



CORPORACIÓN UNIVERSITARIA
RAFAEL NÚÑEZ
PARA QUE TU DESARROLLO CONTINÚE SU MARCHA

GUÍA DE LABORATORIO DE MICOLOGÍA V SEMESTRE

Lucy Margarita Villafañe Ferrer QF MSc

Facultad de Ciencias de la Salud
Programa de Bacteriología





© **Corporación Universitaria Rafael Núñez**
Institución Universitaria | Vigilada Mineducación
2018
Hecho en Colombia

Rector

Miguel Ángel Henríquez López

Vicerrector General

Miguel Henríquez Emiliani

Vicerrectora Académica

Patricia De Moya Carazo

Vicerrector Administrativo y Financiero

Nicolás Arrázola Merlano

Directora Institucional de la Calidad

Rosario López Guerrero

Directora de Investigación

Judith Herrera Hernández

Directora programa de Bacteriología

Rosana de la Torre Barboza

Director de Biblioteca Miguel Henríquez Castañeda-Cartagena

Luis Fernando Rodríguez L.

Revisión técnica disciplinar

Elayne Flórez Julio

Eliana Buelvas Pereira

Revisión y corrección de estilo

Zarina Durango Herazo

Raúl Padrón Villafañe

Autor

Lucy Villafañe Ferrer



TABLA DE CONTENIDO

	Págs.
PRESENTACIÓN	4
NORMAS GENERALES DE BIOSEGURIDAD EN EL LABORATORIO	5
PLAN DE TRABAJO DEL ESTUDIANTE	7
MATERIALES PARA TODAS LAS CLASES	8
PRÁCTICA No. 1. MEDIOS PARA EL CULTIVO Y AISLAMIENTO DE HONGOS	9
PRÁCTICA No.2. AISLAMIENTO DE HONGOS DEL AMBIENTE	11
PRÁCTICA No. 3. MORFOLOGÍA DE LAS COLONIAS DE HONGOS	13
PRÁCTICA No.4. TÉCNICAS DE MONTAJES MICROSCOPICOS	15
PRÁCTICA No. 5. TÉCNICAS DE SIEMBRA DE COLONIAS	18
PRÁCTICA No. 6. ESTRUCTURAS DE LOS HONGOS	21
PRÁCTICA No. 7. PROCESAMIENTO DE MUESTRAS CLINICAS. EXAMEN DIRECTO.	23
PRÁCTICA No. 8. OBSERVACIÓN MICROSCOPICA DE HONGOS PRODUCTORES DE MICOSIS SUPERFICIALES	26
PRÁCTICA No. 9. OBSERVACIÓN MICROSCOPICA DE HONGOS PRODUCTORES DE MICOSIS SUBCUTANEAS	28
PRÁCTICA No. 10. OBSERVACIÓN MICROSCOPICA DE HONGOS PRODUCTORES DE MICOSIS SISTEMICAS PROFUNDAS Y PROFUNDAS	30
PRÁCTICA No. 11. IDENTIFICACIÓN DE LEVADURAS Y HONGOS LEVADURIFORMES	32
BIBLIOGRAFÍA	



PRESENTACIÓN.

Un saludo de bienvenida para los estudiantes de la asignatura Micología.

La presente guía tiene por objetivo mostrar los recursos y técnicas para la identificación de hongos y diagnóstico de micosis. Se hace énfasis en los procedimientos relacionados con aislamiento, cultivo e identificación microscópica de hongos y micosis.

La metodología utilizada para cada una de las prácticas es clara y sencilla, lo que facilita la comprensión del estudiante.

Es el deseo del autor que los estudiantes consideren a esta guía como un aporte a su formación como bacteriólogos y que encuentren en ésta respuestas a sus inquietudes iniciales en el estudio de la Micología.



NORMAS GENERALES DE BIOSEGURIDAD EN EL LABORATORIO.

- Utilizar siempre los elementos de barrera de protección apropiados según las necesidades: bata, gorro, guantes, tapabocas y gafas etc. Nunca circular con ropa de calle y/o cambiarse de ropa dentro del laboratorio.
- Siempre respetar las señalizaciones de bioseguridad.
- Reportar siempre a su docente los accidentes ocurridos en el laboratorio.
- Lávese las manos vigorosamente antes y después de efectuar un procedimiento.
- Los elementos cortopunzantes como agujas, lancetas y otros deben ser desechados con precauciones para evitar lesiones (utilice siempre el guardián).
- Si padece lesiones exudativas o dermatitis, debe evitar el contacto con los pacientes y con los equipos de trabajo hasta que estas sanen.
- Utilice siempre dispositivos de pipeteo mecánico en el manejo de líquidos y reactivos, nunca bucal.
- Absténgase de comer, beber o fumar en el laboratorio.
- Es responsabilidad de cada estudiante el manejo del reactivo al que tenga acceso. Conozca todos los símbolos de riesgo para el manejo de las sustancias.
- En caso de derrames neutralice, desinfecte y luego limpie el derrame con un material absorbente.
- Nunca debe esterilizar material limpio con contaminado.
- Nunca debe utilizar reactivos y/o sustancias químicas vencidas
- Utilizar adecuadamente los equipos y proporcionarles un mantenimiento conveniente y permanente, si un equipo se contamina con una muestra



biológica, deberá ser descontaminado con hipoclorito de sodio al 7% y luego limpiarlo de acuerdo con las especificaciones del fabricante.

- En caso de rompimiento de un tubo o derrame en la centrifuga apáguela inmediatamente y espere treinta minutos antes de abrirla para evitar la formación de aerosoles.
- Al inicio y al final de una práctica de laboratorio, o después de salpicaduras con sangre u otros líquidos corporales, las superficies de las mesas deberán ser descontaminadas con una solución de hipoclorito de sodio al 7%.
- Toda muestra biológica diferente a orina deberá ser descontaminada con peróxido de hidrógeno al 30%, para luego ser eliminada en bolsas rojas.
- Todo material contaminado deberá ser eliminado en bolsa roja.



