
	SUPERFICIE		Plana		
	BORDE		Regular		
	CRECIMIENTO	LENTO			
MODERADO		7-10 días			
RÁPIDO					
CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS	TÉCNICA CINTA ADHESIVA		Hifa septada que presenta conidióforos cortos ramificados de los cuales salen conidios simples que forman hileras. Los conidios maduros son espiculados.		
	TÉCNICA MICROCULTIVO		Hifa septada que presenta conidióforos cortos ramificados de los cuales salen conidios simples que forman hileras.		
CODIFICACIÓN DE ALMACENAJE		LM-SB-065			
OBSERVACIONES					
RESPONSABLE (NOMBRE Y APELLIDO)		Alicia Figueroa Daniela Soría			COORDENADAS: X 151 ; Y 9



 FACULTAD DE MEDICINA CARRERA DE BIOQUÍMICA CLÍNICA		REGISTRO DE IDENTIFICACION DE HONGOS FILAMENTOSOS		CÓDIGO: LM-R4	
FECHA DE EDICIÓN: 28/04/2017				VERSIÓN: 01	
Técnico: Alicia Figueroa / Daniela Soría					
Fecha de inicio: 28/04/2017 Fecha de terminación: 28/04/2017					
NOMBRE DE LA CEPA YA IDENTIFICADA (GÉNERO Y ESPECIE): Piedra blanca					
TIPO DE MICOSIS: Superficial					
TAXONOMÍA: División: Basidiomycota					
CÓDIGO DE INGRESO		LM-NC-056			
CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS	MEDIO DE CULTIVO		NA		
	COLOR		Nodulos blanquecinos adheridos al cuero cabelludo		
	TEXTURA		NA		
	SUPERFICIE		NA		
	BORDE		NA		
	CRECIMIENTO	LENTO	NA		
		MODERADO	NA		
RÁPIDO		NA			
CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS	TÉCNICA CINTA ADHESIVA		Levaduras con presencia de artroconidios, blastoconidios y filamentos.		
	TÉCNICA MICROCULTIVO		NA		
CODIFICACIÓN DE ALMACENAJE		LM-PB-056			
OBSERVACIONES					
RESPONSABLE (NOMBRE Y APELLIDO)		Alicia Figueroa Daniela Soría			COORDENADAS: X 140 ; Y 16



 FACULTAD DE MEDICINA CARRERA DE BIOQUÍMICA CLÍNICA		REGISTRO DE IDENTIFICACION DE HONGOS FILAMENTOSOS		CÓDIGO: LM-R4 VERSIÓN: 01	
FECHA DE EDICIÓN: 28/04/2017					
Técnico: Alicia Figueroa / Daniela Soria					
Fecha de inicio: 28/04/2017 Fecha de terminación: 28/04/2017					
NOMBRE DE LA CEPYA YA IDENTIFICADA (GÉNERO Y ESPECIE): <i>Trichophyton mentagrophytes</i>					
TIPO DE MICOSIS: Cutánea				FOTO MACROSCÓPICA: 	
TAXONOMÍA: División: Ascomycota					
CÓDIGO DE INGRESO		LM-NC-077			
CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS	MEDIO DE CULTIVO		PDA		
	COLOR	FRENTE	Blanco		
		REVÉS	Sin color		
	TEXTURA		Algodonosa		
	SUPERFICIE		Elevada		
	BORDE		Regular		
	CRECIMIENTO	LENTO			
MODERADO		7-10 días			
RÁPIDO					
CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS	TÉCNICA CINTA ADHESIVA		Hifas delgadas y septadas, con presencia de macroconidios en forma de cigarro con pared delgada. Microconidios piriformes o en forma de gota, libres o en cúmulos a lo largo de la hifa.		
	TÉCNICA MICROCULTIVO		Hifas delgadas y septadas, con presencia de macroconidios en forma de cigarro con pared delgada. Microconidios piriformes o en forma de gota, libres o en cúmulos a lo largo de la hifa.		
CODIFICACIÓN DE ALMACENAJE		LM-TM-077		FOTO MICROSCÓPICA: 	
OBSERVACIONES					
RESPONSABLE (NOMBRE Y APELLIDO)		Alicia Figueroa Daniela Soria			
				COORDENADAS: X 145 ; Y 16	

Anexo 6: Caracterización fenotípica de los hongos aislados en el laboratorio de Micología.

CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LOS HONGOS AISLADOS EN EL LABORATORIO DE MICOLOGÍA CLÍNICA DE LA CARRERA DE BIOQUÍMICA CLÍNICA			
CÓDIGO	GÉNERO Y ESPECIE	CARACTERIZACIÓN MACROSCÓPICA	CARACTERIZACIÓN MICROSCÓPICA
LM-AC-001	<i>Absidia cylindrospora</i>	Colonias lanosas Superficie gris Reverso blanquecino	Hifas aceptadas Esporangioforos se presentan sobre los estolones
LM-Ab-002	<i>Absidia spp.</i>	Colonias lanosas Superficie gris Reverso blanquecino	Hifas aceptadas Esporangioforos se presentan sobre los estolones
LM-AS-003	<i>Acremonium sclerotigenum</i>	Colonias de color blanco en el frente y a su revés sin color, de textura terrosa, su superficie es plana con bordes regulares.	Micelio microsifonado, septado e hialino. Sus conidióforos alargados son perpendiculares a las hifas, las cuales tienen en su extremo terminal, conidios agrupados en forma de cabezas.
LM-AI-004	<i>Alternaria spp.</i>	Colonias de color grisáceo a negro en el frente y a su revés color negro, de textura afelpada y terrosa, su superficie es plana con bordes regulares.	Micelio septado y pigmentado con conidióforos septados de los cuales nacen macroconidios elipsoidales septados transversal y longitudinalmente, forman cadenas largas.
LM-Ar-005	<i>Arthographis spp.</i>	Las colonias algodonosas a granular. Desarrollan crestas o pliegues radiales. La coloración es de color blanco a amarillo pálido con un reverso amarillo.	Hifas hialinas y septas. Desarrollan conidióforos generalmente cortos y pueden ser ramificados o no ramificados
LM-AC-006	<i>Aspergillus chevalieri</i>	Colonias de crecimiento muy lento, color verdoso translúcido con contornos irregulares. Reverso naranja a marrón, más intenso en el centro.	Conidióforos de pared delgada, hialinos. Cabezuelas radiadas. Vesículas subsféricas a elipsoidales. Con filídes de mayor o igual tamaño que las metulas. Conidios equinuladas, esféricas.
LM-AF-007	<i>Aspergillus flavus</i>	Colonia aterciopelada Color amarillo a verde Color de reverso dorado a pardo-rojizo.	Conidióforos de longitud variable Conidios con pared áspera Provista de pequeñas espículas Filídes nacen directamente sobre la vesícula
LM-AG-008	<i>Aspergillus glaucus</i>	Colonia color verde con rayos amarillos, y su reverso es color crema, su textura es terrosa con superficie plana y bordes regulares.	Conidióforos anchos, con vesículas en forma redondeada, sin presencia de métula, las filídes cubren completamente la superficie de la vesícula y de ellas salen los conidios redondos u ovals.
LM-AN-009	<i>Aspergillus nidulans</i>	Colonias verdosas con zonas amarillas, su reverso es de color rojo oscuro, textura aterciopelada a terrosa con superficie plana y bordes regulares.	Conidióforo largo, con vesículas semiesféricas con métula y filídes que cubren la mitad superior y conidios redondos u ovals.
LM-AG-010	<i>Aspergillus niger</i>	Colonias planas al inicio son algodonosas de color blanco y se tornan terrosas negras, sin pigmento en su reverso, de crecimiento ilimitado.	Conidióforos lisos, de pared gruesa, hialinos o pigmentados. Vesículas subsféricas, ligeramente pigmentadas de amarillo o café claro. Cabezuelas radiadas, biseriadas. Las metulas son del doble del tamaño que las filídes. Conidios esféricas
LM-AT-011	<i>Aspergillus terreus</i>	Colonias de color marrón y de reverso color marrón pálido, su textura es aterciopelada a terrosa, superficie plana y bordes regulares.	Conidióforo liso, vesícula con forma de media esfera con métula cilíndrica y largas de las que salen filídes, conidios redondos y lisos.
LM-AP-012	<i>Aureobasidium pullulans</i>	Colonias blancas que pueden hacerse amarillas a roza	Micelios pigmentados con hifas de las que nacen conidios hialinos que una vez sueltos por gemación forman nuevos conidios. Forman artroconidios.
LM-Ce-013	<i>Cephalosporium spp.</i>	Colonias blancas planas de aspecto aterciopelado, con reverso color naranja, pequeñas de superficie plana y bordes regulares.	Hifas cenocíticas, hialinas, delgadas y poco ramificadas, con microconidios abundantes redondas o elípticas.
LM-CG-014	<i>Chaetomium globosum</i>	Unas colonias semicirculares, con bordes irregulares, de aspecto semicéreo y de color blanquecino en los márgenes pero con un característico ennegrecimiento en las zonas centrales	Hifas hialinas, numerosos peritecios globosos y estrellados, con gran cantidad de pelos terminales
LM-Ch-015	<i>Chrysosporium spp.</i>	Colonias planas, de color blanco a beige; con una textura de superficie pulverulenta o granular y bordes irregulares	Las células hialinas unicelulares se producen directamente en las hifas vegetativas por células conidiógenas no especializadas. Las conidias son típicamente piriformes y se forman ya sea intercalares, lateralmente o terminales.
LM-CI-016	<i>Cladosporium spp.</i>	Colonias de color café verdoso que suele tornarse negro con textura terrosa. Bordes regulares y superficie plana.	Hifa septada, con conidióforos largos que producen usualmente dos hileras de conidios ovals uno tras otro.
LM-CC-017	<i>Colletotrichum crassipes</i>	Colonias radiales de color gris sin color en su reverso y con bordes regulares.	Conidióforos reunidos en acérvulas, con cerdas oscuras, conidios rectos o falciformes.
LM-Co-018	<i>Colletotrichum spp.</i>	Colonias grisáceas sin color en su reverso con bordes limitados.	Conidióforos reunidos en acérvulas, con cerdas oscuras, conidios rectos o falciformes.
LM-Cu-019	<i>Cunninghamella spp.</i>	Son colonias de tamaño ilimitado llegan a cubrir toda la caja, en un inicio son blancas, pero mas tarde comienzan a volverse grisáceas; son vellosas-algodonosas. Son de crecimiento rápido de 3 a 4 días.	Micelio macrosifonado, hialino, cenocítico, ramificado, presenta esporangiolos que forman esporangiosporas redondas en forma de flor.
LM-CL-020	<i>Curvularia lunata</i>	Colonias de color grisáceo a negro en el frente y a su revés color negro, de textura algodonosa, su superficie es plana con bordes regulares.	Micelio septado y pigmentado con conidióforos septados de los cuales nacen macroconidios de apariencia curva, septados transversalmente dividiendo cada conidio en alrededor de 4 células.

