

UNIVERSIDAD CATÓLICA ANDRÉS BELLO
DIRECCIÓN DE POSTGRADO
ESPECIALIZACIÓN EN GERENCIA DE SERVICIOS ASISTENCIALES
DE SALUD

TRABAJO DE GRADO

MANUAL DE ORGANIZACIÓN Y ESTANDARIZACIÓN DEL
LABORATORIO DE MICOLOGÍA DEL HOSPITAL DR. DOMINGO
LUCIANI

Presentado a la Universidad Católica Andrés Bello, por:

HEIDI REYES GONZALEZ

Como requisito parcial para optar al grado de:

ESPECIALISTA EN GERENCIA DE SERVICIOS ASISTENCIALES DE
SALUD

Realizado con la tutoría del profesor

Oscar Iván Silva

Caracas, Noviembre 2.009

AGRADECIMIENTOS

- Quiero manifestar mi más sincero agradecimiento, a mi tutor Profesor Oscar Iván Silva por su asesoramiento científico en la elaboración de esta tesis, apoyo y calidez humana.
- A todas las personas que laboran en el servicio de Bioanálisis del Hospital Dr. Domingo Luciani, que de una u otra forma me apoyaron y colaboraron para la realización de este proyecto.
- Un agradecimiento muy especial a la jefatura del servicio del Hospital Dr. Domingo Luciani, Lic. María Elena Escobar y Lic. Deisy González, por su apoyo y estímulo, otorgándome los permisos necesarios para asistir a las clases y asesorías durante la realización de este trabajo.
- Un agradecimiento muy especial a mi jefa del servicio de Nefrología del Hospital de Niños J. M de los Ríos Lic. Magaly Anseume, y a la Lic. María Gabriela Añez, por confiar en mí y otorgándome los permisos necesarios para asistir a las clases teóricas y asesoramiento científico de este post grado, además de suplir mi ausencia.
- Al servicio de Nefrología del Hospital de Niños J. M de los Ríos, Dr. Marcos Ariza, Lic. Magaly Anseume, Lic. María Gabriela Añez, Lic. Amelia Dalli, Raiza Aponte, Nancy Quintana y Josefina Hernandez, por su apoyo y estímulo.

- Al Hospital Dr. Domingo Luciani, por prestar su infraestructura, además de otorgarnos el privilegio de la figura de convenio con la Universidad Católica Andrés Bello en los primeros semestres de este postgrado, facilitándonos un poco la carga económica que implica hacer un postgrado de esta envergadura y así contribuir a la formación gerencial de su personal.
- A mis profesores y a la Universidad Católica Andrés Bello, por todo el conocimiento impartido necesario para ser mejor profesional cada día.
- A mis compañeras de post grado, en especial Belkys, María Elena, Eddy, Gladys, Ninoska, Olivia y Maritza. Gracias amigas por compartir conocimientos, separatas, momentos de tensión y éxito durante nuestro postgrado.

DEDICATORIA

Dedico el proyecto de este post grado universitario a **DIOS** por ser quien a estado a mi lado en todo momento, dándome las fuerzas necesarias para seguir luchando día tras día y seguir adelante rompiendo todas las barreras que se me presenten. A **mis padres** Haydee de Reyes y Oswaldo Reyes ya que gracias a ellos soy quien soy hoy en día, fueron los que me dieron ese cariño y calor humano necesario, para hacer de mi un ser integral y de los cuales me siento extremadamente orgullosa. A **mis hermanos** quienes han estado siempre a mi lado compartiendo esos secretos y aventuras que solo se puede vivir entre hermanos y han estado siempre alerta ante cualquier problema que se me pueda presentar. A mi **amigo y esposo Humberto Gutiérrez**, Muchas gracias por el apoyo incondicional que me has brindado siempre, gracias por esos años de completa alegría y triunfos juntos. A **mis pequeñas princesas, Victoria Isabella y Nathalia Corina**, gracias hijas por contagiarme de esa alegría maravillosa que siempre tienen en sus caritas. A **mi suegra, Sra. Antonia Gutiérrez**, por todo el apoyo y consideración para el logro de este proyecto.

INDICE GENERAL

	Páginas
Título, autor, tutor	i
Agradecimientos	ii
Dedicatoria	iv
Índice general	v
Resumen	xii
Summary	xiii
Introducción	1
Capitulo I. Elementos Generales. Organización y Estandarización del laboratorio de Micología	3
1.1 Planteamiento del problema	3
1.2 Formulación y sistematización del problema	5
1.3 Objetivo general y específicos	6
1.4 Justificación.	6
CAPITULO II. Metodología.	7
2.1 Marco Organizacional	7
2.2 Marco Conceptual	15
2.3 Marco Metodológico	20
2.4 Consideraciones éticas y legales	24
CAPITULO III. Resultados	26
Misión, Visión, Valores	26

3.4 Organigrama estructural ideal para la sección de Micología del Hospital Dr. Domingo Luciani	27
3.5 Recursos: Económicos, Financieros y Humanos	27
3.5.1 Recursos Económicos y Financieros	27
3.5.2 Recursos Humanos. Manual Descriptivo	28
A) Coordinador del área de Micología	30
B) Bioanalista Especialista en Micología	32
C) Asistente de laboratorio clínico en Micología	34
D) Secretaria del laboratorio clínico en Micología	36
E) Recepcionista del laboratorio clínico en Micología	38
F) Auxiliar del laboratorio clínico en Micología	40
G) Camarera del laboratorio clínico en Micología	41
3.5.3 Recursos Materiales	43
3.5.3.1 Inventario de Equipos y Materiales	43
3.5.3.2 Inventario de Medios y Reactivos	48
3.5.3.3. Ambiente físico. Plano de laboratorio	52
3.6 Procedimientos para obtención, transporte y conservación de muestras.	52
Fundamento del Método	52
Materiales	52
Secuencia operativa	53
Precauciones de seguridad	53

Toma de muestra	53
3.6.1 Toma de muestra para diagnóstico de micosis superficiales	54
Escamas	54
Pelos	55
Uñas	57
Trasporte de muestras	58
Transporte de muestras superficiales	58
Transporte de muestras respiratorias	58
Exudado y lavado nasofaríngeo	58
Espujo por expectoración espontánea (E)	59
Espujo inducido (EI)	59
Aspirado traqueal (AT)	59
Lavado bronquial (LB)	59
Lavado broncoalveolar (BAL)	60
Lavado broncoalveolar protegido (BAL-protegido)	60
MiniBAL (Mini-BAL)	61
Biopsia transbronquial	61
Punción pulmonar percutánea o transtorácica	61
Líquido pleural (LP)	61
Biopsia pleural	62
Transporte y conservación de muestras respiratorias	62
3.6.2. Toma de muestras de líquidos estériles y tejidos	62

I) Sangre	62
A) Sistemas Automatizados	62
B) Lisis-Centrifugación	64
II) LCR	64
III) L. pleural, peritoneal, pericárdico, sinovial y otros líquidos de punción	65
IV) Médula ósea	65
V) Tejidos	65
Transporte de líquidos de punción de cavidades estériles y tejidos	66
3.6.3 Toma de muestras genitourinarias	66
I) Exudado vaginal	66
II) Exudado vulvar	66
III) Surco balanoprepucial	66
IV) Primer chorro de orina	66
V) Exudado uretral	67
VI) Micción espontánea / Chorro medio de orina	67
VII) Sonda vesical	67
VIII) Punción suprapúbica	68
Transporte de muestras genitourinarias	68
3.6.4 Toma de muestras de cavidad oral y otorrinolaringológicas	68
I) Cavidad oral	68
II) Muestras rinosinusales	68
III) Muestras óticas	69

IV) Biopsias o piezas quirúrgicas	69
Transporte de muestras de cavidad oral y otorrinolaringológicas	69
3.6.5 Toma de muestras gastrointestinales	69
I) Cepillado esofágico	69
II) Biopsia esofágica	70
Transporte de cepillado y biopsia esofágicos	70
3.6.6 Toma de muestras oculares	70
I) Exudado conjuntival	70
II) Raspado corneal	70
III) Fluídos y aspirados oculares	71
IV) Conductos lacrimales	71
V) Lentes de contacto	71
Transporte de muestras oculares	71
3.6.7. Toma de muestra de catéteres	71
I) Catéteres intravasculares	71
II) Catéteres de diálisis peritoneal	71
Transporte de catéteres	71
3.6.8. Toma de muestra de material protésico	72
Transporte de material protésico	72
3.7. Procedimientos para el diagnóstico micológico.	73
Examen directo (KOH, tinta china, coloración giemsa, coloración gram)	73
Cultivo	76

Cultivo de micosis superficiales	76
Cultivo de muestras respiratorias, cavidad oral, y otorrinolaringológicas.	77
Cultivo de muestra de líquidos estériles y tejidos	78
Cultivo de muestra de sangre	78
Cultivo de líquido cefalorraquídeo	79
Cultivo de muestra de Tejidos	80
Cultivo de muestra genitourinaria	80
Cultivo de catéter y exudado pericatéter	82
3.8. Identificación de las principales micosis superficiales. <i>Epidermophyton floccosum</i> , <i>Microsporum canis</i> , <i>Microsporum gypseum</i> (complejo <i>M. gypseum</i> , <i>M. fulvum</i>) , <i>Trichophyton rubrum</i> , <i>Trichophyton mentagrophytes</i> (var. <i>mentagrophytes</i> , var. <i>interdigitale</i>), <i>Trichophyton tonsurans</i> .	83
3.9. Identificación de las principales levaduras. <i>Candida albicans</i> , <i>Candida glabrata</i> , <i>Candida parapsilosis</i> , <i>Candida tropicalis</i> , <i>Candida krusei</i> , <i>Candida lusitanae</i> , <i>Candida guilliermondii</i> , <i>Rhodotorula rubra</i> , <i>Trichosporon spp</i> , <i>Geotrichum spp</i> , <i>Cryptococcus neoformans</i> , <i>Malassezia spp</i> .	92
4.0. Identificación de los principales hongos filamentosos. <i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>A. flavus</i> , <i>A. Niger</i> , <i>Fusarium solani</i> , <i>Scedosporium apiospermum</i> , <i>Mucor</i>	110

<i>spp. Rhizopus spp y Absydia spp</i>	
5.0. Estandarización de procesos y flujogramas	115
CAPITULO IV. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	125
Referencias Bibliográficas	129
Anexos	133
Anexo 1. Encuestas	
Anexo 2. Formatos de Resultados	
Anexo A. Técnica de lisis centrifugación	
Anexo B. Preparación de reactivos	
Anexo C. Preparación de medios de cultivo	
Anexo D. Claves para identificación de algunos hongos	
Anexo E. Esquema de Identificación y diagrama diagnostico para las levaduras mas frecuentes aisladas en muestras clínicas	
Anexo F. Imágenes y fotografías para orientación diagnostica.	