PLAN DE TRABAJO DEL ESTUDIANTE

1. Previamente a la práctica, lea los procedimientos que se van a realizar y prepare todos los aspectos teóricos correspondientes, junto con los materiales y/o muestras necesarias para la ejecución de la misma.
2. Anote cuidadosamente sus resultados: el examen de la práctica, no solo se limitará a la información proporcionada por el manual o el docente sino también por sus propias observaciones, investigaciones y deducciones.
3. Asegúrese que la superficie del mesón esté limpia y seca antes de comenzar la práctica.
4. En la mesa de trabajo solo debe estar el material necesario para la realización de la práctica. Debe estar limpio y ordenado.
5. Asegúrese de marcar adecuadamente las láminas, tubos, cajas y/o cultivos.
6. Tome todas las precauciones necesarias (evite contacto con ojos, boca y el resto del cuerpo) al momento de trabajar con microorganismos. Recuerde que los microorganismos con los que va a trabajar son patógenos.
7. Practique varias veces el procedimiento y, en caso de dudas, pregunte a su docente.
8. Anote y/o dibuje todo los fenómenos observados y los resultados obtenidos para una mejor realización del informe de laboratorio.
9. Al terminar limpie la zona de trabajo descartando el material que no necesite. Descarte los materiales usados en los sitios destinados para esto. No deje material contaminado en las mesas de trabajo al finalizar la práctica.
10. Limpie el microscopio antes y después de la práctica. Recuerde que este equipo es fundamental para su trabajo. **¡¡¡¡¡Cuidelo!!!!!!**.
11. Siempre tenga en cuenta las normas de bioseguridad.



MATERIALES PARA TODAS LAS CLASES

1. Láminas (portaobjetos).
2. Laminillas (cubreobjetos).
3. Lápiz de cera o marcador cristalográfico.
4. Cinta de enmascarar.
5. Colores.
6. Palillos.
7. Guantes desechables.
8. Mascarilla o tapabocas.
9. Gafas de protección.
11. Toalla pequeña.
12. Papel de arroz.
13. Muestra solicitada.
14. Guías de laboratorio previamente estudiadas.

INDISPENSABLES EN TODOS LOS LABORATORIOS



PRÁCTICA No. 1. MEDIOS PARA EL CULTIVO Y AISLAMIENTO DE HONGOS

I. INTRODUCCIÓN

Para el crecimiento in vitro, a los hongos se les debe proporcionar un sustrato lo más similar posible al medio ambiente en que normalmente se desarrolla; así tenemos, entonces, la gran variedad de medios de cultivo como: agar arroz, agar Sabouraud, agar Harina de maíz, agar papa - glucosa, medio Czapeck- dox, entre otros.

En el presente laboratorio se proporcionan las pautas al estudiante para la preparación de medios de cultivo.

II. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Conocer los componentes y fundamentos de los medios de cultivo que se utilizan con frecuencia para el cultivo y aislamiento de los hongos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

A partir de esta práctica el estudiante estará en capacidad de:

1. Conocer la clasificación de los medios de cultivo para hongos.
2. Aprender la preparación de los medios de cultivo que se utilizarán en las posteriores prácticas.

FUNDAMENTO TEÓRICO

En la identificación de los hongos la observación de la reproducción (arreglo y disposición de los conidios) es la base de la taxonomía, por eso se debe prestar atención al medio en el cual se desarrolla el microorganismo.

El éxito del aislamiento primario del hongo, identificación y esporulación de los que difícilmente la realizan, depende del cuidado que se tenga en la preparación del medio de cultivo y conservación.

III. REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS

- Agar Sabouraud.
- Agar Harina de maíz.



- Agar Czapeck dox.
- Agar Sabouraud con antibióticos.
- Agar papa – glucosa (PDA).
- Agua destilada.
- Balanza analítica.
- Espátulas.
- Estufas.
- Cinta de enmascarar.
- Cinta para esterilización.
- Agua destilada.
- Erlenmeyer de 500 ml.

IV. MUESTRA

No aplica.

V. PROCEDIMIENTO

1. Los estudiantes se organizarán en grupos para la realización de la práctica. Posteriormente, el docente le asignará a cada grupo la preparación de un medio de cultivo.
2. Para la preparación de los medios, el estudiante debe tener en cuenta el procedimiento especificado por el fabricante.
3. Finalmente, los medios serán esterilizados en autoclave a 15 libras de presión durante 15 minutos.

VI. TALLER DE PREGUNTAS

1. Investigar la utilidad de cada uno de los componentes de los medios de cultivo preparados.
2. Definir:
 - a. Heterótrofo.
 - b. Autótrofo.
 - c. Quimiótrofo.
 - d. Saprófito.
3. ¿Cuál es la diferencia entre esterilizar y desinfectar?



PRÁCTICA No. 2.

AISLAMIENTO DE HONGOS DEL AMBIENTE

I. INTRODUCCIÓN

Existen diferentes técnicas para aislar hongos del ambiente, técnicas cuantitativas y cualitativas. En el presente laboratorio se describe una técnica cualitativa de aislamiento de hongos del aire, la técnica de deposición gravitacional horizontal o sedimentación en placa, con la que el estudiante podrá describir los hongos presentes en el ambiente analizado.

II. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Conocer un procedimiento de laboratorio para la identificación de hongos del ambiente.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Adquirir destreza en la aplicación de una de las técnicas utilizadas en el estudio fúngico ambiental.
2. Aprender a conocer y diferenciar colonias de hongos ambientales.

III. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

El aire que respiramos es un vehículo importantísimo para la dispersión de los hongos. El aire esparce las esporas, otras estructuras y eventualmente fragmentos de micelio de un número considerable de organismos micóticos que tienen un impacto innegable en la vida del hombre: las exposiciones a partículas de hongos, un fenómeno muy común en los sitios de trabajo, producen desordenes respiratorios, como reacciones inflamatorias agudas y alveolitis alérgicas.