LM-Cu-021	<i>Curvularia spp.</i>	Colonias de color grisáceo a negro en el frente y a su revés color negro, de textura algodonosa, su superficie es plana con bordes regulares.	Micelio septado y pigmentado con conidióforos septados de los cuales nacen macroconidios de apariencia curva, septados transversalmente dividiendo cada conidio en alrededor de 4 células.
LM-Dr-022	<i>Drechslera spp.</i>	Hongo dematiáceo que al principio son colonias levaduriformes de color negro brillante, posteriormente se tornan filamentosas y aterciopeladas.	Hifas tabicadas con conidióforo y conidios multicelulares tabicados horizontalmente.
LM-EI-023	<i>Emericella indica</i>	Colonias de color verde oscuro con filo blanco, reverso color amarillo o incoloro, de textura aterciopelada. Con bordes regulares.	Cabezas conidiales. Conidióforos de pared lisa, vesículas, métula, fiálides, conidios globosos.
LM-Em-024	<i>Emericella spp.</i>	Colonias de color verde aterciopeladas, con bordes regulares.	Cabezas conidiales. Conidióforos de pared lisa, vesículas, métula, fiálides, conidios globosos.
LM-Ex-025	<i>Exophiala spp.</i>	Colonias de color gris a negro de textura aterciopelada, su pigmento al reverso es de color negro. De bordes regulares.	Hifas septadas dematiáceas, células conidiógenas en forma de botella, Conidios elipsoidales, hialinos que forman acúmulos al final o lados del conidióforo.
LM-FP-026	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	Colonias limitadas, verde oliva, gris a marrón-negro cubierto de un micelio gris y aterciopelado, usualmente planas, que desarrollan una forma convexa, radiadas en ocasiones. Reverso negro con pigmento que se difunde lentamente en el medio.	Hifas septadas, ramificadas, dematiáceas. Conidióforos rectos, dematiáceos. Conidias dematiáceas, de pared delgada en cadenas.
LM-FS-027	<i>Fusarium solani</i>	Colonias blancas, algodonosas, con centro rojizo, reverso color púrpura central, bordes regulares y superficie plana.	Hifas hialinas, septadas con ramificaciones y conidióforos cortos, conidios septados transversalmente en forma de bananos, solos o en grupos pequeños.
LM-Fu-028	<i>Fusarium spp.</i>	Colonias blancas, algodonosas, con centro rojizo, reverso color púrpura central, bordes regulares y superficie plana.	Hifas hialinas, septadas con ramificaciones y conidióforos cortos, conidios septados transversalmente en forma de bananos, solos o en grupos pequeños.
LM-GI-029	<i>Gliocladium sp.</i>	Colonias de principio blancas con reverso incoloro, textura algodonosa, superficie plana, bordes irregulares.	Presenta hifa, conidióforos y fialides similares a las de penicillium, con microconidios ovales dispuestos en racimos.
LM-He-030	<i>Helminthosporium spp</i>	Colonias de inicio color grisáceo de textura algodonosa con el tiempo se torna color negro con reverso oscuro. Borde regular.	Hifa septada, conidióforos septados, conidios largos que contienen en su interior de 3 a 4 células.
LM-Ma-031	<i>Madurella spp.</i>	Colonias de color blanco a café de textura afelpada, su reverso es de color café oscuro. Bordes regulares.	Hifas septadas con numerosas clamidosporas. En otros medios produce microconidios en forma de gota.
LM-MA-032	<i>Microascus alvedanis</i>	Colonias de color blanco cuando es joven, grisáceo, parduzco u oliváceo en edad	Conidióforos procedentes de hifas vegetativas aisladamente o en grupos
LM-MC-033	<i>Microascus cinereus</i>	Colonias de color blanco cuando es joven, grisáceo, parduzco u oliváceo en edad	Conidióforos procedentes de hifas vegetativas aisladamente o en grupos
LM-MT-034	<i>Microascus trigonosporus</i>	Colonias de color gris o casi opaca en edad	Hifas vegetativas incoloras a marrón oscuro, anastomosando para formar "cuerdas"
LM-MC-035	<i>Microsporium canis</i>	Colonias algodonosas, ilimitadas, planas, radiadas, de color blanco. Pigmento difusible de color amarillo ocre.	Hifas delgadas, septadas, ramificadas. Macroconidias, pared externa gruesa, rugosa, con septos delgados en forma de huso con un ligero pliegue en el ápice.
LM-MG-036	<i>Microsporium gypseum</i>	Colonias ilimitadas, pulverulentas, de color crema a canela. Reverso de color amarillo a marrón, en ocasiones con tintes rosados, sin producción de pigmento.	Pocas hifas delgadas y septadas. Macroconidias de pared delgada, fusiformes, verrugosas, pueden tener espiculas o equinulas. Escasas microconidias, sésiles, en forma de lágrima
LM-MP-037	<i>Microsporium persicolor</i>	Colonias limitadas de una coloración blanca que con el tiempo se van tornando un color rosa.	Microconidios abundantes, esféricos a piriformes. Los macroconidios son raramente producidos.
LM-MS-038	<i>Monilia sitophila</i>	Colonias de color blanco de inicio y se torna rosada con el tiempo, su reverso es incoloro. Con textura aterciopelada. Bordes regulares.	Micelios septados, conidióforos simples que forman cadenas ramificadas de conidios ovalados. Los micelios viejos forman artrosporas.
LM-MA-039	<i>Monosporium apiospermum</i>	Colonias blancas algodonosas que se tornan grises con el tiempo, micelios aéreos. Bordes irregulares.	Hifa septada, con conidióforos simples y largos de los cuales salen conidios simples o pequeños grupos de conidios.
LM-MC-040	<i>Mucor circinelloides</i>	Colonias de color amarillo a café con un ligero borde blanco, de textura algodonosa, su reverso es incoloro, con bordes regulares. Crecimiento aéreo abundante.	Hifas no septadas, con esporangioforo curvados y ramificados, con esporangiosporas elipsoidales.

LM-Mu-041	<i>Mucor spp.</i>	Colonias algodonosas Color blanco al principio, luego se torna de un color gris Color del reverso blanquecino	Hifas septadas Esporangioforo largos Esporangios redondos, terminales Esporas redondas o ligeramente oblongas Carece de rizoides y estolones
LM-My-042	<i>Mycotypha spp.</i>	Colonias densas, que se toman de un color gris a negro. Color del reverso es blanquecino	Produce un esporangioforo no ramificado, con una vesícula típicamente alargada, recubierta de esporangiolos.
LM-MD-043	<i>Myxotrichum deflexum</i>	Colonias blancas de textura algodonosa Color de reverso amarillento o marrón	Hifas de paredes gruesas y bien definidas presentan un micelio vegetativo y la formación de apéndices, presentan un color marrón, ricamente ramificado en un ángulo recto, o amarillento, con recta o curvada en forma de un garfio apéndices cortos ausente conidios.
LM-My-044	<i>Myxotrichum spp.</i>	Colonias blancas de textura algodonosa Color de reverso amarillento o marrón	Hifas de paredes gruesas y bien definidas presentan un micelio vegetativo y la formación de apéndices, presentan un color marrón, ricamente ramificado en un ángulo recto, o amarillento, con recta o curvada en forma de un garfio apéndices cortos ausente conidios.
LM-MS-045	<i>Myxotrichum stipitatum</i>	Colonias gricaseas con un ligero borde blanco, presenta una textura aterciopelada. Color del reverso de amarillento	Hifas de paredes gruesas y bien definidas presentan un micelio vegetativo y la formación de apéndices, presentan un color marrón, ricamente ramificado en un ángulo recto, o amarillento, con recta o curvada en forma de un garfio apéndices cortos ausente conidios.
LM-OC-046	<i>Ochroconis constricta</i>	La textura se describe como aterciopelada a fieltro o floccosa. El color de la colonia suele ser de color marrón rojizo a marrón chocolate a un gris oliva oscuro. El reverso es de color marrón oscuro a negro. Un pigmento rojo a marrón puede difundirse en el medio.	Ochroconis produce hifas septadas que son hialinas (claro) a marrón claro. Los conidióforos son también hialinos a marrón claro. Surgen erectos y no ramificados de las hifas y generalmente tienen una apariencia nudosa o doblada.
LM-OM-047	<i>Ochroconis mirabilis.</i>	La textura se describe como aterciopelada a fieltro o floccosa. El color de la colonia suele ser de color marrón rojizo a marrón chocolate a un gris oliva oscuro. El reverso es de color marrón oscuro a negro. Un pigmento rojo a marrón puede difundirse en el medio.	Ochroconis produce hifas septadas que son hialinas (claro) a marrón claro. Los conidióforos son también hialinos a marrón claro. Surgen erectos y no ramificados de las hifas y generalmente tienen una apariencia nudosa o doblada.
LM-Oi-048	<i>Oidium spp.</i>	Colonia blanca y lisa de aspecto algodonoso, presenta Bbrdes regulares. Color del reverso es amarillo claro.	Anamorfo con conidióforos hialinos, produciendo conidios simples de cuerpos hialinos, cilíndricos, que no incluyen fibrosinas.
LM-Pa-049	<i>Paecilomyces spp.</i>	Colonia blanca con reversa color hueso, su textura es aterciopelada con superficie plana y bordes regulares.	Hifas hialinas, cenocíticas y delgadas, conidióforo con cabezas ramificadas de forma irregular, fialides de punta afilada con conidios pequeños y redondos.
LM-PV-050	<i>Paecilomyces variotii</i>	Colonias planas de color café-amarillo, su reverso es incoloro, su textura es polvorientas. Bordes regulares.	Hifas hialinas septadas, conidióforos con fialides y métula similar a Penicillium. Los conidios hialinos de forma elíptica, de pared lisa o rugosa que se forman en la punta de fialide en cadenas.
LM-PC-051	<i>Penicillium citrinum</i>	Colonias con una superficie suave y aterciopelada con "pelos blandos". Presenta surcos estrechos, profundos o ranuras radiales - como rayos en una rueda. La colonia madura tiene un color grisáceo central a color gris-anaranjado con una periferia blanca.	Penicillium citrinum produce hifas septadas, hialinas (claras, no pigmentadas). Las conidias son redondeadas a no circulares y son lisas o tienen una superficie finamente rugosa. Los conidios forman cadenas más bien largas.
LM-Pe-052	<i>Penicillium spp.</i>	Colonias color verde claro amarillento, reverso color amarillo intenso radiado, textura terrosa. De superficie plana y bordes irregulares.	Hifas hialinas, septadas, conidióforo ramificado, con presencia de métula, fialides y abundantes fialosporas redondas y pequeñas.
LM-PA-053	<i>Phialophora obovatum</i>	Colonias levemente levantadas, limitadas, grises, verde oscuro a negro, aterciopeladas o algodonosas. Reverso con un pigmento negro difuso.	Hifas septadas, ramificadas, dematiáceas. Conidióforos cortos, que tienen fialides cilíndricas o en forma de botella, con collarettes evidentes en el ápice. Conidias hialinas a café, de pared delgada, ovales o cilíndricas, formando acúmulos en la fialide dando apariencia de un florero.
LM-PG-054	<i>Phoma glomerata</i>	Colonias grisáceas o negras de textura terrosa o granular con reverso color negro. Bordes irregulares.	Hifas septadas. Con picnidios negros grandes algunos con la presencia de ostiolo. Los conidios se forman en los conidióforos dentro del picnidio.
LM-Ph-055	<i>Phoma spp.</i>	Colonias grisáceas o negras de textura terrosa o granular con reverso color negro. Bordes irregulares.	Hifas septadas. Con picnidios negros grandes algunos con la presencia de ostiolo. Los conidios se forman en los conidióforos dentro del picnidio.
LM-PB-056	<i>Piedra blanca</i>	Nódulos blanquecinos adheridos a la vaina del pelo preferentemente de cuero cabelludo, barba, axila y pubis.	Levaduras con presencia de artroconidios, blastoconidios y filamentos.
LM-PN-057	<i>Piedra negra</i>	Nódulos similares a Piedra blanca, ataca al tallo piloso y penetra la cutícula donde prolifera y produce nodulaciones.	Se evidencia la estructura fúngica como son las ascas con sus ascosporas.
LM-PV-058	<i>Pitiriasis versicolor</i>	Infección de la piel caracterizada por manchas hipercrómicas o hipocrómicas en el tronco, cuello y brazos.	Levaduras de forma variable, esféricas, ovoides o cilíndricas, encontradas en agrupaciones.
LM-PB-059	<i>Pseudallescheria boydii</i>	Colonias algodonosas, planas de color blanco que se torna gris con el tiempo, su reverso es de color blanco o grisáceo. Con bordes irregulares.	Hifas hialinas septadas, células conidiogénicas formando pequeños cúmulos en forma de botella. Conidios de color más oscuro, globosas a piriformes.
LM-Pu-060	<i>Purpureocillium spp.</i>	Las colonias son de un color violeta-coloreado	Las clamidosporas están ausentes. Los conidióforos son rectos, teniendo ramas con fialides densamente agrupados.