UNIVERSIDAD CATÓLICA ANDRÉS BELLO

POSGRADO EN GERENCIA DE SERVICIOS ASISTENCIALES DE SALUD

**MANUAL DE ORGANIZACIÓN Y ESTANDARIZACIÓN DEL
LABORATORIO DE MICOLOGÍA DEL HOSPITAL DR. DOMINGO
LUCIANI**

Autor: Heidi Reyes G

Tutor: Oscar Iván Silva

Fecha: Noviembre 2009

RESUMEN

La incidencia global de las infecciones producidas por micosis ha presentado un incremento importante en los últimos años, siendo la candidemia la forma de infección nosocomial por levaduras más frecuente en nuestro medio. El objetivo de este trabajo es diseñar el manual de organización y estandarización del laboratorio de Micología del Hospital Dr. Domingo Luciani, este laboratorio atiende a una población de pacientes importantes del Distrito Capital, y no tiene un documento que especifique la estructura, funcionamiento, descripción, identidad legal, los procesos para el análisis de las diversas muestras para estudios micologicos, que se reciben, por lo cual el personal que aquí labora, ejerce sus funciones de acuerdo a un entrenamiento de varias semanas, sin conocer la misión y visión de la unidad, sus funciones, y deberes, por lo que el fin último de esta unidad no se puede llevar a cabo correctamente como esta establecido. Es importante resolver el problema planteado ya que involucra una gran población del país que son los pacientes del IVSS, con esto se persigue mantener procedimientos para controlar todos los documentos e información (de fuentes internas o externas), asentando formalmente las actividades del Laboratorio y de esta forma el personal que aquí labora pueda ejercer sus funciones correctamente y los médicos obtener un resultado de alta calidad de un cultivo para hongos, realizado en este laboratorio, constituyendo así con una herramienta adicional en el momento de escoger un tratamiento en beneficio de la salud pública. Se espera realizar este documento escrito que permita organizar y estandarizar todos los procedimientos para facilitar la prestación de un servicio continuo de calidad a nuestros usuarios.

Descriptor: Manual, organización, estandarización, micología, procedimientos, laboratorio.

Disciplina: Organización y Dirección de Empresas

Área: Gerencia de Servicios Asistenciales de Salud

UNIVERSIDAD CATÓLICA ANDRÉS BELLO

POSGRADO EN GERENCIA DE SERVICIOS ASISTENCIALES DE SALUD

**MANUAL DE ORGANIZACIÓN Y ESTANDARIZACIÓN DEL
LABORATORIO DE MICOLOGÍA DEL HOSPITAL DR. DOMINGO
LUCIANI**

Autor: Heidi Reyes G

Tutor: Oscar Iván Silva

Fecha: Noviembre 2009

SUMMARY

The global incidence of the infections produced by micosis has presented/displayed an important increase in the last years, being candidemia the form of more frequent hospital-acquired infection by leavenings in our means. The objective of this work is to design the organization manual and standardization of the laboratory of Mycology Dr. Domingo Luciani Hospital, this laboratory takes care of a population of important patients of the Capit District, and it does not have a document that specifies the structure, operation, description, legal identity, the processes for the analysis of the diverse samples for micologicos studies, that are received, thus the personnel who toil, exert its functions according to a training of several weeks here, without knowing the mission and vision the unit, its functions, and duties, reason why the last aim of this unit cannot correctly be carried out like this established. It is important to solve the posed problem since it involves a great population of the country that are the patients of the IVSS, with this it is persecuted to maintain procedures to control all the documents and information (of internal or external sources), formally seating the activities of the Laboratory and this form the personnel who toils here can exert its functions correctly, and the doctors to obtain a result of high quality of a study mycolgy, realised in this laboratory, thus constituting with an additional tool when to choose a treatment to the benefit of the public health. One hopes to realise this written document that it allows to organize and to standardize all the procedures to facilitate the benefit of a continuous service of quality to our users.

Descriptors: Manual, organization, standardization, mycology, procedures, laboratory.

Discipline: Organization and Direction of Companies

Area: Management of Welfare Services of Health

Introducción

Durante los últimos años se ha producido un considerable aumento de las infecciones sistémicas graves causadas por hongos debido al incremento en el número de pacientes susceptibles a ellas, como el estado de inmunodepresión en receptores de órganos, pacientes con tratamientos antineoplásicos y con enfermedades autoinmunes, entre otros. En este sentido, el laboratorio de Micología se ha convertido en una herramienta esencial para el diagnóstico y tratamiento fúngico, que resuelva la infección micótica en el paciente.

El laboratorio de Micología del Hospital Dr. Domingo Luciani, funciona desde el año 1991, y es el único con el cual cuenta el Instituto Venezolano de los Seguros Sociales (IVSS), funciona en el turno de la tarde (1-7p.m.) de Lunes a Viernes. Actualmente, procesa una media de alrededor de 1050 muestras mensuales. Se encarga del procesamiento de muestras biológicas para la detección de agentes micóticos (hongos), su identificación, sensibilidad, así como pruebas de inmunodiagnóstico. De aquí se puede deducir la importancia de esta sección en el diagnóstico, tratamiento y seguimiento de los pacientes que presenta enfermedades micóticas.

Este laboratorio no posee actualmente un manual de organización ni estandarización de procedimientos de las actividades que allí se realizan, por lo que nuestro propósito es evaluar las condiciones actuales, plantear una misión, una visión, y los valores de esta sección; se describirán procesos y funciones con el fin organizar y estandarizar todos los procedimientos para facilitar la prestación de un servicio continuo y de calidad a nuestros usuarios y así disponer de un laboratorio de Micología bien establecido, representando una contribución importante a la salud pública, pues suministra datos al proceso de diagnóstico de enfermedades producidas por hongos, para su prevención y terapéutica.

El Manual de organización y estandarización, constituye un documento que define, la estructura, funcionamiento, descripción, identidad legal, recursos y deberes. Además presenta la distribución física, recursos financieros, humanos, y materiales. También se describe las interrelaciones jerárquicas tanto vertical como horizontal entre los diferentes cargos que conforman la estructura organizacional de la unidad.

Asimismo, permite que los funcionarios y demás servidores del área conozcan con claridad su ubicación dentro de la estructura orgánica y sus deberes dentro del cargo que le ha sido encomendado, así como su jerarquía y nivel de responsabilidad, facilitando el seguimiento, evaluación y control de las tareas y/o actividades permanentes de cada Unidad orgánica.

A continuación se expondrá un trabajo estructurado en varias secciones, todo su contenido se centra en la exposición de la problemática que consiste en la falta de un manual de organización y estandarización de procedimientos para los empleados que laboran en el laboratorio de Micología del Hospital Dr. Domingo Luciani. Su delimitación y contexto referencial. Se plantea el Objetivo General y los Objetivos Específicos de este estudio, así como su justificación, se describe el tipo y diseño utilizado para la investigación, correspondientes a las características propias que se desarrollarán luego en el Marco Organizacional, y Marco Conceptual, se habla de los antecedentes relacionados con la investigación, así como la sustentación legal y consideraciones éticas que respaldan este trabajo, adicionalmente se plantean los resultados esperados, referencias bibliográficas que apoyan esta investigación. Finalmente se expone un cronograma de actividades, así como el presupuesto necesario para llevar a cabo dicho estudio.

CAPITULO I. ELEMENTOS GENERALES: ORGANIZACIÓN Y ESTANDARIZACIÓN DEL LABORATORIO DE MICOLOGÍA

1.1. Planteamiento del Problema

La incidencia global de las infecciones producidas por micosis ha presentado un incremento importante en los últimos años, siendo la candidemia la forma de infección nosocomial por levaduras más frecuente en nuestro medio. Sin embargo su tasa de incidencia global es difícil de precisar puesto que depende del grado de especialización del hospital. En los hospitales de tercer nivel el incremento de su incidencia, comparada con la observada en la década de 1980, es superior al 500%, pero en los hospitales rurales es considerablemente inferior 75% (Cantón, E., y col 2001: 51-55)

En la década de los 1980 la National Nosocomial Infections Surveillance System (NNIS) confirma el crecimiento de infecciones fúngicas que pasan de 2,0 a 3,8 infecciones/1000 pacientes al final de dicha década (Bartizal, K., et al 1997:2326-2332).

En general todo estado de inmunosupresión de linfocitos T no solo la infección con Virus de inmunodeficiencia humana (VIH), sino el uso de corticoesteroides, trasplante de órganos, cirugías mayores, quemaduras, entre otras, son factores de riesgo para desarrollar una Infección fúngica invasora (IFI), seguido de la estancia prolongada en unidades de cuidado intensivo (UCI) (Del Palacio, A., y col 2006: 29-31)

El programa de vigilancia antifúngica mundial ARTEMIS, muestra un análisis de 140.767 aislados de levaduras obtenidas y examinadas de 127 centros médicos diferentes en Asia, Latinoamérica (incluyendo a Venezuela), Europa, Medio Oriente y Norteamérica, entre junio de 1997 y diciembre de 2003, donde se observa una tendencia decreciente en la tasa de aislamiento de *C. albicans* (reducción 69% a 59%), durante el curso de 6.5 años y por el contrario, hubo tasas crecientes de aislamiento de *C. tropicalis* (aumento 4,38% subió a 7,20%) y *C. parapsilosis* (4,03% subió a 6,96%). Los aislamientos de especies inusuales como *C.*

guilliermondii, *C. kefir*, *C. rugosa* y *C. famata*, aumentaron de 2 a 10 veces durante el curso de ese estudio (Pfaller M A, y col 2005: 5848 -58-59. En Venezuela en el Hospital Dr. "Domingo Luciani", también se muestra un aumento de las micosis aisladas en los últimos años, presentándose tasas crecientes de levaduras distintas a *C. albicans*, se realizó un estudio de 802 cepas de levaduras consideradas patógenas, aisladas de fluidos normalmente estériles, y resultó que *C. albicans* se aisló en un 42,45 % de las muestras, no obstante la observación de especies diferentes, en conjunto ocupan ya un lugar prominente 54.8%], datos estos interesantes que muestran el aumento progresivo de especies distintas a *C. albicans* igualmente en nuestro país (Reyes H, y col 2005: 44-47)

Los avances tecnológicos en diagnóstico y terapéutica surgidos en los últimos años han permitido la sobrevida de los pacientes con enfermedades que presentan alta morbi-mortalidad, al poder ofrecerles un diagnóstico rápido y terapia adecuada. Desafortunadamente la terapia inmunosupresora para aumentar la sobrevida de los pacientes con cáncer, o sometidos a trasplante de órganos, entre otros, se traduce en un factor de riesgo que favorece el desarrollo de infecciones oportunistas y/o nosocomiales por lo que es determinante ante la sospecha de una IFI, indicar tratamiento antifúngico empírico para minimizar el alto porcentaje de mortalidad . Y en segundo lugar enviar la muestra a un laboratorio de Micología para estudiar el hongo causante de la infección, investigar su género y especie así como las pruebas de susceptibilidad correspondiente. Y de esta manera poder predecir la respuesta clínica más probable al tratamiento para lograr el restablecimiento de la salud del paciente. ((Bartizal, K., et al 1997:2326-2332).