IV. REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS

- Cajas de Petri Agar Harina de maíz.
- Guantes.
- Cinta de enmascarar.
- Marcador.



V. MUESTRA

No aplica.

VI. PROCEDIMIENTO

1. Se entrega una placa de agar Harina de maíz a cada grupo de estudiantes. Cada grupo debe elegir el lugar en el cual investigara la atmósfera desde el punto de vista micológico.
2. Cada grupo dejará su placa de agar en el lugar elegido, a 1,5 m de altura sobre el suelo, durante 30 minutos.
3. Transcurrido este tiempo, las cajas de Petri se cierran y se rotulan.
4. Las placas se dejan a temperatura ambiental y a la luz difusa del laboratorio.
5. Transcurridos 3 días y a medida que aparezcan las colonias, el estudiante debe anotar cuales colonias aparecen más rápido.

VII. TALLER DE PREGUNTAS

1. Investigar: ¿qué otras técnicas se pueden utilizar para el aislamiento de los hongos presentes en la atmosfera?
2. Además del aire ¿en qué otros sitios podemos encontrar hongos?
3. ¿Qué nombre reciben los hongos que se encuentran presentes en el aire?



PRÁCTICA No. 3.

MORFOLOGÍA DE LAS COLONIAS DE HONGOS.

I. INTRODUCCIÓN

La morfología macroscópica de las colonias de los hongos, es una herramienta importante para la identificación de estos agentes, para lo cual se tienen en cuenta una serie de parámetros que se deben analizar y que el estudiante de Micología aprenderá a partir de la realización de este laboratorio.

II. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Describir las colonias de hongos presentes en el ambiente.

OBJETIVO ESPECÍFICO

1. Identificar los parámetros más importantes para la descripción de colonias.

III. FUNDAMENTO TEÓRICO

Entendemos por colonias el conjunto de hongos que se originan a partir de una espora que germina, o de un fragmento de micelio de un microorganismo determinado.

Las colonias se forman a partir de prolongaciones tubulares conocidas como tubo germinal que darán origen a las hifas, que se alargan por el crecimiento de su extremo distal. Las hifas conforman el talo o micelio.

El micelio que se origina se va extendiendo radialmente y las colonias que se forman tienen características propias para cada especie o grupo de especies.

Si deseamos estudiar la morfología macroscópica de una colonia se deben estudiar las siguientes características: *forma y tamaño*, *color en la superficie* (blanca, rosada, gris, anaranjada, rojiza, verde, negra) *o en el reverso* (hialina o dematiácea), *difusión del pigmento*, *textura* (yesosa, glabra, terrosa, granulosa, filamentosa, cremosa), *superficie* (elevada o plana, levantamiento central), *aspecto* (plegado, radiado, cerebriforme, crateriforme) y *rapidez de crecimiento* (las levaduras y los hongos oportunistas crecen en 24 a 48 horas, y los dermatofitos en cinco a diez días).



IV. REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS

- Cajas con hongos aislados del ambiente.
- Guantes.
- Tapabocas.
- Gorro.

V. MUESTRA

No aplica.

VI. PROCEDIMIENTO

1. Los grupos de estudiantes deben analizar las cajas con las colonias de los hongos aislados en el ambiente, teniendo en cuenta los parámetros que se incluyeron en el planteamiento del problema.
2. Los parámetros obtenidos para cada una de las colonias aisladas deben anotarse y presentarlos a su docente y a sus compañeros del curso.

VII. TALLER DE PREGUNTAS

1. Con base en los parámetros de descripción de colonias describa 3 colonias.

Parámetros	Colonia 1	Colonia 2	Colonia 3
Aspecto			
Textura			
Color en la superficie			
Color en el reverso			
Difusión de pigmento			

2. Mencione la clasificación del micelio, según:
 - a. Función.
 - b. Diámetro.
 - c. Continuidad.
 - d. Coloración.



PRÁCTICA No. 4.

TÉCNICAS DE MONTAJES MICROSCÓPICOS

I. INTRODUCCIÓN

La observación microscópica de los hongos es importante para su identificación, existen tres técnicas fundamentales para este proceso.

En el presente laboratorio el estudiante aprenderá los procedimientos para la identificación de los hongos en el laboratorio.

II. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Identificar cada uno de las técnicas utilizadas para la identificación microscópica de los hongos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Adquirir destrezas en la realización de montajes microscópicos de colonias de hongos.
2. Diferenciar cada una de las técnicas de montaje microscópico teniendo en cuenta ventajas y desventajas

III. FUNDAMENTO TEÓRICO

Para la observación de las características de esporulación de los hongos se utilizan las técnicas: microcultivo, desmenuzamiento o disgregación y los preparados con cinta pegante.

Para la visualización de las estructuras se utiliza el azul de lactofenol, colorante que penetra en el protoplasma de los hongos haciendo más visibles las estructuras internas.

IV. REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS

- Cajas de Petri estériles.
- Palillos.
- Láminas portaobjetos estériles.
- Cinta adhesiva transparente.
- Asa recta.
- Mecheros.



- Laminillas cubreobjetos estériles.
- Algodón.
- Agua destilada.
- Cajas con agar Papa – glucosa (PDA).
- Azul de lactofenol.
- Guantes.
- Gorros.
- Tapabocas.
- Gafas de seguridad.

IV. MUESTRA

Colonias de hongos ambientales.