LM-PV-061	<i>Rhizopus spp.</i>	Colonias algodonosas Color al principio blanco Y luego se torna gris o café amarillento	Hifas septadas y muy escasas Presenta septos Numerosos esporones entre el micelio
LM-SK-062	<i>Sarocladium kiliense</i>	Colonias algodonosas de color blanco, su reverso no presenta color. Tiene bordes definidos.	Hifas dispuestas en sinema, conidióforo largo y plano, microconidios ovales formando grupos.
LM-SA-063	<i>Scedosporium apiospermum</i>	Colonias algodonosas de color blanco en su frente y sin color a su revés, de superficie plana bordes regulares	Conidióforos hialinos, largos o cortos, característico por la presencia de anillos abultados al pie de cada conidia.
LM-SA-064	<i>Scedosporium aurantiacum</i>	Colonias algodonosas de color blanco en su frente y un color amarillento a su revés, de superficie plana bordes regulares con pigmento amarillo.	Conidióforos hialinos, largos o cortos, característico por la presencia de anillos abultados al pie de cada conidia.
LM-SB-065	<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	Colonias de color blanco sin color a su revés, de textura algodonosa con superficie elevada y bordes regulares.	Hifa septada que presenta conidióforos cortos ramificados de los cuales salen conidios simples que forman hileras. Los conidios maduros son espiculados.
LM-SB-066	<i>Scopulariopsis brumpti</i>	Al principio es una colonia blanca y lisa con el tiempo se convierte en café de aspecto terrosa algunas veces con un borde blanco. Su reverso es café claro. Bordes regulares.	Hifa septada, con conidióforos cortos y simples, conidios ovales o redondos formando una cadena, los conidios maduros suelen ser espiculados.
LM-Sc-067	<i>Scopulariopsis spp.</i>	Al principio es una colonia blanca y lisa con el tiempo se convierte en café de aspecto terrosa algunas veces con un borde blanco. Su reverso es café claro. Bordes regulares.	Hifa septada, con conidióforos cortos y simples, conidios ovales o redondos formando una cadena, los conidios maduros suelen ser espiculados.
LM-Se-068	<i>Sepedonium spp.</i>	Colonias de principio color blanco alfelpado, reverso incoloro. Con el tiempo se hace amarilla, superficie plana, bordes regulares.	Hifas septadas, conidioforos simples o dobles. Los conidios suelen ser simples ovalados y espiculados o suelen ser ovalados. Forman estructuras similares a las artrosporas.
LM-SS-069	<i>Sporothrix schenckii</i>	Colonias limitadas, glabras, radiadas, lisas y rugosas, con manchas blancas y café, semejante al cuero de vaca. Reverso gris a café.	Hifas delgadas, septadas, ramificadas. Conidióforos hinchados en la punta correspondiente a las células conidiógenas tipo ampollas que producen conidias en forma de lágrima o en forma de clava, de pared delgada, hialinas, en grupos pequeños, con crecimiento simpodial rodeando a la célula conidiógena en una organización similar a una flor. Otras conidias tienen crecimiento simpodial a lado y lado de una hifa, son hialinas o café, ovaladas, redondeadas o piriformes, de pared gruesa, sésiles.
LM-St-070	<i>Stachybotrys spp.</i>	colonias tienen una textura pulverulenta a algodonosa. La coloración de la superficie es inicialmente blanca pero rápidamente se vuelve negra, pero también puede presentar coloración rosada o naranja en la superficie dependiendo del medio de crecimiento y de las especies. El reverso es también marrón oscuro o negro	Hifas que son septadas y hialinas cuando son jóvenes pero pueden oscurecerse con madurez. Conidióforos también pueden ser hialinos o pueden desarrollar una pigmentación olivácea o oscura. Los conidióforos pueden ser septados, simples o ramificados.
LM-SR-071	<i>Syncephalastrum racemosum</i>	Colonias de crecimiento rápido de color blanco que con el tiempo se torna gris, textura algodonosa, su reverso es color blanco.	Hifas gruesas no septada y los esporangióforos nacen rectos a la hifa, con ramificaciones cortas y curvas que se ensanchan hasta formar una vesícula de color café de los que nacen merosporangios de forma radiada alrededor de la vesícula.
LM-Ta-072	<i>Talaromyces spp.</i>	Colonias de crecimiento rápido, tienen un aspecto de gamuza a suaves, blancas con cabezas conidiales de color verde amarillento. Las colonias se convierten en gris-rosado a marrón con la edad y producen un pigmento difusible de color rojo parduzco a rojo vino.	Conidioforos de color hialinos, de paredes lisas y terminales verticales de tres a cinco metulas, cada uno con tres a siete phialides. Los phialides son acerosa en forma de matraz. Las conidias son globosas, presentan paredes lisas.
LM-TE-073	<i>Thamnidium elegans</i>	Colonias algodonosas Color blanco al principio, luego se torna de un color gris Color del reverso blanquecino	Ramificaciones laterales del esporangióforo que da lugar a esporangiolos de menor tamaño, con una pared resistente que contienen pocas esporangiosporas.
LM-TL-074	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	Colonias lanosas que toman un color verde brillante, también puede ser de color blanco a amarillo. Sus bordes son regulares.	Conidióforos hialinos, ramificados en forma piramidal. Fialides hialinas en forma de botella, se unen a los conidióforos y a ellas conidias redondas o elipsoidales.
LM-Tr-075	<i>Trichoderma spp.</i>	Colonias de inicio blancas que se tornan verdosas, de textura terrosa y bordes regulares.	Conidióforos hialinos, ramificados en forma piramidal. Fialides hialinas en forma de botella, se unen a los conidióforos y a ellas conidias redondas o elipsoidales.
LM-TA-076	<i>Trichohyton ajelloi</i>	Colonias de color crema que puede ir a anaranjado, su reverso puede no tener color. Bordes regulares.	Hifa septada varios macroconidios en forma de cigarro, de paredes gruesas y contiene en su interior de 7 a 11 células.
LM-TM-077	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	Colonias pulverulentas, planas, secas, ilimitadas, color blanco a crema, en forma de estrella. Rara vez produce pigmentos. Reverso ocasionalmente amarillo.	Hifas delgadas y septadas, con presencia de macroconidios en forma de cigarro con pared delgada. Microconidias piriformes o en forma de gota, libres o en cúmulos a lo largo de la hifa.