Sin embargo la mayoría de nuestros hospitales no cuentan con un laboratorio de micología que tenga bien establecido en un documento la estructura, funcionamiento, descripción, identidad legal, recursos y deberes, así como, la descripción de cargo de su recurso humano y los

procesos para el análisis de las diversas muestras que se reciben, por lo que el personal que aquí labora, ejerce sus funciones de acuerdo a un entrenamiento de varias semanas, sin conocer la misión y visión de la unidad, sus funciones, y deberes, por lo que el fin último de esta unidad no se puede llevar a cabo correctamente.

A la hora de realizar una actividad el recurso humano de este servicio tiene que apelar a su memoria, libros de texto, y manuales escritos por otras instituciones, adaptándolo a las condiciones existentes, para poder ejercer su labor lo más acertadamente posible, por esta razón se hace necesario el proponer la elaboración del Manual Organizacional y Estandarización en este servicio, porque disponer de un laboratorio de Micología bien establecido, representa una contribución importante a la salud pública, puesto que suministra datos al proceso de diagnóstico de enfermedades producidas por hongos, su prevención y terapéutica. Además se estaría mejorando la calidad de las funciones y actividades del personal que aquí labora y como consecuencia mejoraría también la calidad de los resultados emitidos por este servicio, prediciendo así la respuesta clínica más probable al tratamiento, o detectar el potencial fallo terapéutico y así mejorar la salud de los pacientes que acuden a este servicio.

1.2 Formulación y sistematización del problema

¿Existen políticas estratégicas para el correcto funcionamiento de un laboratorio de Micología? ¿Existen normas establecidas para el procesamiento de muestras biológicas con sospecha de infección fúngica? ¿Existen procedimientos establecidos para el procesamiento de muestras biológicas con sospecha de infección fúngica? ¿Influiría la normalización de un documento que tenga bien establecido la estructura, funcionamiento, descripción, deberes, en la calidad y eficiencia de los resultados emitidos por este servicio? |

1.3 Objetivos de la Investigación

1.3.1 Objetivo General

- ❖ Diseñar el manual de organización y estandarización tecnológica y de funcionamiento del laboratorio de Micología del Hospital Dr. Domingo Luciani

1.3.2 Objetivos Específicos

- ❖ Determinar la misión, visión, y valores del laboratorio de Micología del Hospital Dr. Domingo Luciani.
- ❖ Definir el manual descriptivo de cargo del recurso humano y los requisitos mínimos exigidos para su ejercicio del Laboratorio de Micología del Hospital Dr. Domingo Luciani
- ❖ Establecer los recursos económicos - financieros y materiales del laboratorio de Micología del Hospital Dr. Domingo Luciani.
- ❖ Describir los procedimientos para obtención, transporte y conservación de muestras del laboratorio de Micología del Hospital Dr. Domingo Luciani.
- ❖ Estandarizar las técnicas, procesos y procedimientos para el diagnóstico micológico del laboratorio de Micología del Hospital Dr. Domingo Luciani.

1.4 Justificación

Es importante resolver el problema planteado ya que involucra una gran población del país que son los pacientes del IVSS, con esto se persigue documentar y mantener procedimientos para controlar todos los manuscritos e información (de fuentes internas o externas), estableciendo las actividades del Laboratorio de Micología del Hospital Dr. Domingo Luciani y de esta forma los profesionales de la salud de este hospital y de cualquier institución que obtengan un resultado de un análisis proveniente

de este laboratorio, dispongan de una herramienta de calidad para el momento de escoger un tratamiento en beneficio de la salud pública.

Al lograr esto se estaría beneficiando el paciente, pues el tratamiento sería el apropiado y se lograría la recuperación de la salud. Así mismo, el costo del tratamiento por paciente disminuiría porque se estaría suministrando el antifúngico más adecuado, por otro lado realizar estas pruebas en clínicas privadas sería más costoso para el enfermo. Y de la misma manera el laboratorio de Micología del Hospital Dr. “Domingo Luciani” mejoraría la calidad del servicio que presta a la comunidad.

CAPITULO II. METODOLOGÍA.

2.1 Marco Organizacional

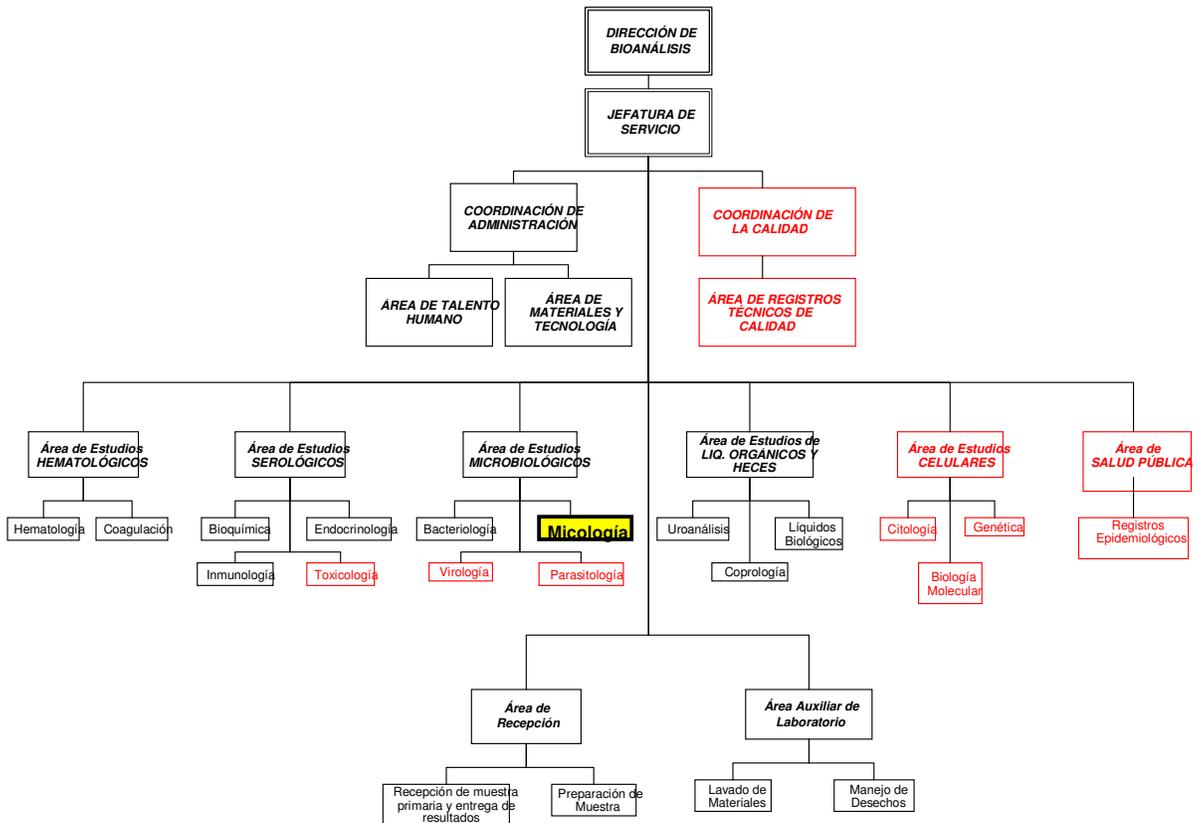
Son todos aquellas presunciones y aspectos fundamentales que se deben resaltar para conocer la organización con la que se esta trabajando.

2.1.1 Presentación del laboratorio de Micología del hospital Dr. Domingo Luciani

❖ Ubicación Física

- **Estado:** Distrito Capital
- **Municipio:** Libertador
- **Localidad:** El Llanito
- **Dirección Completa:** Final Av. Río Janeiro, Urbanización El Llanito, Hospital General del Este Dr. Domingo Luciani, piso 1, Servicio de Bioanálisis, Laboratorio de Micología. Caracas – Venezuela.
- **Apartado Postal:** 1070.
- **Código Postal:** 1010.

2.1.2 Organigrama estructural del servicio de Bioanálisis



AREA PENDIENTE POR DESARROLLAR

Código:	Fecha:	Nº Páginas:	Realizado por:	Revisado por:	Aprobado por:
DB-003	14/12/2005	16	Jefe de División de Bioanálisis	Director de Bioanálisis	Director de Salud
			Lic. Paolo Buonafonte	Lic. Octavio Solórzano	Dr. José Delgado

2.1.3 **Reseña Histórica**

El Hospital del Este Dr. Domingo Luciani, representa uno de los principales complejos sanitarios que atiende a la población del Distrito Capital. Ubicado en la urbanización El Llanito, al Este de la ciudad de Caracas, Venezuela. Se construyó entre los años 1974 y 1977, con una extensión de aproximadamente 50.000 m² de construcción y una capacidad de 694 camas. Inaugurado el 10 de Abril de 1987. Es un hospital tipo IV, con 447 camas operativas, con un movimiento anual de 21.000 pacientes en hospitalización, 9 quirófanos operativos: 5 para intervenciones electivas, 2 para Emergencias, y 2 para Obstetricia. Funciona las 24 horas del día, todos los días del año. Ofrece servicios de consulta (Medicina Interna, Cirugía, Dermatología, Otorrinolaringología, Ginecobstetricia, Pediatría, entre otros.), y Emergencia. Consta de servicios de Rayos X, Diálisis, Anatomía Patológica, Banco de sangre y Servicio de Bioanálisis.