V. PROCEDIMIENTO

TÉCNICA DEL MICROCULTIVO (ver figura 1)

1. Cada grupo de trabajo debe contar con los materiales de trabajo: una caja Petri estéril, caja de Petri con agar PDA, palillos, las láminas de vidrio estériles y el algodón.
2. Tomar la caja Petri estéril y colocar dos palillos y el algodón (ver figura 1), luego la lámina de vidrio sobre los dos palillos. Sobre la lámina, se colocará de manera aséptica un cuadrado de agar PDA (de 1 cm de lado), previamente cortado con ayuda del asa recta. Inocular el hongo en estudio en el centro de cada uno de los 4 lados del agar por medio de punciones.
3. Cubrir el agar con una laminilla (cubreobjetos estéril) y colocar agua destilada sobre el algodón. **TODO BAJO CONDICIONES DE ESTERILIDAD.**
4. Incubar a temperatura ambiente durante 5 días. Una vez cumplido el tiempo de incubación, colocar el cubreobjetos recogido del bloque de agar microcultivado en una gota de azul de lactofenol en una lámina para el montaje microscópico.
5. Enfocar con objetivo de 40x y 100 x.

TÉCNICA DE LA DISGREGACIÓN O DESMENUZAMIENTO (ver figura 2)

1. Las láminas deben estar completamente limpias y desengrasadas, colocar una gota de azul de lactofenol y, con la ayuda de un asa recta o agujas de disección estériles, tomar micelio del hongo esparciéndolo cuidadosamente en la gota y desmenuzar la colonia. Colocar una laminilla evitando la formación de burbujas (soltarlas con un ángulo aproximado de 45°).
2. Enfocar con objetivo de 40x y 100 x.

PREPARADOS CON CINTA PEGANTE (ver figura 3)

1. Tomar la cinta adhesiva transparente, presionar la parte engomada suavemente contra la superficie de las colonias, tomando una porción del micelio aéreo.
2. Colocar la cinta con la parte engomada hacia abajo sobre un portaobjetos con una pequeña gota de azul de lactofenol y examinar en objetivo de 40x.

VII. TALLER DE PREGUNTAS

1. Dibujar e informar las estructuras identificadas con los tres procedimientos.
2. Realizar un cuadro comparativo de las técnicas realizadas.

FIGURA 1. Microcultivo

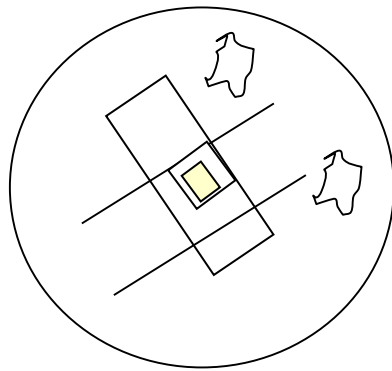


FIGURA 2. Disgregación

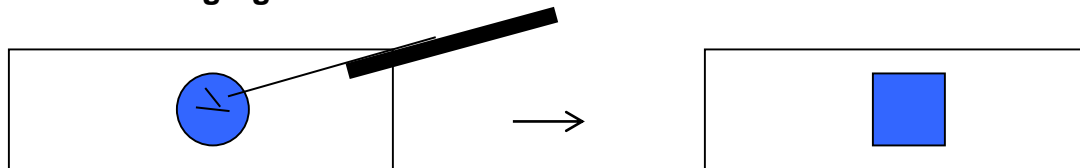
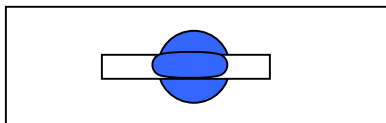


FIGURA 3. Preparados con cinta pegante





PRÁCTICA No. 5.

TÉCNICAS DE SIEMBRA DE COLONIAS

I. INTRODUCCIÓN

Existen diferentes técnicas para la siembra y repique de hongos en medios de cultivo teniendo en cuenta las características morfológicas de las colonias.

En el presente laboratorio el estudiante aprenderá cuales son las técnicas más utilizadas para aislar colonias de hongos.

VI. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Conocer las técnicas de inoculación de hongos más utilizadas en el laboratorio.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Adquirir destrezas en la realización de técnicas de inoculación de hongos.
2. Diferenciar cada una de las técnicas de inoculación de hongos teniendo en cuenta la morfología de las colonias.

III. FUNDAMENTO TEÓRICO

Las técnicas de inoculación para obtener colonias varían según sus necesidades y requieren el uso de diversos utensilios: agujas de mango o de anillo, bisturí, lancetas, transportadores normalizados, etc.

Las colonias se pueden obtener a partir de fragmentos de micelio joven, de otras estructuras sin esporas o a partir de esporas.

IV. REACTIVOS, MATERIALES Y REACTIVOS

- Cajas con medios de cultivo.
- Tubos con agar inclinado.
- Asa metálica.
- Guantes.
- Gorros.
- Tapabocas.
- Marcador o lápiz de cera.

V. MUESTRA

Colonias de hongos ambientales.



VI. PROCEDIMIENTO

1. Las cajas y los tubos que se van a utilizar deben ser marcadas con anterioridad.
2. Siembra a partir de un fragmento de micelio (Figura 1A)
Si se van a obtener colonias a partir de fragmentos de micelio joven o de otras estructuras sin esporas, se puede cortar una parte elegida de la colonia que se encuentre en las colonias aisladas del ambiente con cualquiera de los utensilios mencionados en el marco teórico y la transportamos a la placa que queremos inocular. El fragmento se coloca sobre la superficie del agar abriendo al mínimo la caja a fin de evitar infecciones.
3. Siembra a partir de esporas (Figura 1B)
Si deseamos obtener una colonia a partir de esporas, con una mano abrimos la caja que queremos sembrar manteniéndola boca abajo; de esta forma las esporas que se desprenden del utensilio utilizado para la inoculación del medio caen sobre el revés de la caja. Las placas se mantienen boca abajo, sin tocarlas. De esta forma se evita el crecimiento de multitud de colonias nacidas de la germinación de cada espora que hubiera caído, si se le hubiera dado vuelta a la caja.
4. Siembras en estría (Figura 2)
 - Para la realización de este tipo de siembra se pueden utilizar cajas y tubos con agar inclinado.
 - Siembra en tubos: se sostiene el tubo a inocular con una mano y con la otra el asa, pero de tal manera que nos queden libres dos dedos de esta misma mano, para así abrir y sostener los tapones del tubo. Los tapones no deben caer nunca de la mano, ni hay que dejarlos sobre la mesa de trabajo. Se abre el tubo, flameamos el cuello y también el asa; con el asa tomamos un poco de esporas o de micelio de la colonia que queremos sembrar, la introducimos en el tubo sin inocular y depositamos el material que está adherido al asa o lo hacemos deslizar en estría, sobre la superficie del agar.
 - Se flamea el cuello del tubo y se coloca el tapón. También se debe flamear el asa.