LM-TR-078	<i>Trichophyton rubrum</i>	Colonias algodonosas, blancas, levantadas, de bordes regulares, secas al inicio de crecimiento, e vuelven rosadas con el tiempo. Reverso pigmento difusible color rojo vino	Abundantes hifas delgadas, septadas, hialinas. Abundantes microconidias piriformes Las macroconidias generalmente están ausentes, cuando se producen son de pared delgada, mínimamente diferenciadas, de tamaño variable, en forma de cigarro.
LM-TS-079	<i>Trichophyton schoenleinii</i>	Colonias algodonosas, blancas, levantadas, de bordes regulares, secas al inicio de crecimiento, e vuelven rosadas con el tiempo.	Macroconidias y microconidias ausentes. Hifas en forma de cuerno, con ramificación dicotómica, con los extremos dilatados (candelabro favico). Abundantes clamidoconidias.
LM-TT-080	<i>Trichophyton tonsurans</i>	Colonias de forma variable, a menudo de apariencia similar a la gamuza, limitada, aterciopelada, de crecimiento radial o irregular, blancas a grises, amarillas o marrones, en ocasiones con un centro rosado o rojo pálido. Reverso tiene pigmento rojo, amarillo o café.	Hifas delgadas, septadas, gruesas, abundantes, largas y de tamaño variable, solitarias o en acúmulos, sésiles, filiformes, en ocasiones globosas; se organizan generalmente con una microconidia en la punta al final de la hifa y el resto de ellas en forma paralela de la hifa. Las macroconidias cuando están presentes, son variables, de pared un poco gruesa, usualmente de forma irregular y redondeadas Clamidoconidias terminales e intercalares son formadas en cantidad abundante.
LM-TV-081	<i>Trichophyton verrucosum</i>	Colonias algodonosas de inicio blancas que pueden tonarse amarillo su reverso puede ser incoloro a amarillo. Levantadas, de bordes regulares.	Hifas con clamidosporas en cadena que terminan con formación de una especie de cuernos. Rara vez se observa la presencia de microconidias en forma de gotas.
LM-TC-082	<i>Trichosporon cutaneum</i>	Suave, viscosa, fácilmente desmontable, blanco-verde al nodo de color marrón claro	Micelio y pseudomicelio presenta artrosporas y blastosporas cuadrados, La mayoría dispuestas como una cadena, pueden estar ausentes en los cultivos de más edad. Las hifas y pseudohifas se encuentran bien desarrolladas, numerosos, fuertemente tabicado
LM-TR-083	<i>Trichothecium roseum</i>	Colonias blancas de textura lanosa al principio que se convierten en rosadas. Sin color en su reverso. Bordes definidos.	Micelio septado, conidióforos largos con conidios en forma de gota con una división transversal que la divide en dos células.
LM-UI-084	<i>Ulocladium spp</i>	Colonias de color grisáceo a negro en el frente y a su revés color negro, de textura afelpada y terrosa, su superficie es plana con bordes regulares.	Colonias de color grisáceo a negro en el frente y a su revés color negro, de textura afelpada y terrosa, su superficie es plana con bordes regulares.
LM-CA-001	<i>Candida albicans 1</i>	Colonias grandes blancas, blandas pálidas, cremosas y lisas.	Forma pseudohifas septadas con racimos de blastosporas redondas y forma clamidosporas terminales. Tubo germinal positivo.
LM-CA-002	<i>Candida albicans 2</i>	Colonias blancas, blandas pálidas, cremosas y lisas.	Forma pseudohifas septadas con racimos de blastosporas redondas y forma clamidosporas terminales. Tubo germinal positivo.
LM-CG-003	<i>Candida parapsilosis</i>	Colonias de color blanco, cremosas, brillantes y rugosas	Blastoconidias pequeñas, redondeadas, de pared delgada, gemantes
LM-Rh-004	<i>Rhodotorula spp</i>	Colonias de color rojo coral-naranja, mucosas y brillantes.	Células redondas u ovals con blastoconidios de base estrecha.
LM-CN-005	<i>Cryptococcus neoformans</i>	Colonias de color blanco- amarillento, mucoides, limitadas y convexas.	En suspensión con tinta china se observan blastoconidios con gemas de la mitad del tamaño y un halo transparente de pared gruesa que es la cápsula.

Anexo 7: Se adjuntan los registros e instructivos que corresponden a los procedimientos operativos estándar adjuntados en el segundo CD.

- Base de datos de hongos filamentosos y levaduriformes
- Características macroscópicas y microscópicas de los hongos Filamentosos y Levaduriformes
- Coordenadas y número de placas
- LM-D1-01 Ingreso de nuevas cepas
- LM-D2-01 Identificación de hongos Filamentosos
- LM-D3-01 Identificación de hongos Levaduriformes
- LM-D4-01 Codificación y Almacenaje de hongos
- LM-R1-01 Registro de ingreso de nuevas cepas
- LM-R2-01 Temperaturas
- LM-R3-01 Instructivo de cultivo y subcultivo de nuevas cepas de hongos filamentosos y Levaduriformes
- LM-R4-01 Registro de identificación de hongos Filamentosos
- LM-R5-01 Instructivo de identificación de hongos Filamentosos
- LM-R6-01 Instructivo de identificación de hongos Levaduriformes
- LM-R7-01 Registro de aislamiento e identificación de hongos levaduriformes
- LM-R8-01 Instructivo de codificación y almacenaje de hongos Filamentosos y Levaduriformes
- 250 fotografías macroscópicas
- 335 fotografías microscópicas

Se adjunta la información recolectada de los 89 hongos contiene el género y especie, codificación, fecha de almacenamiento y condiciones de siembra en caso de ser necesario y la ubicación de cada uno según su método de conservación y placas.

Anexo 8: Lista de Verificación como primera línea del análisis de las condiciones del Laboratorio de Micología y su micoteca.

LISTA DE VERIFICACIÓN DEL LABORATORIO DE MICOLOGÍA				
ITEM	NOMBRE	ESTADO*	OBSERVACIONES	CUMPLIMIENTO SI/NO
REACTIVO	Azul de lactofenol	Regular	El reactivo tenía sedimentos.	NO
	Ácido láctico	NA	El laboratorio no disponía de ese reactivo	NO
MEDIOS DE CULTIVO	Agar papa dextrosa	Bueno	Libre de contaminación	SI
	Agar avena	Bueno	Libre de contaminación	SI
	Agar sabouraud	Bueno	Libre de contaminación	SI
MATERIALES	Asa en L	Bueno	Buenas condiciones	SI
	Asa calibrada	Regular	No disponían de la cantidad necesaria	NO
	Pinzas	Bueno	Buenas condiciones	SI
	Aguja de disección	Bueno	Buenas condiciones	SI
	Caja Petri de vidrio	Bueno	Cantidad necesaria	SI
	Mechero bunsen	Bueno	Buenas condiciones	SI
EQUIPOS	Microscopios ópticos	Regular	Malas condiciones en los lentes ópticos	NO
	Esteriomicroscopio	Bueno	Buenas condiciones	SI
	Incubadora a temperatura ambiente	Malo	No cumple con condiciones de esterilidad	NO
	Incubadora a 37°C	Bueno	Buenas condiciones	SI
	Refrigeradora	Bueno	Buenas condiciones	SI
RECURSO HUMANO	Responsable	Regular	El personal no esta capacitado para el manejo adecuado de la micoteca	NO
MÉTODOS	Documentación	Malo	No existe documentación	NO
	Organización	Malo	No existe organización	NO

*Estado: Bueno, regular, malo

Elaboración: (Figueroa & Soria, 2017)

REF 20 210

076280 - es - 200703

api® 20 C AUX

IVD

Sistema de identificación de levaduras

INTRODUCCIÓN Y OBJETO DEL ENSAYO

La galería API 20 C AUX es un sistema para la identificación precisa de las levaduras que se encuentran más frecuentemente. La lista completa de las especies identificables por el sistema están indicadas en la Tabla de identificación al final de esta ficha técnica.

PRINCIPIO

La galería API 20 C AUX está constituida por 20 cúpulas que contienen sustratos deshidratados y permiten efectuar 19 ensayos de asimilación. Las cúpulas se inoculan con un medio mínimo semi-agar y las levaduras crecen solamente si son capaces de utilizar el sustrato correspondiente.

La lectura de estas reacciones se realiza por comparación con los testigos de crecimiento y la identificación se obtiene con la ayuda del Catálogo Analítico o del software de identificación.

PRESENTACIÓN (caja de 25 tests)

- 25 galerías API 20 C AUX
- 25 cámaras de incubación
- 25 ampollas de API C Medium
- 25 hojas de resultados
- 1 ficha técnica

COMPOSICIÓN

Galería

La composición de la galería API 20 C AUX puede verse en la lista de ensayos que se detalla a continuación:

ENSAYOS	SUBSTRATOS	QTE (mg/cúp.)
Ø	Ninguno	-
GLU	D-Glucosa	1,2
GLY	GL Ycerol	1,2
2KG	2-ceto-Gluconato cálcico	1,2
ARA	L-ARAbinosa	1,2
XYL	D-XYLosa	1,2
ADO	ADOnitol	1,2
XLT	XyLItol	1,2
GAL	D-GALactosa	1,0
IND	INDitol	2,36
SOR	D-SORbitol	1,2
MDG	Metil-α-D-Glucopiranosida	1,2
NAG	N-Acetil-Glucosamina	1,2
CEL	D-CELlobiosa	1,2
LAC	D-LACtosa (origen bovino)	1,2
MAL	D-MALtosa	1,2
SAC	D-SACarosa	1,2
TRE	D-TREhalosa	1,2
MILZ	D-MelLeZiosa	1,2
RAF	D-RAFinosa	1,0

Medio

API C Medium	Sulfato amónico	5 g
7 ml	Fosfato monopotásico	0,31 g
	Fosfato dipotásico	0,45 g
	Fosfato diácido	0,92 g
	Cloruro sódico	0,1 g
	Cloruro cálcico	0,05 g
	Sulfato magnésico	0,2 g
	L-Histidina	0,005 g
	L-Triptófano	0,02 g
	L-Metionina	0,02 g
	Agente gelificante	0,5 g
	Solución de vitaminas	1 ml
	Solución de oligo-elementos	10 ml
	Agua desmineralizada	cap 1000 ml
	pH final: 6,4-6,8 (a 20-25°C)	

A pesar de contener el agente gelificante, no es necesario fundir previamente el API C Medium, ya que se pipetea con la misma facilidad que cualquier medio líquido. Con el fin de llevar los medios a la temperatura ambiente, es preferible sacar las ampollas del refrigerador algunas horas antes de su utilización. No agitar.