El Servicio de Bioanálisis es una unidad independiente, destinada a contribuir con la promoción y restitución de la salud pública, mediante el análisis de muestras biológicas, realizados mediante métodos científicos y tecnología propios del laboratorio clínico, para suministrar datos al proceso de diagnóstico de enfermedades, su prevención y terapéutica.

El Servicio de Bioanálisis del Hospital Dr. Domingo Luciani está ubicado en el piso 1 del Edificio Sede y funciona desde la inauguración del Hospital hace 22 años. Está conformado por un Laboratorio de Rutina y por el Laboratorio de Emergencia (que funciona las 24 horas todos los días del año).

El Servicio de Bioanálisis está estructurado por una Jefatura, una Adjutoría o Coordinación de Administración y diferentes áreas de especialidades, como son Hematología, Coagulación, Bioquímica, Inmunología, Endocrinología, Microbiología, entre otros. Dentro del área de Microbiología se encuentra la sección de Bacteriología y Micología.

La sección de Micología funciona desde el año 1991, y esta dedicado al análisis de muestras provenientes de seres humanos, con sospecha de enfermedades micóticas, de sitios anatómicos superficiales (piel, pelo y uñas) y profundos (orinas, líquidos corporales, secreciones, esputos, hemocultivo, úlceras corneales, etc) realizados con tecnología y métodos científicos propios de un laboratorio clínico, se realiza identificación, sensibilidad frente a antimicóticos de uso frecuente, así como pruebas de inmunodiagnostico, con el fin de suministrar datos, que contribuyen en el diagnostico, prevención y tratamiento de enfermedades producidas por hongos.

Funciona de Lunes a Viernes en un horario comprendido, de 1:00 PM – 7:00 PM. En esta unidad funciona actualmente el siguiente recurso humano:

- 1 Bioanalista,
- 1 Asistente de Laboratorio ocasional,
- 1 Asistente de Laboratorio (que prepara los medios tanto para Micología como para Bacteriología)
- 1 Cristalera
- 1 Camarera que es compartida con las otras secciones del Servicio de Bioanálisis.

Actualmente, la sección realiza una media de alrededor de 1050 muestras mensuales, provenientes de pacientes asegurados por el IVSS, de los diferentes servicios de hospitalización, consulta externa, emergencia y ambulatorio de todo el país.

En los planes a futuro, esta planteada la apertura de la sección en el turno de la mañana con la entrada de nuevo personal que cubra ese horario, esto permitirá cubrir la creciente demanda de este servicio a nivel del área metropolitana y del país. Se espera aumentar a 2100 el número de muestras mensuales con la puesta en marcha del horario matutino.

Solo se remiten los estudios para Pneumocystosis, por no contar con la tecnología y ambiente adecuado para el procesamiento de estas muestras, pero con la organización y estandarización de este laboratorio se espera contar con los insumos y espacio necesario para implementar esta técnica.

2.1.4 Papel del laboratorio en el diagnostico de las micosis

- Los procedimientos del laboratorio son de gran utilidad para los médicos ya que confirman un diagnóstico presuntivo.
- Establece el agente etiológico.
- Son útiles en la selección y monitoreo de la terapia antifúngica, seguimiento evolutivo y para confirmar la curación.

2.1.5 Procedimientos del laboratorio de Micología

- ❖ Demostración de los hongos en los especímenes a estudiar mediante:
 - Microscopía óptica:
 - Frescos (KOH, Tinta china).
 - Tinciones (Gram, Giemsa, HP)
 - Cultivos (incluye identificación hasta especie y la determinación de la susceptibilidad *in vitro*).
- ❖ Detección de la respuesta humoral específica en determinados hongos patógenos.

2.1.6 Objetivos del laboratorio de Micología

Objetivo General

- ❖ Detectar rápida y eficazmente la presencia de los hongos en muestras clínicas y determinar si es el agente etiológico o es un contaminante.

Para lograr este objetivo se requiere realizar adecuadamente la recogida de la muestra, su transporte y procesamiento, además de contar con los detalles sobre el cuadro clínico y los antecedentes epidemiológicos.

Es muy importante que las muestras sean enviadas al laboratorio una vez recolectadas, y en forma adecuada para su rápido procesamiento; de esta forma se minimiza la pérdida de viabilidad de los hongos, reduce el desarrollo de bacterias y asegura la obtención por cultivo del agente etiológico.

Es valioso disponer de la siguiente información:

- Historia clínica del paciente.
- Tratamientos antimicrobianos, citotóxicos o inmunosupresores.
- Ocupación del paciente.
- Historia de residencia o viajes al exterior en los últimos 10 años.
- Contacto con animales.
- Tipo de muestra a analizar.
- En qué condiciones fue recolectada la muestra.

Objetivos específicos

- ❖ Apoyar la vigilancia epidemiológica
- ❖ Impartir docencia mediante el entrenamiento a futuros profesionales del Bioanálisis de pre- grado y post – grado, en la adecuada toma de muestra, procesamiento, identificación y susceptibilidad de las diversas muestras biológicas. Así como entrenar a personal Médico, Asistentes, Enfermeras y pacientes, en la adecuada toma de muestra (sangre, orina, secreciones, líquidos, etc.) y transporte de material con sospecha de infección fúngica.
- ❖ Participar en el desarrollo de cursos, conferencias, talleres, e intercambio de ideas e información sobre la Micología Médica con laboratorios a nivel nacional e internacional

2.1.7 Campo de aplicación

El presente manual es aplicable a las personas que conforman el Laboratorio de Micología del Hospital Dr. Domingo Luciani.

2.1.8 Definiciones

- ❖ **Hemocultivo:** cultivo microbiológico de la sangre.
- ❖ **Levadura:** hongo unicelular redondeado u ovoide que se reproduce sexual o asexualmente.
- ❖ **Hongo:** organismo eucariote que pertenece al reino fungi.
- ❖ **Hifas cenocíticas:** hifas no septadas o tabicadas.
- ❖ **Hifas:** elemento estructural fundamental de los hongos; Puede ser unicelular como las levaduras o pluricelular adoptando la forma de filamento septado o aseptado. El conjunto de hifas forma el micelio.
- ❖ **Cápsula:** envoltura hialina y gelatinosa que rodea a una célula, formada generalmente de polisacárido.
- ❖ **Candidosis diseminada:** infección producida por el género *Cándida* que se expande a diversos órganos.
- ❖ **Blastoconidia:** conidio holoblástico que se produce en forma solitaria, sincronógena o en cadenas.
- ❖ **Pseudomicelio:** conjunto de pseudohifas.
- ❖ **Tubo germinativo:** primordio hifal a partir de un conidio.
- ❖ **Clamidoconidio:** conidio tálico, redondo de pared gruesa y de gran tamaño, producido por modificación de una célula hifal preexistente, considerada de reproducción o de resistencia. También se le denomina como clamidospora.
- ❖ **Artroconidias:** conidio tálico producido por fragmentación de la hifa y que se libera por un proceso de rexólisis o de esquizólisis.
- ❖ **Hongos filamentosos:** hongos de aspecto algodonoso que en general se desarrollan como saprofitos.

- ❖ **Macroconidia:** el mayor de dos tipos de conidios producidos de la misma manera por el mismo hongo de cinco micras y que generalmente tiene septos.
- ❖ **Fiálide:** estructura conidiógena generalmente en forma de botella en la cual se producen los conidios en forma basípeta; el primer conidio es holoblástico y los siguientes son enteroblásticos.
- ❖ **Conidio:** propágulo originado por un proceso de reproducción asexual.
- ❖ **Conidióforo:** hifa especializada sobre la cual se originan directa o indirectamente los conidios.
- ❖ **Esclerote:** masa densa de hifas o pseudoparénquimas que forma una unidad reproductora.
- ❖ **Métula:** rama estéril situada debajo de las fiálides en los géneros *Aspergillus sp.* y *Penicillium sp.*
- ❖ **Esporodoquio:** estructura análoga a los apotecios pero productora de conidios.
- ❖ **Dematiaceo:** hongo provisto de pigmento marrón oscuro o negro, perteneciente a la familia dematiaceae.
- ❖ **Anélide:** célula conidiógena generalmente en forma de botella, caracterizada por presentar una cicatriz en forma de anillo después de cada conidiación.
- ❖ **Esporangióforo:** hifa especializada portadora de un esporangio.
- ❖ **Esporangio:** estructura generalmente vesiculosa que contiene a las esporangiosporas.
- ❖ **Apófisis:** parte abultada de un esporangióforo inmediatamente por debajo de la columnela.
- ❖ **Estolón:** hifa horizontal al sustrato, presente en los mucorales, que comunica a dos esporangióforos y de la cual se pueden originar los rizoides.
- ❖ **Rizoide:** rama corta y delgada de un talo semejante a una raíz vegetal.

- ❖ **Rexólisis:** con referencia a la secesión conidial, ruptura circuncisial de la pared celular por debajo del septo basal del conidio. La ruptura puede resultar por tensión mecánica, actividad lítica, enzimática o ambas.
- ❖ **Esquizolisis:** proceso enzimático de separación conidial conidio-célula conideógena o conidio-conidio, a través de la fisión de un septo doble.

2.1.9 Responsabilidades

Coordinadora de la Sección de Micología. Micólogo Médico, Especialista a cargo del área Micología.

2.2 Marco Conceptual

En el marco conceptual se identifican y señalan los enfoques conceptuales, temas, tópicos y conceptos que se piensan abordar durante el proyecto de aplicación.

- ❖ **Micología:** Es el estudio de los hongos. La micología médica es una rama de la microbiología, interrelacionada con todas las ramas de la medicina, y tiene por objeto estudiar las enfermedades producidas por hongos y los hongos que la producen.
- ❖ **Hongos:** Constituyen un complejo y fascinante grupo de organismos, tan grande que se calculan entre 100 a 300 000 especies; viven en los medios más variados y sólo alrededor de 100 son patógenos para mamíferos, pero también hay patógenos de vegetales, insectos (entógenos) o de otros hongos (micoparásitos), unos pocos cientos son hongos oportunistas. En seres humanos hay micosis como tiña de pies y candidosis que se consideran tan frecuentes como el resfriado común; se desconoce

la incidencia verdadera pues estas enfermedades no siempre son notificadas.