VII. TALLER DE PREGUNTAS

1. ¿Qué métodos se pueden utilizar para preservar y conservar cultivos en el laboratorio? ¿Cuál de estos métodos es el mejor?

FIGURA 1. Técnicas de inoculación de placas.

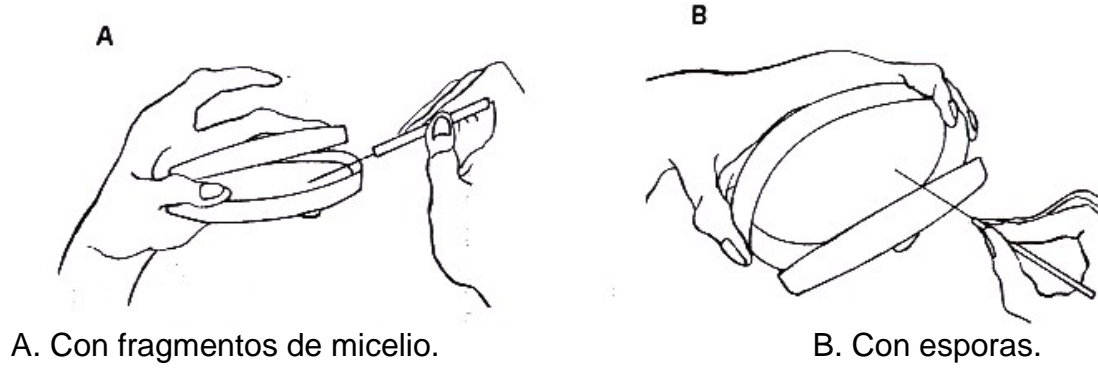
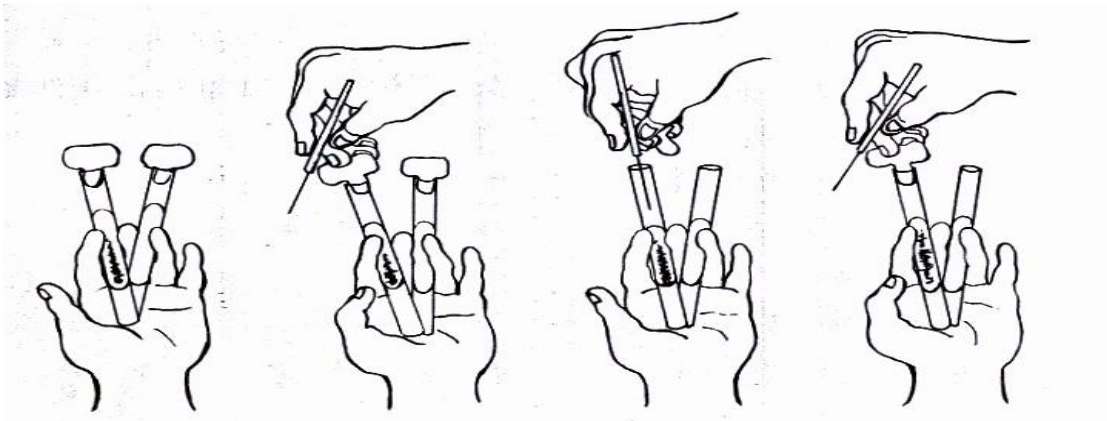


FIGURA 2. Siembras en estría





PRÁCTICA No. 6.

ESTRUCTURAS DE LOS HONGOS

I. INTRODUCCIÓN

El conocimiento de las estructuras del talo de los hongos es importante para su identificación.

En el presente laboratorio el estudiante podrá observar en el microscopio las estructuras más importantes de los hongos.

II. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Identificar las estructuras más importantes de los hongos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Diferenciar los tipos de talos que se pueden presentar en los hongos.
2. Identificar los cuerpos de fructificación asexuales, teniendo en cuenta el tipo de conidias producida, su morfología y disposición.

III. FUNDAMENTO TEÓRICO

Los hongos son organismos eucariotes, heterótrofos, inmóviles, incapaces de sintetizar clorofila, aerobios estrictos, con pared formada por quitina o celulosa, son unicelulares o multicelulares y de crecimiento apical.

Los hongos que se observan en el laboratorio clínico, pueden dividirse en dos grupos: levaduras y hongos filamentosos. Estos están constituidos por un talo que puede ser ameboides, unicelular hasta tubular rodeado por una pared celular, llamada *HIFA*.

Las hifas pueden ser septadas o aseptadas. A medida que estas crecen, se entrecruzan formando una red denominada *MICELIO*, el cual penetra en el sustrato del cual obtiene los nutrientes necesarios para el crecimiento (Micelio vegetativo) o da origen a cuerpos de fructificación del cual nacen las esporas asexuadas (Micelio aéreo).

Para conservar su capacidad de adaptación, es necesario que estos organismos se reproduzcan. Los hongos pueden presentar una reproducción bien sea sexual (estado teleomorfo), asexual (estado anamorfo) o pueden tener ambos tipos de



reproducción (estado holomorfo). La reproducción sexual exige condiciones previas tanto del hongo como del ambiente, por lo cual, esta forma de reproducción no se presenta con mucha frecuencia. La esporulación asexual es útil para la identificación de los hongos debido a que se presenta con mayor frecuencia en el laboratorio, para esto es necesario analizar el tipo de esporas asexuales producidas por el hongo, su morfología y ordenamiento en el cuerpo de fructificación.