REACTIVOS Y MATERIAL NECESARIOS PERO NO SUMNISTRADOS

Reactivos / Instrumentación

- API Suspensión Medium, 2 ml (ref. 70 700) o API NaCl 0,85 % Medium, 2 ml (ref. 20 070)
- Sabouraud Medium (ref. 42 026 o 43 171 o equivalente)
- McFarland Standard (ref. 70 900), punto 2
- Catálogo Analítico API 20 C AUX (Ref. 20 290), programa de identificación apiweb™ (Ref. 40 011), sistema ATB™ o mini API (consultar a bioMérieux)
- RAT Medium [Riz Agar Tween]

Material

- Pipetas o PSipettes
- Protege-ampolla
- Gradillas para ampollas
- Equipo general de laboratorio de bacteriología

PRECAUCIONES DE UTILIZACIÓN

- Para diagnóstico *in vitro* y control microbiológico.
- Exclusivamente para uso profesional.
- Este equipo contiene compuestos de origen animal. El certificado del origen y/o el estado sanitario de los animales no puede garantizar de forma absoluta que estos productos no contienen ningún agente patógeno transmisible, se recomienda manipularlos con las precauciones de uso relacionadas con los productos potencialmente infecciosos (no ingerir, no inhalar).
- Todas las muestras, cultivos de levaduras y productos inoculados deben ser considerados como potencialmente infecciosos y ser manipulados de manera apropiada. Durante toda la manipulación, deben respetarse las normas de asepsia y tomar las precauciones habituales de manipulación para el grupo de bacterias estudiadas; consultar: "CLSI M29-A, Protection of Laboratory Workers From Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline - Revisión en vigor". Para información complementaria sobre las precauciones de manipulación, consultar: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, CDC/NIH - Última edición", o la reglamentación vigente en el país de utilización.

- No emplear los reactivos después de su fecha de caducidad.
- Antes de su utilización, verificar la integridad del envase y de sus componentes.
- No utilizar galerías que hayan sufrido una alteración física: cúpula deformada, ...
- Abrir las ampollas con delicadeza del modo siguiente:
 - Introducir la ampolla en el proteje-ampolla.
 - Sujetar verticalmente el conjunto en una mano (tapón blanco hacia arriba).
 - Presionar a fondo el tapón blanco.



* Modelo 1 :

- Cubrir la parte inclinada del tapón con la primera falange del pulgar.
- Ejercer una presión con el pulgar en la base de la parte inclinada del tapón para romper la extremidad de la ampolla.



* Modelo 2 :

- Ejercer una presión horizontal con el pulgar en la parte estriada del tapón para romper la extremidad de la ampolla.
- Retirar la ampolla del proteje-ampolla y conservarlo para un próximo uso.
- Retirar delicadamente el tapón.

- Los resultados presentados han sido obtenidos mediante la metodología indicada en la presente ficha técnica. Toda desviación de la metodología puede alterar los resultados.
- La interpretación de los resultados del test debe ser realizada teniendo en cuenta un contexto clínico o de otro tipo, el origen de las muestras, los aspectos macro y microscópicos de la colonia y, eventualmente, los resultados de otros tests, especialmente del antifungograma.

CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO

Las galerías y los medios se conservan a 2-8°C hasta la fecha límite de utilización indicada en el envase.

MUESTRAS (RECOGIDA Y PREPARACIÓN)

El API 20 C AUX no debe ser utilizado directamente a partir de muestras de origen clínico o de otro tipo. Los microorganismos a identificar debe aislarse en una primera fase sobre un medio de cultivo apropiado según las técnicas usuales de bacteriología.

MODO DE EMPLEO

Preparación de la galería

- Reunir fondo y tapa de una cámara de incubación y repartir aproximadamente 5 ml de agua destilada o desmineralizada [o cualquier agua sin aditivos ni derivados susceptibles de liberar gases (Ej.: Cl₂, CO₂, etc.)] en los alvéolos para crear una atmósfera húmeda.
- Inscibir la referencia de la cepa en la lengüeta lateral de la cámara. (No inscribir la referencia sobre la tapa, ya que ésta puede resultar desplazada durante la manipulación).
- Retirar la galería de su envase individual y depositarla en la cámara de incubación.

Preparación del inóculo

- Abrir una ampolla de API Suspension Medium (2 ml) o una ampolla de API NaCl 0,85% Medium (2 ml) como se indica en el párrafo "Precauciones de utilización" de la presente ficha técnica, o utilizar un tubo que contenga 2 ml de la misma solución sin aditivo.
- Con la ayuda de una pipeta, extraer una fracción de colonia por aspiración o por toques sucesivos. Utilizar preferentemente cultivos jóvenes (18-24 horas).

- Realizar una suspensión de levaduras de turbidez igual a la del patrón 2 de McFarland. Esta suspensión debe ser utilizada inmediatamente después de su preparación.
- Abrir una ampolla de API C Medium tal y como se indica en el párrafo "Precauciones de utilización" y transferir a él 100 µl de la suspensión anterior. Homogeneizar con la pipeta evitando la formación de burbujas.

Inoculación de la galería

- Llenar las cúpulas con la suspensión obtenida en el API C Medium. Evitar la formación de burbujas colocando la punta de la pipeta sobre la zona lateral de la cúpula. Cuidar que se cree un nivel horizontal o ligeramente convexo pero jamás cóncavo. Las cúpulas parcial o excesivamente llenas son causa de resultados incorrectos.
- Volver a cerrar la cámara de incubación e incubar 48-72 horas (± 6 horas) a 29°C ± 2°C.

LECTURA E INTERPRETACIÓN

Lectura de la galería

Después de 48 horas de incubación, o de 72 horas (si los ensayos, en particular la glucosa no resultan muy claros después de 48 horas), observar el crecimiento de las levaduras comparativamente con la cúpula 0, testigo negativo. Una cúpula con mayor turbidez que la de control nos indica una reacción positiva que ha de ser anotada en la hoja de resultados.

Con el fin de evitar toda contaminación durante una reincubación, levantar la tapa exclusivamente durante el período de lectura.

Ensayo Morfológico

Determinar la presencia de hifas (micelio) o de pseudohifas (pseudomicelio) con la ayuda del medio RAT [Riz Agar Tween].

Depositar una gota de la suspensión obtenida en API Suspension Medium o API NaCl 0,85 % Medium en el medio RAT, o seguir las recomendaciones del fabricante. Este ensayo constituye el nº 21 de la galería. Se considera positivo en caso de evidencia de la presencia de hifas o de pseudohifas.

Interpretación

La identificación se obtiene a partir del perfil numérico.

- Determinación del perfil numérico :
En la hoja de resultados, los tests están separados en grupos de tres y se asigna para cada uno un valor 1, 2 ó 4. Sumando al interior de cada grupo los números que corresponden a reacciones positivas, se obtienen 7 cifras que constituyen el perfil numérico.
- Identificación :
Se realiza a partir de la base de datos (V 4.0).
 - * Con la ayuda del Catálogo Analítico
 - Localizar el perfil numérico en la lista de los perfiles.
 - * Con la ayuda del sistema ATB™, mini API, o del programa de identificación apiweb™
 - Introducir manualmente por teclado el perfil numérico de 7 cifras.



2 7 6 4 7 7 4 *Trichosporon asahii*

CONTROL DE CALIDAD

Las galerías y medios son objeto de controles de calidad sistemáticos durante las diferentes etapas de su fabricación. El usuario puede realizar además un control bacteriológico de los tests de la galería, mediante la cepa: 1. *Candida guilliermondii* ATCC® 6250 con preferencia a una de las cepas siguientes :

2. *Cryptococcus laurentii* ATCC 18803 3. *Candida glabrata* ATCC 15126

ATCC : American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, USA.

	B	GLU	GLY	2KG	ARA	XYL	ADO	XLT	GAL	INO	SOR	MDG	NAG	CEL	LAC	MAL	SAC	TRE	MLZ	RAF
1.	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+
2.	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
3.	-	+	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-

Perfiles obtenidas después de 48 horas de incubación tras su cultivo en agar Sabouraud.

El usuario es responsable de garantizar que el control de calidad haya sido realizado conforme a la legislación local vigente.

LÍMITES DEL ENSAYO

- El sistema API 20 C AUX está destinado a la identificación de las levaduras presentes en la base de datos (ver Tabla de Identificación al final de la presente ficha técnica) y exclusivamente a ellas. No puede utilizarse para identificar otros microorganismos ni para excluir su presencia.
- Sólo se deben utilizar los cultivos puros que contengan un sólo tipo de microorganismo.

RESULTADOS ESPERADOS

Consultar la Tabla de Identificación que se incluye al final de esta ficha técnica para aclarar los resultados esperados en las diferentes reacciones bioquímicas.

PRESTACIONES

Han sido ensayadas 5156 cepas de diversos orígenes, así como cepas de colección pertenecientes a especies de la base de datos :

- 89,7 % de las cepas han sido identificadas correctamente (con o sin ensayos suplementarios).
- 6,1 % de las cepas no han sido identificadas.
- 4,2 % de las cepas se han identificado incorrectamente.

ELIMINACION DE LOS RESIDUOS

Las ampollas de API C Medium no utilizadas pueden ser eliminadas como residuo no peligroso.

Eliminar todos los reactivos utilizados o no utilizados (distintos a las ampollas de API C Medium), así como los materiales de un solo uso contaminados siguiendo los procedimientos relacionados con los productos infecciosos o potencialmente infecciosos.

Es responsabilidad de cada laboratorio la gestión de los residuos y efluentes que produce, según su naturaleza y peligrosidad, garantizando (o haciendo garantizar) su tratamiento y eliminación según las reglamentaciones aplicables.

METODOLOGÍA	p. I
TABLA DE IDENTIFICACIÓN	p. II
BIBLIOGRAFÍA	p. III
CUADRO DE SÍMBOLOS	p. IV

ATCC es una marca utilizada, depositada y/o registrada perteneciente a American Type Culture Collection



bioMérieux® SA
 au capital de 12 029 370 €
 673 620 399 RCS LYON
 69280 Marcy-l'Étoile / France
 Tél. 33 (0)4 78 87 20 00
 Fax 33 (0)4 78 87 20 90
<http://www.biomerieux.com>

bioMérieux, Inc
 Box 15969,
 Durham, NC 27704-0969 / USA
 Tél. (1) 919 620 20 00
 Fax (1) 919 620 22 11



Impreso en Francia

bioMérieux, el logo azul, API, ATB y apiweb son marcas utilizadas, depositadas y/o registradas pertenecientes a bioMérieux SA o a cada una de sus filiales.

Anexo 10: Listado de hongos filamentosos almacenados.

LISTADO DE HONGOS FILAMENTOSOS ALMACENADOS EN LA MICOTECA DE LA CARRERA DE BIOQUÍMICA CLÍNICA

MÉTODO DE ALMACENAMIENTO: Placas.