- ❖ **Micosis:** Son infecciones causadas por hongos microscópicos, toman su nombre de la parte del organismo que invaden (onicomicosis, O= infección por hongos en las uñas) (dermatomicosis, O= infección por hongos en la piel) o del hongo que las causa (coccidiomicosis, O= micosis causada por el hongo *Coccidioides immitis*) (Histoplasmosis O= micosis causada por el hongo *Histoplasma capsulatum*). Los agentes productores de micosis son alrededor de 100 y pueden ser de origen endógeno y exógeno.

- ❖ **Manual de procedimientos:** Un manual de procedimientos es un documento que contiene la descripción de actividades que deben seguirse en la realización de las funciones de una unidad administrativa, o de dos o más de ellas. El manual incluye además los puestos o unidades administrativas que intervienen precisando su responsabilidad y participación. Suelen contener información y ejemplos de formularios, autorizaciones o documentos necesarios, maquinas o equipo de oficina a utilizar y cualquier otro dato que pueda auxiliar al correcto desarrollo de las actividades dentro de la empresa. En el se encuentra registrada y transmitida sin distorsión la información básica referente al funcionamiento de todas las unidades administrativas, facilita las labores de auditoria, la evaluación y su vigilancia, la conciencia en los empleados y en sus jefes de que el trabajo se está realizando o no adecuadamente.

- ❖ **Estandarización:** Consiste en establecer la metodología que se usa en el laboratorio para el procesamiento de las diversas muestras biológicas con sospecha de infección fúngica, las

características técnicas inherentes a ella, con validaciones metodológicas, intra e interlaboratorios, adaptadas a los Sistemas de calidad y programas de acreditación. Co la estandarización se consigue un mejoramiento en el diagnóstico, que debe disminuir la prevalencia de patologías fúngicas no tratadas, detectar tempranamente los nuevos agentes oportunistas y colaborar en establecer la real epidemiología de los hongos en nuestro país.

- ❖ **Manual de organización:** Documento que contiene información detallada referente al directorio administrativo, antecedentes, legislación, atribuciones, estructura y funciones de las unidades administrativas que integran la institución, señalando los niveles jerárquicos, grados de autoridad y responsabilidad, canales de comunicación y coordinación; asimismo, contiene organigramas que describen en forma gráfica la estructura de organización.

- ❖ **Estructura orgánica:** Es la disposición sistemática de los órganos que integran una unidad, conforme a criterios de jerarquía y especialización, ordenados y codificados de tal forma que sea posible visualizar los niveles jerárquicos y sus relaciones de dependencia.

- ❖ **Actividad:** Conjunto de acciones afines ejecutadas por una persona o una misma unidad administrativa, como parte de una función asignada.

- ❖ **Actividades productivas:** Son aquellas intrínsecas y esenciales para la ejecución del procedimiento que permiten con su desarrollo el logro de los objetivos establecidos.

- ❖ **Cadena de mando:** Es la relación (jerarquía de autoridad) entre las unidades administrativas que integran una estructura orgánica. Se extiende linealmente desde el área del titular hasta nivel del jefe de departamento.
- ❖ **Carga de Trabajo:** Es la que se establece de acuerdo con las funciones que se desarrollan en el desempeño de un cargo específico y conforme a los requerimientos exigidos para su ocupación.
- ❖ **Función:** Conjunto de actividades afines y coordinadas, necesarias para alcanzar los objetivos de una institución de cuyo ejercicio generalmente es responsable un órgano o unidad administrativa; se definen a partir de las disposiciones jurídico – administrativas.
- ❖ **Manual:** Documento que contiene en forma ordenada y sistemática, información y/o instrucciones sobre diversos temas o procedimientos de una organización.
- ❖ **Instrumento:** Es el recurso empleado para alcanzar un propósito.
- ❖ **Norma:** Ordenamiento imperativo y específico de acción que persigue un fin determinado, con la característica de ser rígido en su aplicación. Regla de conducta o precepto que regula la interacción de los individuos en una organización, así como la actividad de una unidad administrativa o de toda una institución. Generalmente la norma conlleva una estructura de sanciones para quienes no la observen.
- ❖ **Objetivo:** En términos de programación, es la expresión cualitativa de los propósitos para los cuales ha sido creado un programa; en

este sentido, el objetivo debe responder a la pregunta ¿para que? se formula y ejecuta dicho programa. También puede definirse como el propósito que se debe cumplir, y que especifica con claridad “el que” y el “para que” se proyecta y se debe realizar una determinada acción. Establecer objetivo significa predeterminedar que se quiere lograr.

- ❖ **Organización:** Es una unidad social, constituida en forma deliberada con fines y objetivos predeterminedos sobre una base de actuación de cierta permanencia que se rige por un orden normativo y se estructura alrededor de centros de poder y de decisión internos y externos, que regulan y controlan su operación para encaminar al cumplimiento de sus objetivos. La organización esta constituida por grupos de individuos que establecen relaciones impersonales de trabajo, determinan las divisiones y la especialización de las labores, y operan bajo una jerarquización formal de posiciones y cargos , diferenciando al individuo por el puesto, el papel o las actividades que le corresponde desempeñar. Toda la organización puede considerarse como un ente dinámico que mantiene nexos permanentes con el medio que lo rodea, al que a su vez influye en forma directa o indirecta en su funcionamiento.

- ❖ **Organigrama:** Representación gráfica de la estructura orgánica que debe reflejar en forma esquemática, la posición de las unidades administrativas que la componen los tramos de control, nivel jerárquico, canales formales de comunicación y coordinación así como las líneas de mando.

- ❖ **Política:** Criterios de acción que es elegido como guía en el proceso de toma de decisiones al poner en práctica o ejecutar las

estrategias, programas y proyectos específicos del nivel institucional.

- ❖ **Procedimiento:** Sucesión cronológica de operaciones concatenadas entre sí, que se constituyen en una unidad o tarea específica dentro de un ámbito predeterminado de aplicación.

- ❖ **Unidad Administrativa:** Cada uno de los órganos que integran una institución, con funciones y actividades propias que se distinguen y diferencian entre sí. Se conforman a través de una estructura orgánica específica y propia. Es aquella, a la que se le confieren atribuciones específicas en el instrumento jurídico correspondiente.

2.3 Marco Metodológico

El marco metodológico incluirá el tipo de investigación, el conjunto de métodos, técnicas, protocolos instrumentales y los procedimientos que nos permitirán obtener la información requerida en la investigación propuesta.

2.3.1 Tipo y Diseño de la Investigación

La investigación incluye las actividades que se realizan para generar nuevos conocimientos o resolver problemas. Cuando la investigación se emplea para generar nuevos conocimientos se le denomina investigación científica mientras que cuando se emplea para resolver problemas se suele denominar investigación aplicada (Yáber y Valarino, 2003). La investigación en la disciplina de gestión de empresas se puede clasificar en: (a) Investigación científica, (b) Investigación evaluativa, (c) Investigación- acción e (d) Investigación y desarrollo. Estos tipos de investigación se diferencian en su propósito, el tipo de problema que abordan y los verbos definen la principal acción que realizan.

El tipo de investigación del presente trabajo de acuerdo a la clasificación anterior es de tipo **Investigación y desarrollo** ya que tiene como propósito indagar sobre necesidades del ambiente interno o entorno de una organización, para luego desarrollar un producto o servicio que pueda aplicarse en la organización o dirección de una empresa o en un mercado. El problema se formula como un enunciado interrogativo que relaciona el producto o servicio a desarrollar y la necesidad por atender. Se fundamenta en el enfoque del diseño (Milani, 1997:13-29). Como ejemplo de los principales verbos de acción tenemos: Diseñar, rediseñar, desarrollar. Es un tipo de aplicación pertinente a los proyectos de aplicación en los programas de especialización en Gerencia.

2.3.2 Técnicas de recolección de Información:

Revisión Documental: Instrumento que consiste en la búsqueda y exploración exhaustiva y selectiva de bibliografía que contiene información detallada referente al directorio administrativo, antecedentes, legislación, atribuciones, estructura y funciones de las unidades administrativas que integran un laboratorio de micología, señalando los niveles jerárquicos, grados de autoridad y responsabilidad, canales de comunicación y coordinación; con el objeto de hacer una evaluación profunda del contenido y desarrollo del tema.

Lista de Cotejo: Es un instrumento que permite revisar o evaluar cualitativamente o cuantitativamente los objetos en un sitio determinado. Consiste en un listado de material (reactivos, equipos, etc.) al lado de los cuales se puede adjuntar un tic (marca, serial, cantidad, por ejemplo), una nota o un concepto. Su nombre en inglés es *checking list*, y es entendido básicamente como un instrumento de verificación.

Entrevistas: Encuentro y conversación entre dos o más personas para tratar un asunto determinado.

Encuesta: Método que consiste en obtener información de las personas encuestadas mediante el uso de cuestionarios diseñados en forma previa. Es un cuestionario estructurado que se da a una muestra de la población y está diseñado para obtener información específica de los entrevistados.

2.3.3 Etapas de la Investigación

Diagnostico

- ❖ Para determinar la Misión, Visión y Valores del laboratorio de Micología del Hospital Dr. Domingo Luciani, se hizo una revisión documental de los manuales de organización de otros servicios y de la misma institución así como de otras afines, para comparar y plantear nuevos conceptos, adaptadas a la situación actual de este laboratorio, así mismo, se realizaron entrevistas y encuestas al personal que aquí labora, para obtener información si conocen o no la misión, visión del laboratorio de micología y si saben enunciarla correctamente, (Anexo 1)
- ❖ Para evaluar el manual de cargo, se revisó el ya existente emitido por VICIPLADIN para personal del laboratorio y se adaptó a esta especialidad de micología medica, usando como referencia otros manuales de otros servicios e instituciones.
- ❖ Para evaluar los recursos económicos - financieros y materiales del laboratorio de Micología del Hospital Dr. Domingo Luciani, se hizo una lista de cotejo (anexo 2), de los materiales de este laboratorio, observando su funcionamiento, se revisaron los archivos existentes, estadísticas de materiales y equipos, se revisaron depósitos de reactivos, material de cristalería, material de trabajo administrativo y todo lo perteneciente a esta área, y se unificó en

una única lista de manera de organizar y conocer el inventario de esta unidad acertadamente.

- ❖ Para evaluar los procesos y procedimientos para el análisis y resultados de esta unidad, se revisaron las técnicas para toma de muestras, recepción, procesamiento, análisis y emisión de resultados, y se crearon flujogramas para hacer más fácil y comprensible estas operaciones.