IV. REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS

- Placas suministradas por el laboratorio.
- Microscopios.

V. MUESTRA

No aplica.

VI. PROCEDIMIENTO

1. El docente enfocará en el microscopio las estructuras microscópicas de los hongos, el estudiante deberá complementar la información obtenida en el laboratorio con las bases teóricas adquiridas durante su asistencia a clases.

VII. TALLER DE PREGUNTAS

1. El estudiante debe dibujar las estructuras observadas, definir brevemente en qué consisten y nombrar dos ejemplos de mohos y/o levaduras, según el caso, que las presenten:

Hifa Aseptada o Cenocítica.
Hifa Septada.
Blastoconidias.
Fialosporas.
Porosporas.

Anelosporas.
Aleuriosporas.
Arthroconidias.
Esporangiosporas.
Clamidosporas.

2. Comparar los procesos de reproducción de las levaduras, los mohos y bacterias.



PRÁCTICA No. 7.

PROCESAMIENTO DE MUESTRAS CLÍNICAS. EXAMEN DIRECTO.

I. INTRODUCCIÓN

El procesamiento de muestras clínicas nos permite conocer la etiología de una micosis por lo que conocer las metodologías utilizadas es muy importante para el futuro bacteriólogo.

En el presente laboratorio el estudiante aprenderá a realizar la técnica más utilizada en el procesamiento de muestras clínicas: el examen directo.

II. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Conocer los procedimientos necesarios para el montaje de un examen directo a partir de una muestra clínica.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la técnica a utilizar para el procesamiento de las diferentes muestras clínicas.
2. Identificar los reactivos más utilizados en el examen directo.

III.FUNDAMENTO TEÓRICO

El examen directo es el procedimiento más utilizado en el diagnóstico presuntivo de micosis, debido a que permite la identificación del agente etiológico en una muestra clínica. Con frecuencia es la única herramienta utilizada para diagnosticar estas enfermedades.

Existen tres tipos de examen directo los cuales son: el fresco, el frotis y la biopsia; en los cuales se emplean una serie de reactivos y coloraciones para visualizar las estructuras fúngicas. Entre los reactivos más utilizados en el diagnóstico micológico se encuentran: el hidróxido de potasio (KOH) a diferentes concentraciones (10 – 40%); el agua destilada y el lugol. Entre los colorantes se encuentran las tinciones de Gram, Giemsa, Wright, Kin youn, Coloración plata–metenamina y hematoxilina–eosina, entre otros. En algunas micosis, es necesario para confirmar el diagnóstico, la realización de un cultivo en medios de aislamiento primario, tales como el agar Sabouraud con o sin antibióticos.



IV. REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS

- Portaobjetos.
- Cubreobjetos.
- Microscopios.
- Aceite de inmersión.
- Mecheros.
- Gorro.
- Tapaboca.
- Guantes.
- Gafas de seguridad.
- KOH al 10% y al 40%.

V. MUESTRAS

- Uñas.
- Raspado de piel.

VI. PROCEDIMIENTO

TOMA DE MUESTRA

1. El paciente al que se le tome la muestra debe cumplir los siguientes requisitos: no haber recibido antimicóticos orales desde al menos un mes, ni tópicos desde 15 días antes de la toma de la muestra.
2. La muestra puede ser tomada de lesiones en cara, tronco, extremidades y de los pies.
3. Antes de tomar la muestra se debe limpiar las lesiones con una gasa estéril impregnada con alcohol. Se dejan secar las lesiones y se procede a tomar la muestra.
4. Se toma una muestra de escamas del borde de las lesiones, si las lesiones son pequeñas se debe raspar toda la lesión. Se debe realizar este procedimiento en la mayor cantidad de lesiones posibles. La muestra se debe tomar por medio de raspado de las lesiones con un portaobjetos. Las escamas deben ser recibidas en otro portaobjetos. Es importante que los portaobjetos no hayan sido usados anteriormente. Si se toma la muestra en un sitio diferente al del procesamiento, se debe guardar esta entre dos portaobjetos y sellarla por los bordes.

PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

EXAMEN DIRECTO

Para la observación microscópica se puede utilizar KOH al 20% + tinta china (1:1). También se puede utilizar azul de lactofenol.

Para el procesamiento de la muestra, se toma una pequeña cantidad de las escamas y se le adiciona una gota de cualquiera de los reactivos mencionados anteriormente; se le coloca un cubreobjetos. Se observa en el microscopio a 10x y 40x.



HALLAZGOS.

Se debe observar cualquiera de las siguientes estructuras:

- Levaduras o blastosporas redondas u ovals de pared gruesa de tamaño variado, filamentos cortos de pared gruesa cuando se encuentran aislados o en grupos. En ocasiones los filamentos son más largos: indican presuntamente Pitiriasis versicolor.
- Hifas largas septadas, hialinas y artrosporas: indican presuntamente dermatofitosis.
- Hifas septadas o aseptadas hialinas o dematiáceas: indican una dermatomicosis.

CULTIVO

Pitiriasis versicolor: las escamas se sembraron directamente en medio de Micosel suplementado con 10% de aceite de oliva y Tween 80 al 0.2%. Se incuba a 32°C por 7 días. Se colocan las cajas dentro de bolsas plásticas para evitar la desecación. dermatofitosis y dermatomicosis: se inoculan las escamas en agar Sabouraud y Micosel. Se incuba por 4 semanas a 30°C.