Caja porta placas 1

Posición	Código	Nombre del Hongo
1	LM-AC-001	<i>Absidia cylindrospora</i>
2	LM-Ab-002	<i>Absidia spp.</i>
3	LM-AS-003	<i>Acremonium sclerotigenum</i>
4	LM-AS-003	<i>Acremonium sclerotigenum</i>
5	LM-AI-004	<i>Alternaria spp.</i>
6	LM-AI-004	<i>Alternaria spp.</i>
7	LM-AI-004	<i>Alternaria spp.</i>
8	LM-Ar-005	<i>Arthorgraphis spp.</i>
9	LM-Ar-005	<i>Arthorgraphis spp.</i>
10	LM-AC-006	<i>Aspergillus chevalieri</i>
11	LM-AC-006	<i>Aspergillus chevalieri</i>
12	LM-AF-007	<i>Aspergillus flavus</i>
13	LM-AF-007	<i>Aspergillus flavus</i>
14	LM-AF-007	<i>Aspergillus flavus</i>
15	LM-AG-008	<i>Aspergillus glaucus</i>
16	LM-AG-008	<i>Aspergillus glaucus</i>
17	LM-AG-008	<i>Aspergillus glaucus</i>
18	LM-AN-009	<i>Aspergillus nidulans</i>
19	LM-AG-010	<i>Aspergillus niger</i>
20	LM-AT-011	<i>Aspergillus terreus</i>
21	LM-AT-011	<i>Aspergillus terreus</i>
22	LM-AT-011	<i>Aspergillus terreus</i>
23	LM-AT-011	<i>Aspergillus terreus</i>
24	LM-AP-012	<i>Aureobasidium pullulans</i>
25	LM-Ce-013	<i>Cephalosporium spp.</i>
26	LM-Ce-013	<i>Cephalosporium spp.</i>
27	LM-CG-014	<i>Chaetomium globosum</i>
28	LM-CG-014	<i>Chaetomium globosum</i>
29	LM-Ch-015	<i>Chrysosporium spp.</i>
30	LM-CI-016	<i>Cladosporium spp.</i>
31	LM-CI-016	<i>Cladosporium spp.</i>
32	LM-CC-017	<i>Colletotrichum crassipes</i>
33	LM-Co-018	<i>Colletotrichum spp.</i>
34	LM-Co-018	<i>Colletotrichum spp.</i>
35	LM-Cu-019	<i>Cunningamella spp.</i>
36	LM-Cu-019	<i>Cunningamella spp.</i>
37	LM-CL-020	<i>Curvularia lunata</i>
38	LM-CL-020	<i>Curvularia lunata</i>
39	LM-Cu-021	<i>Curvularia spp.</i>
40	LM-Dr-022	<i>Drechslera spp.</i>
41	LM-Dr-022	<i>Drechslera spp.</i>
42	LM-Dr-022	<i>Drechslera spp.</i>

Posición	Código	Nombre del Hongo
43	LM-EI-023	<i>Emericella indica</i>
44	LM-EI-023	<i>Emericella indica</i>
45	LM-Em-024	<i>Emericella spp.</i>
46	LM-Em-024	<i>Emericella spp.</i>
47	LM-Ex-025	<i>Exophiala spp.</i>
48	LM-FP-026	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>
49	LM-FP-026	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>
50	LM-FS-027	<i>Fusarium solani</i>
51	LM-FS-027	<i>Fusarium solani</i>
52	LM-Fu-028	<i>Fusarium spp.</i>
53	LM-Fu-028	<i>Fusarium spp.</i>
54	LM-GI-029	<i>Gliocladium sp.</i>
55	LM-GI-029	<i>Gliocladium sp.</i>
56	LM-He-030	<i>Helminthosporium spp</i>
57	LM-He-030	<i>Helminthosporium spp</i>
58	LM-Ma-031	<i>Madurella spp.</i>
59	LM-Ma-031	<i>Madurella spp.</i>
60	LM-MA-032	<i>Microascus alvedanis</i>
61	LM-MC-033	<i>Microascus cinereus</i>
62	LM-MT-034	<i>Microascus trigonosporus</i>
63	LM-MC-035	<i>Microsporium canis</i>
64	LM-MC-035	<i>Microsporium canis</i>
65	LM-MC-035	<i>Microsporium canis</i>
66	LM-MC-035	<i>Microsporium canis</i>
67	LM-MG-036	<i>Microsporium gypseum</i>
68	LM-MG-036	<i>Microsporium gypseum</i>
69	LM-MP-037	<i>Microsporium persicolor</i>
70	LM-MS-038	<i>Monilia sitophila</i>
71	LM-MA-039	<i>Monosporium apiospermum</i>
72	LM-MA-039	<i>Monosporium apiospermum</i>
73	LM-MA-039	<i>Monosporium apiospermum</i>
74	LM-MC-040	<i>Mucor circinelloides</i>
75	LM-Mu-041	<i>Mucor spp.</i>
76	LM-Mu-041	<i>Mucor spp.</i>
77	LM-My-042	<i>Mycotypha spp.</i>
78	LM-My-042	<i>Mycotypha spp.</i>
79	LM-MD-043	<i>Myxotrichum deflexum</i>
80	LM-My-044	<i>Myxotrichum spp.</i>
81	LM-My-044	<i>Myxotrichum spp.</i>
82	LM-MS-045	<i>Myxotrichum stipitatum</i>
83	LM-MS-045	<i>Myxotrichum stipitatum</i>
84	LM-OC-046	<i>Ochroconis constricta</i>
85	LM-OM-047	<i>Ochroconis mirabilis.</i>
86	LM-OM-047	<i>Ochroconis mirabilis.</i>
87	LM-Oi-048	<i>Oidium spp.</i>
88	LM-Oi-048	<i>Oidium spp.</i>
89	LM-Pa-049	<i>Paecilomyces spp.</i>
90	LM-Pa-049	<i>Paecilomyces spp.</i>
91	LM-PV-050	<i>Paecilomyces variotii</i>
92	LM-PV-050	<i>Paecilomyces variotii</i>
93	LM-PC-051	<i>Penicillium citrinum</i>

Posición	Código	Nombre del Hongo
94	LM-Pe-052	<i>Penicillium spp.</i>
95	LM-Pe-052	<i>Penicillium spp.</i>
96	LM-Pe-052	<i>Penicillium spp.</i>
97	LM-PA-053	<i>Phialophora obovatum</i>
98	LM-PG-054	<i>Phoma glomerata</i>
99	LM-PG-054	<i>Phoma glomerata</i>
100	LM-Ph-055	<i>Phoma spp.</i>

Caja porta placas 2

Posición	Código	Nombre del Hongo
1	LM-PB-056	<i>Piedra blanca</i>
2	LM-PN-057	<i>Piedra negra</i>
3	LM-PN-057	<i>Piedra negra</i>
4	LM-PV-058	<i>Pitiriasis versicolor</i>
5	LM-PV-058	<i>Pitiriasis versicolor</i>
6	LM-PV-058	<i>Pitiriasis versicolor</i>
7	LM-PB-059	<i>Pseudallescheria boydii</i>
8	LM-PB-059	<i>Pseudallescheria boydii</i>
9	LM-Pu-060	<i>Purpureocillium spp.</i>
10	LM-PV-061	<i>Rhizopus spp.</i>
11	LM-SK-062	<i>Sarocladium kiliense</i>
12	LM-SA-063	<i>Scedosporium apiospermum</i>
13	LM-SA-063	<i>Scedosporium apiospermum</i>
14	LM-SA-064	<i>Scedosporium aurantiacum</i>
15	LM-SA-064	<i>Scedosporium aurantiacum</i>
16	LM-SA-064	<i>Scedosporium aurantiacum</i>
17	LM-SA-064	<i>Scedosporium aurantiacum</i>
18	LM-SB-065	<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>
19	LM-SB-065	<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>
20	LM-SB-066	<i>Scopulariopsis brumpti</i>
21	LM-Sc-067	<i>Scopulariopsis spp.</i>
22	LM-Sc-067	<i>Scopulariopsis spp.</i>
23	LM-Sc-067	<i>Scopulariopsis spp.</i>
24	LM-Se-068	<i>Sepedonium spp.</i>
25	LM-Se-068	<i>Sepedonium spp.</i>
26	LM-SS-069	<i>Sporothrix schenckii</i>
27	LM-St-070	<i>Stachybotrys spp.</i>
28	LM-SR-071	<i>Syncephalastrum racemosum</i>
29	LM-SR-071	<i>Syncephalastrum racemosum</i>
30	LM-Ta-072	<i>Talaromyces spp.</i>
31	LM-Ta-072	<i>Talaromyces spp.</i>
32	LM-Ta-072	<i>Talaromyces spp.</i>
33	LM-TE-073	<i>Thamnidium elegans</i>
34	LM-TL-074	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>
35	LM-Tr-075	<i>Trichoderma spp.</i>
36	LM-Tr-075	<i>Trichoderma spp.</i>
37	LM-TA-076	<i>Trichohyton ajelloi</i>
38	LM-TA-076	<i>Trichohyton ajelloi</i>
39	LM-TA-076	<i>Trichohyton ajelloi</i>

Posición	Código	Nombre del Hongo
40	LM-TM-077	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>
41	LM-TM-077	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>
42	LM-TM-077	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>
43	LM-TM-077	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>
44	LM-TR-078	<i>Trichophyton rubrum</i>
45	LM-TS-079	<i>Trichophyton schoenleinii</i>
46	LM-TT-080	<i>Trichophyton tonsurans</i>
47	LM-TT-080	<i>Trichophyton tonsurans</i>
48	LM-TT-080	<i>Trichophyton tonsurans</i>
49	LM-TT-080	<i>Trichophyton tonsurans</i>
50	LM-TV-081	<i>Trichophyton verrucosum</i>
51	LM-TV-081	<i>Trichophyton verrucosum</i>
52	LM-TV-081	<i>Trichophyton verrucosum</i>
53	LM-TV-081	<i>Trichophyton verrucosum</i>
54	LM-TC-082	<i>Trichosporon cutaneum</i>
55	LM-TR-083	<i>Trichothecium roseum</i>
56	LM-TR-083	<i>Trichothecium roseum</i>
57	LM-UI-084	<i>Ulocladium spp</i>
58	LM-UI-084	<i>Ulocladium spp</i>
59	LM-UI-084	<i>Ulocladium spp</i>

LISTADO DE HONGOS FILAMENTOSOS ALMACENADOS EN LA MICOTECA DE LA CARRERA DE BIOQUÍMICA CLÍNICA

MÉTODO DE ALMACENAMIENTO: Agua destilada.