Desarrollo

- ❖ Para definir la Misión, Visión, Valores del laboratorio de Micología del Hospital Dr. Domingo Luciani, se concluyó después de una exhaustiva revisión en la fase de diagnóstico, y se plasmó electrónicamente en un documento escrito, para su posterior difusión y puesta en práctica, por parte del personal que aquí labora, ya que por medio de las encuestas realizadas se determinó que la mayoría del personal no conoce la misión y la visión de la sección.
- ❖ Para definir el manual de cargo de este servicio, una vez pasado por la fase de diagnóstico el manual de VICIPLADIN, se adaptó al personal que labora en esta área, amoldándose a los diversos procedimientos que aquí se realizan, quedando plasmado en un documento escrito para ser seguido por el personal de esta área.
- ❖ Para establecer los recursos económicos - financieros y materiales del laboratorio de Micología del Hospital Dr. Domingo Luciani, una vez pasado por la fase de diagnóstico se procedió a realizar una única lista final de todos los recursos existentes en esta área, eliminando aquellos productos vencidos o fuera de uso de este laboratorio.
- ❖ Para definir los procesos y procedimientos para el análisis y resultados de esta unidad, una vez efectuada la fase de diagnóstico se procedió a trazar un flujograma de cada uno de

ellos, en un documento escrito que especifica técnicas para, toma de muestras, recepción, procesamiento, análisis y emisión de resultados, para así unificar criterios al respecto y expresarlos en una forma más fácil y comprensible.

2.4 Consideraciones éticas y legales

Constituyen las consideraciones éticas y el marco jurídico del proyecto.

2.4.1. Consideraciones éticas

- ❖ Conocimiento y Experiencia.
- ❖ Confidencialidad
- ❖ Respeto
- ❖ Competencia e Integridad.
- ❖ Ética Cívica, Profesional y Empresarial.
- ❖ Derechos Humanos y Justicia Social.
- ❖ Libertad, Igualdad y Solidaridad.
- ❖ Responsabilidad Profesional.
- ❖ Contribución al Conocimiento Científico.

2.4.2 Consideraciones Legales

- ❖ Constitución de la Republica Bolivariana de Venezuela
- ❖ Plan de Desarrollo Económico-Social de la Nación 2001-2007
- ❖ Ley Orgánica del Sistema de Seguridad Social
- ❖ Ley de Salud
- ❖ Ley del Sistema Venezolano de Calidad
- ❖ Ley Orgánica de la Administración Publica
- ❖ Ley Orgánica de la Administración Financiera del Sector Publico

- ❖ Decreto con Fuerza de Ley Orgánica de Planificación
- ❖ Ley de Ejercicio del Bioanálisis
- ❖ Normas de Calidad y Competencia para Laboratorios Clínicos (ISO 15189: 2003 SENCAMER)

CAPITULO III. RESULTADOS

3.1 Misión

Proporcionar resultados confiables y oportunos de nuestros análisis de laboratorio, de muestras biológicas con sospecha de infección micótica, que fueren requeridos por el clínico para contribuir a la prevención, diagnóstico y terapéutica de las enfermedades, y así restituir la salud de toda la población que acude al laboratorio de Micología.

3.2 Visión

Constituirnos en el laboratorio de micología más reconocido por los profesionales del área de la salud y por los pacientes por ofrecer análisis clínicos de calidad con una atención personalizada; con equipos automatizados de última generación, dirigidos a su área de influencia geográfica.

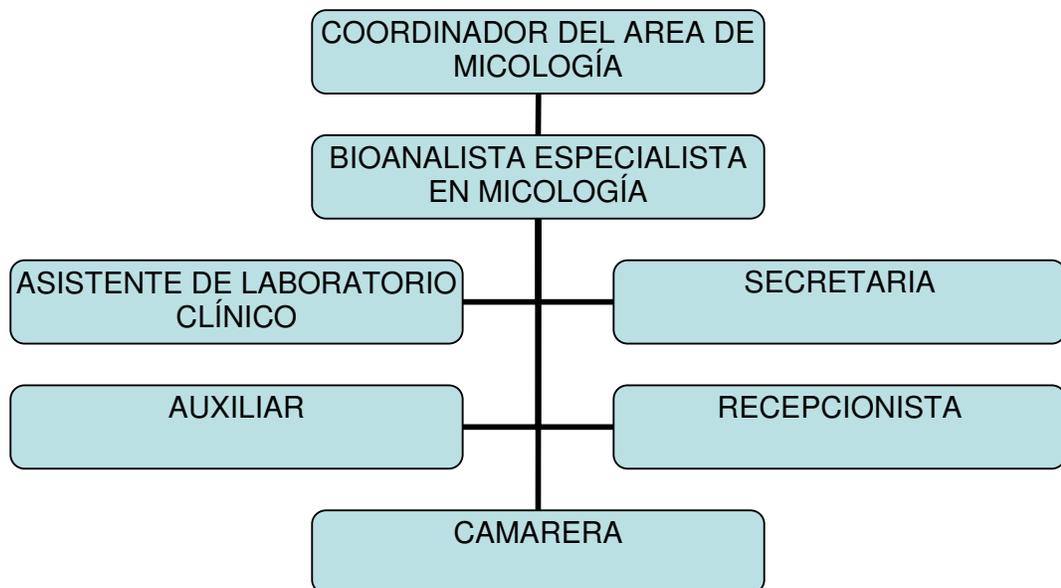
3.3 Valores

Los trabajadores del Laboratorio de Micología cumplen sus actividades bajo el marco de principios fundamentales como:

- ❖ Excelencia con vocación de servicio a la comunidad, basada en calidad, confidencialidad, responsabilidad, solidaridad, conciencia, ética y honestidad.
- ❖ Libertad de Investigación para lograr un trabajo productivo con consistencia, rigor científico y competencia internacional.
- ❖ Autonomía de gestión y transparencia en su operación y manejo de recursos. Cultura de evaluación interna y externa.

- ❖ Equidad en las oportunidades; Interacción con la sociedad y respeto por la dignidad de las personas.

3.4 Organigrama estructural ideal para la sección de Micología del hospital Dr. Domingo Luciani



3.5 Recursos: Económicos, Financieros y Humanos

3.5.1 Recursos Económicos – Financieros

- ❖ Se cuenta con el apoyo financiero del Instituto Venezolano de los Seguros Sociales, un segmento de la partida destinada para el servicio de Bioanálisis.

- ❖ Se cuenta con apoyo de insumos materiales aportados por entidades que apoya protocolos de investigación científica.

3.5.2 Recursos Humanos. Manual Descriptivo

La clase del cargo esta descrita mediante una especificación, la cual esta constituida básicamente por la denominación de la clase; características del trabajo; tareas típicas; requisitos mínimos exigidos de educación y experiencia y conocimientos, habilidades y destrezas. (Artículo 40 Ley de Carrera Administrativa).

Denominación de la clase

Es el nombre oficial que se le asigna al cargo.

Características del trabajo

Es la descripción de la naturaleza del trabajo y de su nivel de dificultad, así como el tipo de supervisión ejercida y recibida.

Tareas típicas

Es la enumeración de las actividades que suelen desempeñarse con mayor frecuencia en los cargos contenidos en una determinada clase.

De ninguna manera debe interpretarse que las tareas descritas son las únicas que deben desempeñarse en los cargos ubicados bajo esta denominación.

Requisitos Mínimos

Es el nivel mínimo de educación y experiencia, de conocimientos, habilidades y/o destrezas exigidos en una clase de cargo, que permite que el aspirante desempeñe satisfactoriamente el conjunto de deberes y responsabilidades asignados.

Educación

Es el conocimiento adquirido a través de la educación formal e indispensable para el desempeño del cargo. En este manual se consideran en forma general los niveles educativos reconocidos por el estado venezolano; a saber; primaria, secundaria, técnica, universitaria y postgrado.

Experiencia

Es el conocimiento adquirido mediante el desempeño de trabajos afines al descrito en la clase de cargo.

En algunos casos se establecen diversas “alternativas” de requisitos de educación y experiencia, que son entre sí equivalentes. La primera alternativa significa los requisitos que se piden a los candidatos que desean ingresar a la Administración Pública. La segunda alternativa garantiza la carrera dentro de ésta, por lo cual sólo exige un determinado número de años de experiencia en el desempeño del cargo de nivel inmediato inferior. No obstante, en muchas clases se incluyen alternativas intermedias que sólo tiene como fin ampliar el reclutamiento de personal tanto interno como externo y generalmente se indican requisitos equivalentes de educación y experiencia.

Conocimientos, Habilidades y Destrezas

Se entiende por conocimiento aquella información adicional que el individuo debe poseer para poder realizar adecuadamente el trabajo, tal como procedimientos, normas, prácticas de trabajo, leyes, reglamento, políticas, teorías, conceptos, principios y procesos.

Este tipo de conocimiento presenta cierta gradación dependiendo de la complejidad y mayor nivel de los cargos. Así, se usan los adjetivos “buen”, “considerable”, “amplio”, conjuntamente con la palabra conocimiento, para medir dicha complejidad. Ejemplo: En una clase de cargo de nivel I, se exige, “buen conocimiento de la Ley de Trabajo”,

mientras que en la clase nivel III se pide “conocimiento amplio de la Ley del Trabajo”, lo que quiere significar que el funcionamiento que vaya a desempeñar dicho cargo debe tener completo dominio de este instrumento legal.

Se entiende por habilidad la capacidad intelectual requerida para el desempeño de una determinada tarea del cargo.

Se entiende por destreza la capacidad psicomotora específica requerida para el desempeño del cargo.

En algunas clases se incluye la sección “Licencias y Certificados”, porque el desempeño de ciertos cargos en la Administración Pública exige la presentación de esta certificación como requisito esencial.

A) Coordinador del área de Micología

Características del trabajo

Con autoridad delegada por la Dirección del Servicio, realiza trabajos de dificultad considerable, siendo responsable por planificar, dirigir coordinar y supervisar las actividades de una unidad encargada de efectuar diversas pruebas micológicas, y realiza tareas afines según sea necesario.

Tareas Típicas

- ❖ Planifica, dirige, coordina y supervisa el trabajo de la unidad a su cargo.
- ❖ Evalúa los resultados de las pruebas micológicas realizadas por el personal profesional.
- ❖ Presenta informes de las actividades realizadas por la unidad a su cargo.