Identificación:

Para la identificación del agente etiológico se debe:

Pitiriasis versicolor:

1. Realizar un Gram para la observación de levaduras Gram positivas. Se debe observar su morfología.
2. Reacción de la catalasa: se realiza una suspensión de una colonia de levadura en una gota de agua oxigenada a 10 volúmenes. La observación de burbujas de gas da un resultado positivo.
3. Crecimiento en Tween: a 16 ml de agar micosel a 50°C se le adicionan 2 ml de una suspensión de levadura (10^6 células/ ml) en agua destilada estéril. Se vierte en una caja de Petri. Posteriormente se hacen pequeños pozos de 2 mm al agar para depositar 5µL de Tween 20, 40, 60 y 80 respectivamente. Se incuba la placa a 32°C por una semana, se colocan dentro de bolsas plásticas. Transcurrido este tiempo, se examinan con lupa las zonas de desarrollo o inhibición.
4. Prueba de desdoblamiento de la esculina: se siembra la levadura en profundidad en un medio de bilis esculina y se incuba a 32°C por 5 días.

Dermatofitosis y dermatomicosis:

Observar, en preparados con azul de lactofenol, la morfología microscópica de los hongos aislados.

VII.TALLER DE PREGUNTAS

1. Dibujar las estructuras observadas en el examen directo
2. Investigar el fundamento de los reactivos y coloraciones utilizados en el examen directo.



PRÁCTICA No. 8.

OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA DE HONGOS PRODUCTORES DE MICOSIS SUPERFICIALES.

I. INTRODUCCIÓN

La identificación de las estructuras observadas en muestras clínicas superficiales permite el diagnóstico de las micosis cutáneas. En este laboratorio el estudiante conocerá y diferenciará las estructuras más importantes para el diagnóstico de estas micosis.

II. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Determinar por medio de exámenes directos las micosis superficiales más frecuentes.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Identificar las micosis superficiales más frecuentes mediante la observación de estructuras fúngicas en el examen directo.
2. Identificar los géneros causantes de micosis superficiales mediante la observación de su esporulación

III. FUNDAMENTO TEÓRICO

Las micosis superficiales son un grupo de enfermedades que se producen a nivel de piel y anexos (cabellos, vellos, uñas). Entre las micosis superficiales o cutáneas se incluyen principalmente pitiriasis versicolor, tiña nigra, piedras negra y blanca, dermatofitosis o tiñas y las infecciones en piel y anexos causadas por hongos ambientales.

El diagnóstico se hace principalmente con un examen directo con hidróxido de potasio KOH, en el cual cada proceso infeccioso presenta un aspecto microscópico característico que permite el diagnóstico de la entidad y del agente etiológico, y por consiguiente, el cultivo no se hace de rutina.



IV. REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS

- Placas suministradas por el laboratorio.
- Microscopios.

V. MUESTRA

No aplica.

VI. PROCEDIMIENTO

1. El docente o el monitor enfocará en el microscopio las estructuras microscópicas de los hongos. El estudiante deberá complementar la información obtenida en el laboratorio con las bases teóricas adquiridas durante su asistencia a clases.

VII. TALLER DE PREGUNTAS

1. El estudiante debe dibujar las estructuras observadas, definir brevemente en qué consisten.



PRÁCTICA No. 9.

OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA DE HONGOS PRODUCTORES DE MICOSIS SUBCUTÁNEAS.

I. INTRODUCCIÓN

La identificación de las estructuras observadas en muestras clínicas permite el diagnóstico de las micosis subcutáneas.

En este laboratorio el estudiante conocerá y diferenciará las estructuras más importantes para el diagnóstico de estas micosis.

II. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Determinar por medio de exámenes directos las micosis superficiales más frecuentes.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Identificar las micosis subcutáneas más frecuentes mediante la observación de estructuras fúngicas en el examen directo.
2. Identificar los géneros causantes de micosis subcutáneas mediante la observación de su esporulación.

III. FUNDAMENTO TEÓRICO

Las micosis subcutáneas son un grupo heterogéneo de enfermedades que se caracterizan por el desarrollo de lesiones en el sitio de implantación del hongo. Estas micosis comprenden la esporotricosis, la cromomicosis, los micetomas – eumicetomas y actinomicetomas-, la lobomicosis, la rinosporidiosis y las zigomicosis.

Mediante la visualización del agente etiológico en el examen directo, se puede hacer un diagnóstico presuntivo y a veces confirmatorio de esta micosis, excepto en la esporotricosis donde este procedimiento no permite identificar con facilidad las estructuras. En este caso, el cultivo sirve para confirmar o descartar la enfermedad.



IV. REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS

- Placas suministradas por el laboratorio.
- Microscopios.

V. MUESTRA

No aplica.

VI. PROCEDIMIENTO

El docente o el monitor enfocará al microscopio las estructuras microscópicas de los hongos, el estudiante deberá complementar la información obtenida en el laboratorio con las bases teóricas adquiridas durante su asistencia a clases.

VII. TALLER DE PREGUNTAS

1. El estudiante debe dibujar las estructuras observadas, definir brevemente en qué consisten.



PRÁCTICA No. 10.

OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA DE HONGOS PRODUCTORES DE MICOSIS SISTÉMICAS PROFUNDAS Y OPORTUNISTAS.

I. INTRODUCCIÓN

La identificación de las estructuras observadas en muestras clínicas permite el diagnóstico de las micosis sistémicas.

En este laboratorio el estudiante conocerá y diferenciará las estructuras más importantes para el diagnóstico de estas micosis.

II. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Determinar por medio de exámenes directos las micosis sistémicas más frecuentes.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Identificar las micosis sistémicas y oportunistas más frecuentes mediante la observación de estructuras fúngicas en el examen directo.
2. Identificar los géneros causantes de micosis sistémicas y oportunistas mediante la observación de su esporulación

III. FUNDAMENTO TEÓRICO

Las micosis sistémicas son una causa de enfermedades graves o mortales en un número restringido de pacientes y de infección asintomática en grandes sectores de la población. Su espectro clínico es muy amplio y las manifestaciones pueden confundirse clínica y radiológicamente con otras enfermedades pulmonares como tuberculosis, bronquitis, neumonías atípicas y neoplasias, entre otras.