Tubera 1

Posición	Código	Nombre del Hongo
1	LM-AC-001	<i>Absidia cylindrospora</i>
2	LM-AS-003	<i>Acremonium sclerotigenum</i>
3	LM-AI-004	<i>Alternaria spp.</i>
4	LM-Ar-005	<i>Arthorgraphis spp.</i>
5	LM-AC-006	<i>Aspergillus chevalieri</i>
6	LM-AF-007	<i>Aspergillus flavus</i>
7	LM-Ce-013	<i>Cephalosporium spp.</i>
8	LM-CG-014	<i>Chaetomium globosum</i>
9	LM-Ch-015	<i>Chrysosporium spp.</i>
10	LM-CI-016	<i>Cladosporium spp.</i>
11	LM-CC-017	<i>Colletotrichum crassipes</i>
12	LM-Co-018	<i>Colletotrichum spp.</i>
13	LM-Cu-019	<i>Cunningamella spp.</i>
14	LM-CL-020	<i>Curvularia lunata</i>
15	LM-Cu-021	<i>Curvularia spp.</i>
16	LM-Dr-022	<i>Drechslera spp.</i>
17	LM-EI-023	<i>Emericella indica</i>
18	LM-Em-024	<i>Emericella spp.</i>
19	LM-Ex-025	<i>Exophiala spp</i>

Posición	Código	Nombre del Hongo
20	LM-FP-026	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>
21	LM-FS-027	<i>Fusarium solani</i>
22	LM-MA-032	<i>Microascus alvedanis</i>
23	LM-MC-033	<i>Microascus cinereus</i>
24	LM-MT-034	<i>Microascus trigonosporus</i>
25	LM-MC-035	<i>Microsporium canis</i>
26	LM-MG-036	<i>Microsporium gypseum</i>
27	LM-MC-040	<i>Mucor circinelloides</i>
28	LM-My-042	<i>Mycotypha spp</i>
29	LM-MD-043	<i>Myxotrichum deflexum</i>
30	LM-My-044	<i>Myxotrichum spp.</i>
31	LM-MS-045	<i>Myxotrichum stipitatum</i>
32	LM-OC-046	<i>Ochroconis constricta</i>
33	LM-OM-047	<i>Ochroconis mirabilis</i>
34	LM-Oi-048	<i>Oidium spp.</i>
35	LM-Pa-049	<i>Paecilomyces spp.</i>
36	LM-PV-050	<i>Paecilomyces variotii</i>

Tubera 2

Posición	Código	Nombre del Hongo
1	LM-PC-051	<i>Penicillium citrinum</i>
2	LM-PO-053	<i>Phialophora obovatum</i>
3	LM-PG-054	<i>Phoma glomerata</i>
4	LM-PB-059	<i>Pseudallescheria boydii</i>
5	LM-Pu-060	<i>Purpureocillium spp.</i>
6	LM-SK-062	<i>Sarocladium kiliense</i>
7	LM-SA-063	<i>Scedosporium apiospermum</i>
8	LM-SA-064	<i>Scedosporium aurantiacum</i>
9	LM-SB-065	<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>
10	LM-SB-066	<i>Scopulariopsis brumpti</i>
11	LM-Sc-067	<i>Scopulariopsis spp.</i>
12	LM-SS-069	<i>Sporothrix schenckii</i>
13	LM-St-070	<i>Stachybotrys sp.</i>
14	LM-SR-071	<i>Syncephalastrum racemosum</i>
15	LM-Ta-072	<i>Talaromyces spp.</i>
16	LM-TE-073	<i>Thamnidium elegans</i>
17	LM-TL-074	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>
18	LM-Tr-075	<i>Trichoderma spp.</i>
19	LM-TA-076	<i>Trichohyton ajelloi</i>
20	LM-TM-077	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>
21	LM-TR-078	<i>Trichophyton rubrum</i>
22	LM-TS-079	<i>Trichophyton schoenleinii</i>
23	LM-TT-080	<i>Trichophyton tonsurans</i>
24	LM-TV-081	<i>Trichophyton verrucosum</i>
25	LM-UI-084	<i>Ulocladium spp</i>

**LISTADO DE HONGOS FILAMENTOSOS ALMACENADOS EN LA MICOTECA DE LA
CARRERA DE BIOQUÍMICA CLÍNICA**

MÉTODO DE ALMACENAMIENTO: Papel filtro.

Caja de almacenamiento de crioviales 1

Posición	Código	Nombre del Hongo
1	LM-AC-001	<i>Absidia cylindrospora</i>
3	LM-AS-003	<i>Acremonium sclerotigenum</i>
4	LM-AI-004	<i>Alternaria spp.</i>
5	LM-Ar-005	<i>Arthorgraphis spp.</i>
6	LM-AC-006	<i>Aspergillus chevalieri</i>
7	LM-AF-007	<i>Aspergillus flavus</i>
13	LM-Ce-013	<i>Cephalosporium spp.</i>
14	LM-CG-014	<i>Chaetomium globosum</i>
15	LM-Ch-015	<i>Chrysosporium spp.</i>
16	LM-CI-016	<i>Cladosporium spp.</i>
17	LM-CC-017	<i>Colletotrichum crassipes</i>
18	LM-Co-018	<i>Colletotrichum spp.</i>
19	LM-Cu-019	<i>Cunningamela spp.</i>
20	LM-CL-020	<i>Curvularia lunata</i>
21	LM-Cu-021	<i>Curvularia spp.</i>
22	LM-Dr-022	<i>Drechslera spp.</i>
23	LM-EI-023	<i>Emericella indica</i>
24	LM-Em-024	<i>Emericella spp.</i>
25	LM-Ex-025	<i>Exophiala spp</i>
26	LM-FP-026	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>
27	LM-FS-027	<i>Fusarium solani</i>
32	LM-MA-032	<i>Microascus alvedanis</i>
33	LM-MC-033	<i>Microascus cinereus</i>
34	LM-MT-034	<i>Microascus trigonosporus</i>
35	LM-MC-035	<i>Microsporum canis</i>
36	LM-MG-036	<i>Microsporum gypseum</i>
40	LM-MC-040	<i>Mucor circinelloides</i>
42	LM-My-042	<i>Mycotypha spp</i>
43	LM-MD-043	<i>Myxotrichum deflexum</i>
44	LM-My-044	<i>Myxotrichum spp.</i>
45	LM-MS-045	<i>Myxotrichum stipitatum</i>
46	LM-OC-046	<i>Ochroconis constricta</i>
47	LM-OM-047	<i>Ochroconis mirabilis</i>
48	LM-Oi-048	<i>Oidium spp.</i>
49	LM-Pa-049	<i>Paecilomyces spp.</i>
50	LM-PV-050	<i>Paecilomyces variotii</i>
51	LM-PC-051	<i>Penicillium citrinum</i>
53	LM-PO-053	<i>Phialophora obovatum</i>
54	LM-PG-054	<i>Phoma glomerata</i>
59	LM-PB-059	<i>Pseudallescheria boydii</i>
60	LM-Pu-060	<i>Purpureocillium spp.</i>
62	LM-SK-062	<i>Sarocladium kiliense</i>
63	LM-SA-063	<i>Scedosporium apiospermum</i>
64	LM-SA-064	<i>Scedosporium aurantiacum</i>

Posición	Código	Nombre del Hongo
65	LM-SB-065	<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>
66	LM-SB-066	<i>Scopulariopsis brumpti</i>
67	LM-Sc-067	<i>Scopulariopsis spp.</i>
69	LM-SS-069	<i>Sporothrix schenckii</i>
70	LM-St-070	<i>Stachybotrys sp.</i>
71	LM-SR-071	<i>Syncephalastrum racemosum</i>
72	LM-Ta-072	<i>Talaromyces spp.</i>
73	LM-TE-073	<i>Thamnidium elegans</i>
74	LM-TL-074	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>
75	LM-Tr-075	<i>Trichoderma spp.</i>
76	LM-TA-076	<i>Trichohyton ajelloi</i>
77	LM-TM-077	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>
78	LM-TR-078	<i>Trichophyton rubrum</i>
79	LM-TS-079	<i>Trichophyton schoenleinii</i>
80	LM-TT-080	<i>Trichophyton tonsurans</i>
81	LM-TV-081	<i>Trichophyton verrucosum</i>

Caja de almacenamiento de crioviales 2

Posición	Código	Nombre del Hongo
1	LM-UI-084	<i>Ulocladium spp</i>

Anexo 11: Listado de hongos levaduriformes almacenados.

LISTADO DE HONGOS LEVADURIFORMES ALMACENADOS EN LA MICOTECA DE LA CARRERA DE BIOQUÍMICA CLÍNICA

MÉTODO DE ALMACENAMIENTO: Placas.

Caja porta placas 3

Posición	Código	Nombre del Hongo
1	LM-CA-001	<i>Candida albicans</i>
2	LM-CA-002	<i>Candida albicans</i>
3	LM-CG-003	<i>Candida glabrata</i>
4	LM-Rh-004	<i>Rhodotorula spp</i>
5	LM-CN-005	<i>Cryptococcus neoformans</i>

LISTADO DE HONGOS LEVADURIFORMES ALMACENADOS EN LA MICOTECA DE LA CARRERA DE BIOQUÍMICA CLÍNICA

MÉTODO DE ALMACENAMIENTO: Agar Agar.

Caja de almacenamiento de criviales 3

Posición	Código	Nombre del Hongo
1	LM-CA-001	<i>Candida albicans</i>
2	LM-CA-002	<i>Candida albicans</i>
3	LM-CG-003	<i>Candida glabrata</i>
4	LM-Rh-004	<i>Rhodotorula spp</i>
5	LM-CN-005	<i>Cryptococcus neoformans</i>

Anexo 12: Metodología para la realización de la micoteca.



Imagen 1: Preparación de agar en cajas monopetri.



Imagen 2: Esterilización de material.



Imagen 3: Procesamiento de muestras.



Imagen 4: Método de conservación agua destilada- hongos filamentosos.



Imagen 5: Método de conservación papel filtro- hongos filamentosos.