- ❖ Supervisa y reporta a la Dirección del Servicio sobre el suministro y los servicios técnicos de su sección.
- ❖ Supervisa e Informa a la Dirección del Servicio sobre el mantenimiento y calibración de equipos.
- ❖ Supervisa las condiciones ambientales de trabajo de su sección.
- ❖ Informa a la Dirección del Servicio sobre accidentes, ocurridos en su sección y genera las acciones correctivas que estén a su alcance.
- ❖ Informa a la Dirección del Servicio sobre las necesidades de personal de su sección.
- ❖ Supervisa y evalúa conjuntamente con la Dirección del Servicio al personal a su cargo.
- ❖ Establece y supervisa las metodologías y los procedimientos de su sección y los hace conocer al personal a su cargo, médicos y pacientes.
- ❖ Asegura conjuntamente con el coordinador de la calidad la gestión de calidad en su sección.
- ❖ Recopila datos estadísticos y epidemiológicos.
- ❖ Desarrolla, supervisa y ejecuta proyectos de docencia e Investigación científica en Micología.
- ❖ Realiza reuniones periódicas con el personal de su sección para informar o generar discusiones.
- ❖ Genera Informes periódicos de actividades.
- ❖ Participa en programas de formación de la institución.
- ❖ Las demás que por la naturaleza de su cargo, le puedan ser confiadas por su superior inmediato.

Requisitos mínimos exigidos

Educación y experiencia

Graduado en una universidad reconocida con el título de Licenciado en Bioanálisis, más terminación satisfactoria de un curso de

post grado en el campo de la Micología Médica, más 2 años de experiencia progresiva en la especialidad de Micología.

Conocimientos, Habilidades y Destrezas Requeridos

- ❖ Conocimiento amplio de la metodología, técnica y teoría de la Micología.
- ❖ Habilidad para supervisar personal.
- ❖ Habilidad para planificar, organizar y controlar las actividades de una unidad.
- ❖ Habilidad para preparar informes
- ❖ Destreza en el manejo de instrumental de laboratorio, especialmente el usado en Micología.

Licencias y Certificados

Estar inscrito en el Colegio de Bioanalistas.

B) Bioanalista Especialista en Micología

Características del trabajo

Bajo supervisión general, realiza trabajos de dificultad promedio en la rama de la Micología, supervisa un grupo pequeño de personal no profesional que realiza labores de Laboratorio, y realiza tareas afines según sea necesario.

Tareas Típicas

- ❖ Efectúa pruebas microbiológicas en la especialidad de Micología
- ❖ Efectúa pruebas de laboratorio en muestras, a fin de descubrir la presencia de microorganismos de origen micológico, en fluidos biológicos, aguas, alimentos u otros medios, y así controlar y eliminar las fuentes de los mismos.

- ❖ Toma muestras y prepara medios de cultivos.
- ❖ Inocula animales para experimentación
- ❖ Interviene en el adiestramiento del personal de laboratorio.
- ❖ Supervisa el trabajo del personal a su cargo
- ❖ Informa de manera oportuna el resultado de los análisis.
- ❖ Informa al Coordinador de área sobre las necesidades de insumos.
- ❖ Participa en proyectos de investigación.
- ❖ Participa activamente en la implantación del Sistema de Gestión de la Calidad, programas de seguridad, docencia, adiestramiento y educación continúa.
- ❖ Las demás que por la naturaleza de su cargo, le puedan ser confiadas por su superior inmediato.

Requisitos mínimos exigidos

Educación y Experiencia

Graduado en una universidad reconocida con el título de Licenciado en Bioanálisis, más terminación satisfactoria de un curso de post- grado en el campo específico de la Micología.

Conocimientos, Habilidades y Destrezas Requeridos

- ❖ Conocimiento de la teoría, métodos y técnicas de Micología
- ❖ Habilidad para realizar pruebas micológicas y para sacar conclusiones precisas de sus pruebas.
- ❖ Habilidad para tomar muestras destinadas a estudios micológicos.
- ❖ Habilidad para preparar medios de cultivo.
- ❖ Habilidad para preparar informes.
- ❖ Destreza en el manejo del instrumental de laboratorio, especialmente el usado en Micología.

Licencias y Certificados

Estar inscrito en el Colegio de Bioanalistas.

C) Asistente de Laboratorio Clínico de Micología

Características del trabajo

Bajo supervisión inmediata de un profesional de Bioanálisis, realiza trabajos de dificultad rutinaria en un laboratorio clínico de Micología, y realiza tareas afines según sea necesario.

Tareas Típicas

- ❖ Selecciona y prepara material para cada tipo de examen.
- ❖ Recibe, clasifica, identifica y distribuye los envases con las muestras
- ❖ Clasifica los diferentes tipos de ajustes y otro material para la recolección de muestras.
- ❖ Prepara tubos con o sin anticoagulante para extracción de sangre a pacientes.
- ❖ Prepara tubos con agua destilada estéril para pruebas de sensibilidad y conservación de cepas.
- ❖ Toma muestra sanguínea y demás sitios anatómicos a pacientes.
- ❖ Coloca en la centrifuga muestras de sangre, orina y líquidos biológicos que ameriten centrifugación.
- ❖ Controla la temperatura adecuada de hornos, estufas y baños de María.
- ❖ Prepara medios de cultivos, soluciones, reactivos y colorantes.
- ❖ Distribuye medios de cultivo en placas y tubos de acuerdo a indicaciones del profesional de Bioanálisis.
- ❖ Maneja los esterilizadores y autoclave.
- ❖ Prepara láminas para exámenes en fresco y hace coloraciones sencillas para ser observadas por el profesional de Bioanálisis.
- ❖ Identifica tubos y placas con su correspondiente código para siembra de las muestras.
- ❖ Lleva el registro de información relativos a pacientes y resultados de análisis en las plantillas correspondientes si así se le indica.

- ❖ Maneja baños de maría, destiladores, estufas, esterilizadores, autoclaves y cualquier otro equipo que se le autorice.
- ❖ Pesa en balanza sustancias químicas.
- ❖ Prepara material de laboratorio para su esterilización.
- ❖ Lleva registro de pacientes atendidos.
- ❖ Solicita anticipadamente los suministros del material que requiera.
- ❖ Colabora en proyectos de investigación que se desarrollen en el Servicio.
- ❖ Contribuye en la realización y mantenimiento de la micoteca.
- ❖ Participa activamente en la implantación del Sistema de Gestión de la Calidad, programas de seguridad, docencia, adiestramiento y educación continúa.
- ❖ Las demás que por la naturaleza de su cargo, le puedan ser confiadas por su superior inmediato.

Requisitos Mínimos exigidos

Ecuación y Experiencia

- A.** Bachiller, mas curso de auxiliar de Laboratorio, de 1 año de duración, dictado por el Ministerio de Sanidad y Asistencia Social, más 1 año de experiencia en trabajo profesional de Laboratorio Clínico.
- B.** 2 años como Asistente de Laboratorio Clínico I.

Conocimientos, Habilidades y Destrezas Requeridos

- ❖ Conocimiento de las Técnicas de laboratorio de Micología
- ❖ Conocimiento de las normas de bioseguridad en laboratorio en Micología
- ❖ Conocimiento de la nomenclatura usada en el laboratorio de Micología
- ❖ Conocimiento de las normas de recolección, conservación y envío de muestras.

- ❖ Habilidad para tratar en forma cortés y efectiva con pacientes y público en general.
- ❖ Habilidad para seguir instrucciones orales y escritas.
- ❖ Destreza en el manejo de equipos de laboratorio, cristalería e instrumentos.
- ❖ Destreza en el manejo de reactivos que presentan peligrosidad.
- ❖ Destreza en el manejo de muestras biológicas.
- ❖ Conocimientos del grado de peligrosidad que representan algunos cultivos de hongos, que ponen en riesgo la vida de quien los manipula.

D) Secretaria del área de Micología

Características del trabajo

Bajo supervisión inmediata de un profesional de Bioanálisis, realiza trabajos de dificultad rutinaria en un laboratorio clínico de Micología, y realiza tareas afines según sea necesario.

Tareas Típicas

- ❖ Bajo supervisión inmediata de la Dirección del Servicio, realiza trabajos secretariales.
- ❖ Realiza oficios, memorándum, formularios, documentos, borradores, cuadros y otros documentos que le sean encomendados.
- ❖ Recibe, distribuye y despacha la correspondencia a la sección de Micología.
- ❖ Lleva la agenda y el control de las audiencias de la sección.
- ❖ Recibe y atiende a visitantes y público en general.
- ❖ Efectúa y recibe llamadas telefónicas.
- ❖ Mantiene, organiza y administra los archivos de la sección.

- ❖ Solicita anticipadamente los suministros del material que requiera la sección.
- ❖ Bajo supervisión de la Dirección del Servicio lleva el control de las citas para Micología.
- ❖ Participa en la entrega de los resultados de análisis de Micología.
- ❖ Participa activamente en la implantación del Sistema de Gestión de la Calidad, programas de seguridad, docencia, adiestramiento y educación continúa.
- ❖ Las demás que por la naturaleza de su cargo, le puedan ser confiadas por su superior inmediato.

Requisitos Mínimos exigidos

Educación y Experiencia

Bachiller, mas curso de secretariado, más 1 año de experiencia en trabajo profesional de Laboratorio Clínico.

Conocimientos, Habilidades y Destrezas Requeridos

- ❖ Conocimiento de la nomenclatura usada en el laboratorio de Micología
- ❖ Conocimiento de las normas de bioseguridad en laboratorio en Micología
- ❖ Conocimiento de las normas de recolección, conservación y envío de muestras.
- ❖ Habilidad para tratar en forma cortés y efectiva con pacientes y público en general.
- ❖ Responsable, puntual, respetuosa y atenta.
- ❖ Habilidad para seguir instrucciones orales y escritas.
- ❖ Destreza en el manejo de computadoras y equipos para transcribir datos.
- ❖ Destreza en atención telefónica, servicio al cliente y manejo de documentación.

- ❖ Destreza en el manejo de muestras biológicas.
- ❖ Conocimientos del grado de peligrosidad que representan algunos cultivos de hongos, que ponen en riesgo la vida de quien los manipula.

E) Recepcionista de Laboratorio clínico de Micología

Características del trabajo

Bajo supervisión inmediata de un profesional de Bioanálisis, realiza trabajos de dificultad rutinaria en un laboratorio clínico de Micología, y realiza tareas afines según sea necesario.