Las micosis profundas son ocasionadas por *Histoplasma capsulatum*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Coccidioides immitis* y *Blastomyces dermatitidis*. Estos hongos son intrínsecamente muy virulentos e invaden con profundidad tejidos y órganos, además de tener la capacidad de diseminarse con amplitud por todo el organismo.

Por otra parte, las micosis oportunistas (Aspergilosis, Criptococosis, Zigomicosis, Hialohifomicosis y candidiasis) son producidas por hongos en su mayoría saprobios ambientales con virulencia intrínseca baja o limitada, que pueden producir



enfermedad en individuos debilitados, inmunosuprimidos o que tienen dispositivos protésicos.

El diagnóstico se realiza mediante examen directo, cultivos y pruebas serológicas; estas últimas permiten evaluar la respuesta al tratamiento.

IV. REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS

- Placas suministradas por el laboratorio.
- Microscopios.

V. MUESTRA

No aplica.

VI. PROCEDIMIENTO

El docente o el monitor enfocará en el microscopio las estructuras microscópicas de los hongos. El estudiante deberá complementar la información obtenida en el laboratorio con las bases teóricas adquiridas durante su asistencia a clases.

VII. TALLER DE PREGUNTAS

1. El estudiante debe dibujar las estructuras observadas, y definir brevemente en qué consisten.



PRÁCTICA No. 11.

IDENTIFICACIÓN DE LEVADURAS.

I. INTRODUCCIÓN

El conocimiento de pruebas bioquímicas y fisiológicas permite la identificación de levaduras.

En este laboratorio el estudiante conocerá y diferenciará las pruebas más importantes para la identificación de levaduras.

II. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Conocer las diferentes pruebas bioquímicas y fisiológicas para identificación de levaduras.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Conocer el fundamento de las pruebas utilizadas para identificación de levaduras y hongos levaduriformes.
2. Identificar las cepas utilizadas en el laboratorio a través de la realización de pruebas bioquímicas.

III. FUNDAMENTO TEÓRICO

Las levaduras son hongos unicelulares y la mayor parte de ellas están clasificadas con los ascomicetos. Las células de levadura son esféricas, ovales o cilíndricas y en general su división celular se lleva a cabo por gemación. Macroscópicamente son cremosas con una apariencia similar a las bacterias. Las levaduras se caracterizan por presentar coloración Gram positiva.

Es muy importante la diferenciación de las diversas levaduras, dado su parecido macroscópico y micromorfológico. Para distinguirlas se utilizan, entre otras, las siguientes pruebas: Filamentación en suero, resiembra de los cultivos en agar Harina de maíz, sensibilidad a la cicloheximida y fermentación de carbohidratos.

IV. REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS

- Tubos con 0,5 ml de suero.
- Gorro.



- Cajas con agar Harina de maíz y Saboureaud con cicloheximida.
- Tubos con sacarosa, glucosa, maltosa, galactosa, lactosa, rafinosa al 1%.
- Asa en punta.
- Cultivos.
- Tapabocas.
- Gafas de seguridad.
- Guantes.
- Mechero.

V. MUESTRA

No aplica.

VI. PROCEDIMIENTO

FILAMENTACION EN SUERO

Se toma un inóculo de la colonia y se coloca en 0,5 ml de suero, se incuba a 37° C, en 2 h se producen tubos germinativos.

RESIEMBRA EN AGAR HARINA DE MAIZ Y SABOUREAUD CON ANTIBIÓTICOS

Se hacen algunas estrías en la superficie del medio con un inóculo de las cepas a utilizar, se incuba por 18 a 24 horas a 30°C.

FERMENTACIÓN DE CARBOHIDRATOS

Sembrar en todos los azúcares la cepa pura a identificar. Incubar de 24 a 48 horas a 25° C.

VII. TALLER DE PREGUNTAS

1. Defina:
 - Auxonograma.
 - Zimograma.
2. Investigue el fundamento de las pruebas utilizadas. Qué otras pruebas se pueden utilizar para identificación de levaduras.



BIBLIOGRAFÍA

- Arenas, Roberto. Micología Médica Ilustrada. McGraw Hill. 2014. Quinta edición. México. D.F. México.
- Pemán J, Martín E. Guía Práctica de Identificación y Diagnóstico en Micología Clínica. Segunda edición. Revista Iberoamericana de Micología. 2007. Bilbao. España.
- Manual de prácticas de laboratorio de Bacteriología y Micología. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Subdirección Académica. Área de Docencia de Salud Pública. 2012. México D.F. México.
- Montoya Villafañe, H. Microbiología. Editorial Universidad de Antioquia. Yuluka / Medicina. Segunda edición. 2008. Medellín. Colombia.
- Santamaría, L. y cols Diagnóstico Micológico por Examen Directo. Universidad de Antioquia. Segunda edición. 2005. Medellín Colombia.
- Winn W, Allen S, Janda W, Koneman E, Procop G, Schreckenberger P et al. Koneman Diagnóstico Microbiológico. Sexta edición. Editorial Médica Panamericana. 2008. Buenos Aires. Argentina.



CORPORACIÓN UNIVERSITARIA
RAFAEL NÚÑEZ
PARA QUE TU DESARROLLO CONTINÚE SU MARCHA

Campus Cartagena
Centro Comercial Pasaje de la Moneda
Cra. 8B #8-56
Tel. 6517088 Ext 1202

Campus Barranquilla
Cra 54 #66-54
Tel. (5) 3602197 Ext 1319

www.curn.edu.co

Institución Universitaria | Vigilada Mineducación
Reconocimiento personería jurídica: Resolución 6644 del 5 de junio de 1985 Mineducación.