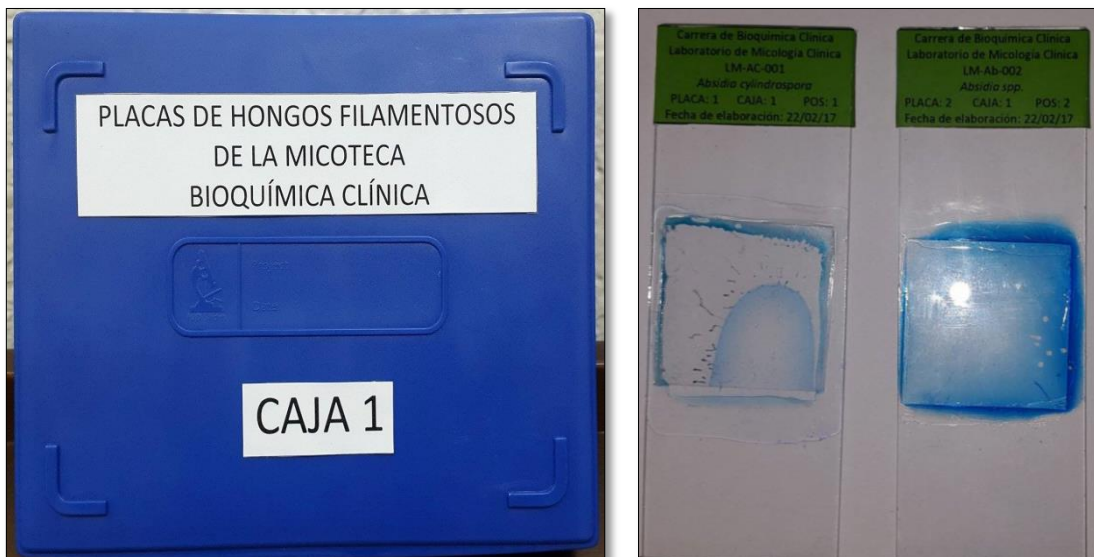


Imagen 6: Método de conservación en placas.



Imagen 7: Codificación de placas.

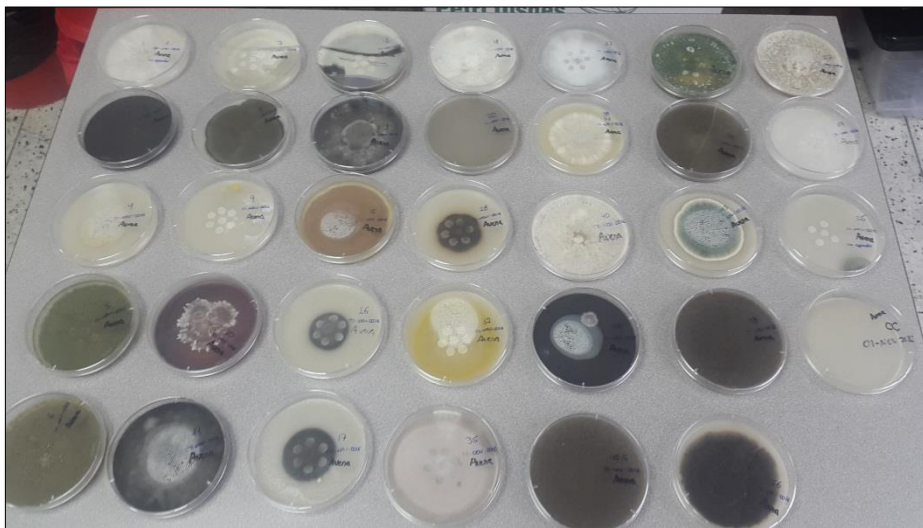


Imagen 8: Comprobación de métodos.

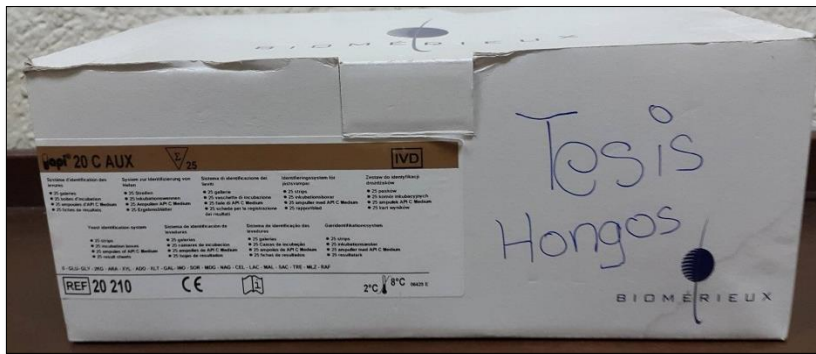


Imagen 9: Reactivo utilizado.

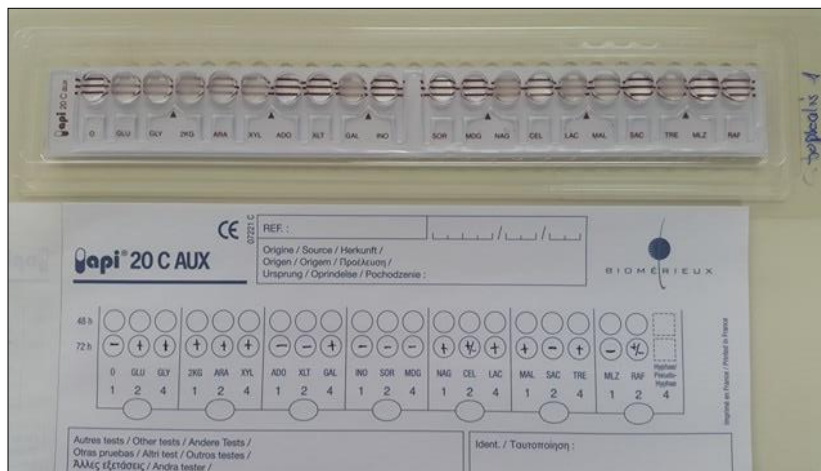


Imagen 10: Api 20 C AUX.

BIBLIOGRAFÍA

- (WFCC), F. M. (2010). Recomendaciones para el establecimiento funcionamiento de colecciones de cultivos de microorganismos. (WFCC).
- AAM, A. A. (2016). *Asociación Argentina de Microbiología*. Obtenido de Revista Argentina de Microbiología: <http://www.aam.org.ar/ram.php>
- Alarcon, D. (2006). *Evaluación de técnicas de conservación para hongos filamentosos y levaduriformes en el cepario de la Pontificia Universidad Javeriana*. Bogota, Colombia : Pontificia Universidad Javeriana.
- ANMAT. (2011). *Organización Panamericana de la Salud* . Obtenido de Portafolio educativo en temas clave en control de la inocuidad de los Alimentos: <http://publicaciones.ops.org.ar/publicaciones/publicaciones%20virtuales/libroVirtualPEIA/pdf/cap6.pdf>
- Arenas, R. (2014). Taxonomía y clasificación. En R. Arenas, *Micología médica ilustrada* (págs. 36 - 42). Mexico: McGraw-Hill Interamericana Editores, S. A. de C. V.
- BioMérieux. (2010). *bioMérieux®*. Obtenido de bioMérieux®: http://biotech.spip.ac-rouen.fr/IMG/pdf/API_20C_Aux.pdf
- Cataldi, L. G. (2011). Manual de procedimiento operativos estándar. 1 - 118.
- Culture, W. F. (2010). Recomendaciones para el establecimiento y funcionamiento de colecciones de cultivos de microorganismos. *Asociación Argentina*, 1 - 46.
- Duarte, A. M. (2009). Modalities of the Germ Tube Test. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 66 - 68.
- Fernández, C. D. (2012). Conservación de cultivos fúngicos de alto riesgo de Histoplasma y Cryptococcus. *Revista Cubana Medica*, 49 - 54.
- Fernández, C. D. (2013). Conservación de cultivos de hongos de importancia médica en agua destilada . *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 361–369.
- Fernández, C. M. (2005). La colección de cultivo de hongo del Instituto de Medicina Tropical “ Pedro Kourí ”: funcione y reto . *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 1 - 7.
- García, M. &. (2001). La conservación de cepas microbianas. *Colección de Cultivos Tipo CECT*, 12 - 16.
- Gato, Y. (2010). Métodos de conservación y formulación de Trichoderma harzianumrifai. *Instituto de Investigación de Sanidad Vegetal*, 189–195.
- González, R. M. (2006). Aseguramiento de la Calidad en las Colecciones de Cultivos Microbianos. 1–30.
- Hernández, S. &. (2014). Selección de un método para la conservación y preservación de Actinomicetos aislados del suelo del jardín botánico de la Universidad de Pereira. *Facultad de tecnología escuela de tecnología química Pereira*.

- Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo. (2008). *Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales España*. Obtenido de NTP:539. Prevención del riesgo biológico en el laboratorio: Trabajo con hongos: https://www.sprl.upv.es/pdf/ntp_539%20laboratorio%20trabajo%20con%20hongos.pdf
- Linares, M., & Solís, F. (2007). Identificación de levaduras. *Asociación Española de Micología*, 10 - 11.
- Maricela Méndez, M. Q. (2016). The quality assessment of culture media is an essential requirement in microbiology laboratories. *A number of processes have been developed to allow comparison of the effectiveness of batch liquid culture media and laboratory prepared solid*.
- Martínez, A. L. (2009). Redalyc.Conservación de cepas de *Candida utilis* en agua destilada estéril. *Instituto Cubano de Investigación de Los Derivados de La Caña de Azúcar*.
- Montes de Oca, N. G. (2008). Establecimiento y desarrollo de la colección de cultivos del Censa. *Salud Anim.*, 17 - 24.
- Morales, M. I. (2007). Actividad desarrollada por la sección de colecciones de cultivos microbianos y otros materiales biológicos de la ATAC. *ATAC*, 1 - 10.
- Panizo, M. R. (2005). Mantenimiento y preservación de hongos en agua destilada y aceite mineral Maintenance and preservation of fungi in distilled water and mineral oil. *Sociedad Venezolana de Microbiología*, 35–40.
- Panizo, M. R.-L. (2015). Redalyc.Micoteca del Instituto Nacional de Higiene “Rafael Rangel”: 60 años preservando la biodiversidad fúngica de interés médico en. *Sociedad Venezolana de Microbiología*, 4–12.
- Rezusta, A. S. (2011). Fundamentos básicos para el diagnóstico micológico. 1–22.
- Salud, M. d. (2007). Manual de procedimientos y técnicas de laboratorio para la identificación de los principales hongos oportunistas causantes de micosis humanas Manual de procedimientos y series de normas técnicas. *MSP*, N.º44.
- Weiland Meyer, P. T. (2012). Guidelines for the Quality Assurance of Medical Mycology culture media. *The Australian Society for Microbiology*, 1–18.