Tareas Típicas

- ❖ Bajo supervisión inmediata de la Dirección del Servicio realiza trabajos y tareas propias de su actividad.
- ❖ Atiende y/o guía a pacientes y usuarios que acuden al Servicio de Bioanálisis
- ❖ Regula el ingreso de usuarios al Servicio.
- ❖ Participa en el control de citas.
- ❖ Recibe, chequea y codifica las muestras de laboratorio.
- ❖ Mantiene, organiza y administra los archivos de solicitudes de exámenes y resultados de análisis.
- ❖ Participa en la entrega de resultados de análisis de Micología.
- ❖ Efectúa y recibe llamadas telefónicas.
- ❖ Solicita anticipadamente los suministros de material que requiera.
- ❖ Participa activamente en la implantación del Sistema de Gestión de la Calidad, programas de seguridad, docencia, adiestramiento y educación continúa.

- ❖ Las demás que por la naturaleza de su cargo, le puedan ser confiadas por su superior inmediato

Requisitos Mínimos exigidos

Educación y Experiencia

Bachiller, mas curso de secretariado o asistente de laboratorio clínico o carrera técnica con experiencia laboral en hospitales, más 1 año de experiencia en trabajo profesional de Laboratorio Clínico.

Conocimientos, Habilidades y Destrezas Requeridos

- ❖ Conocimiento de la nomenclatura usada en el laboratorio de Micología
- ❖ Conocimiento de las normas de bioseguridad en laboratorio en Micología
- ❖ Conocimiento de las normas de recolección, conservación y envío de muestras.
- ❖ Habilidad para tratar en forma cortés y efectiva con pacientes y público en general.
- ❖ Responsable, puntual, respetuoso y atento.
- ❖ Habilidad para seguir instrucciones orales y escritas.
- ❖ Destreza en el manejo de computadoras y equipos para transcribir datos.
- ❖ Buena presencia.
- ❖ Destreza en atención telefónica, servicio al cliente y manejo de documentación.
- ❖ Destreza en el manejo de muestras biológicas.
- ❖ Conocimientos del grado de peligrosidad que representan algunos cultivos de hongos, que ponen en riesgo la vida de quien los manipula.

F. Auxiliar de laboratorio clínico de Micología

Características del trabajo

Bajo supervisión, orientación y responsabilidad inmediata de un profesional de Bioanálisis, realiza trabajos de dificultad sencilla o básica en un laboratorio clínico de Micología, y realiza tareas afines según sea necesario.

Tareas Típicas

- ❖ Bajo supervisión inmediata de la Dirección del Servicio realiza trabajos y tareas propias de su actividad.
- ❖ Obtiene, lava, esteriliza, organiza, almacena y distribuye el material de laboratorio de Micología.
- ❖ Prepara, organiza y distribuye los envases para el descarte del material de cristalería y desechos de la sección.
- ❖ Prepara organiza y distribuye aplicadores, gasa y algodón para uso general y microbiológico.
- ❖ Desinfecta mesones, estantes, neveras y el mobiliario del laboratorio.
- ❖ Opera el destilador y participa en la obtención de agua destilada.
- ❖ Participa activamente en el manejo y disposición segura de los desechos
- ❖ Solicita anticipadamente los suministros de material que requiera.
- ❖ Participa activamente en la implantación del Sistema de Gestión de la Calidad, programas de seguridad, docencia, adiestramiento y educación continua.
- ❖ Las demás que por la naturaleza de su cargo, le puedan ser confiadas por su superior inmediato

Requisitos Mínimos exigidos

Ecuación y Experiencia

Bachiller, mas haber aprobado un programa de capacitación de manejo de cristalería y desechos biológicos, con experiencia laboral en hospitales, más 1 año de experiencia en trabajo de Laboratorio Clínico.

Conocimientos, Habilidades y Destrezas Requeridos

- ❖ Conocimiento de las normas de bioseguridad en laboratorio en Micología.
- ❖ Conocimiento en las normas y técnicas de lavado de cristalería.
- ❖ Conocimiento en el aseo de mesones y laboratorio en general.
- ❖ Conocimiento en el manejo de productos químicos de limpieza para el área de Micología, como gerdex, cloro, fenol, etc.
- ❖ Responsable, puntual, respetuoso.
- ❖ Habilidad para seguir instrucciones orales y escritas.
- ❖ Destreza en el manejo de muestras biológicas.
- ❖ Conocimientos del grado de peligrosidad que representan algunos cultivos de hongos, que ponen en riesgo la vida de quien los manipula.

G) Camarera o Personal de Aseo del área de Micología

Características del trabajo

Bajo supervisión inmediata de un profesional de Bioanálisis, realiza trabajos de dificultad sencilla o básica en un laboratorio clínico de Micología, y realiza tareas afines según sea necesario.

Tareas Típicas

- ❖ Bajo supervisión inmediata de la Dirección del Servicio realiza trabajos y tareas propias de su actividad.
- ❖ Desinfecta y limpia pisos y paredes del laboratorio de Micología
- ❖ Prepara organiza y distribuye los envases para el descarte de material
- ❖ Participa activamente en el manejo y disposición segura de los desechos
- ❖ Solicita anticipadamente los suministros de material que requiera
- ❖ Participa activamente en la implantación del Sistema de Gestión de la Calidad, programas de seguridad, docencia, adiestramiento y educación continúa.
- ❖ Las demás que por la naturaleza de su cargo, le puedan ser confiadas por su superior inmediato

Requisitos Mínimos exigidos

Educación y Experiencia

Bachiller, mas haber aprobado un programa de capacitación de limpieza y manejo de desechos biológicos, con experiencia laboral en hospitales.

Conocimientos, Habilidades y Destrezas Requeridos

- ❖ Conocimiento de las normas de bioseguridad en laboratorio en Micología.
- ❖ Conocimiento en las normas de limpieza de un laboratorio clínico.
- ❖ Conocimiento en el aseo de mesones y laboratorio en general.
- ❖ Conocimiento en el manejo de productos químicos de limpieza para el área de Micología, como gerdex, cloro, fenol, etc.
- ❖ Responsable, puntual, respetuoso.

- ❖ Habilidad para seguir instrucciones orales y escritas.
- ❖ Destreza en el manejo de muestras biológicas.
- ❖ Conocimientos del grado de peligrosidad que representan algunos cultivos de hongos, que ponen en riesgo la vida de quien los manipula.

3.5.3 Recursos Materiales

Se presenta a continuación un inventario de los equipos, materiales, medios y reactivos.

3.5.3.1 Inventario de equipos y materiales

Cantidad	Equipos	Marca	Serial	Bienes Nacionales
2	Microscopios	AO Scientific		335629/335521
1	Estufa a 25 °C	Napco Model 332		294497
1	Estufa a 35 °C	Cetea		196393
1	Pipeta de 25 µl	Gilson		
1	Pipeta de 100 µl	Gilson		
1	Pipeta de 50 – 200 µl	FINPIPETTE		
1	Pipeta de 200 - 1000 µl	FINPIPETTE		
1	Pipeta de 200 µl	Stat-pet		
1	Caja de puntas con Pistón (100 µl)	Gilson		
1	Reloj Electrónico	Radio Shack		

Cantidad	Equipos	Marca	Serial	Bienes Nacionales
1	Centrífuga	CU 5000		335640
1	Nevera	Jennett		335492
2	Sillas con espaldar			
1	Banquito de Metal			
1	Mango de bisturí nº 11			
1	Caja de hojas de bisturí nº 11			
18	Pipetas de vidrio de 10 ml			
16	Pipetas de vidrio de 5 ml			
22	Pipetas de vidrio de 2 ml			
25	Pipetas de vidrio de 1 ml			
3	Termómetros			
5	Vasos para colorear láminas con tapas			
3	Bombonas de metal con tapas medianas			
1	Bombona de metal sin tapa grande			

Cantidad	Equipos	Marca	Serial	Bienes Nacionales
1	Lámpara de pie		10947	
1	Lámpara de mesa			418791
1	Baño de maría	Precision		
8	Gradillas de alambre tubos grandes			
1	Asa de platino			
1	Aguja de platino			
1	Colony Coulter	Darkfield Quebec		335496
1	Campana de Flujo laminar	La Vasconia		382181
7	Cajas de Placas de Peltri	Mini Plast Eins-shemer		
1	Caja Micro Scan Inoculadores-D descartables			
1	Multi Timer	Coulter Electronics	L31209	
1	Caja de Recolectores de Muestras Biológicas			
1	Caja de Tubos cónicos de plásticos			

Cantidad	Equipos	Marca	Serial	Bienes Nacionales
3	Cajas de Tubos			
1	Teléfono	LG		
1	Computadora	IBM		
1	Impresora	HP deskjet 920		
1	Lector de Placas	BIOMIC Vision		
1	Vaso de Precipitado de 80 ml	Pirex		
1	Vaso de Precipitado de 50 ml	Pirex		
1	Vaso de Precipitado de 25 ml	Pirex		
3	Cilindro de 100 ml	Pirex		
2	Cilindro de 500 ml	Pirex		
2	Cilindro de 25 ml	Pirex		
3	Balón de 1000 ml			
1	Balón de 250 ml			
4	Portapipetas de plásticos			
2	Trípodes de metal			

Cantidad	Equipos	Marca	Serial	Bienes Nacionales
8	Gradillas de Metal para tubos pequeños			
6	Cestas de Metal			
2	Embudos plásticos grandes			
5	Embudo plasticos pequeños			
3	Frascos de vidrio graduados sin tapa 500 ml			
1	Embudo de vidrio pequeño			
7	Caja de cápsulas de Peltri			
1	Papelera			
1	Digital Colorimeter	Chemtrix type 24	1670	335538
1	Baño de María	Nacional Modelo 220		294538
3	Caja de tubo de vidrio	14 x 100		
8	Inyectadoras de vidrio	20 ml		
1	Inyectadoras de vidrio	50 ml		

3.5.3.2 Inventario de Medios y Reactivos

Cantidad	Reactivos	Marca	Capacidad
1	Frasco de Sabouraud dextrosa agar	Hymedia	500 gr.
1	Frasco de Sabouraud dextrosa agar	Merck	500 gr.
3	Frasco de Fungibiotic agar	Hymedia	500 gr.
1	Frasco de Fungibiotic agar	Hymedia	250 gr.
1	Frasco de Oxgall deluprated bile	BBL	500 gr.
6	Frasco de Micological broth		454 gr.
1	Kalium hidricum pursimun (perlas de KOH 86%)	Eka Kemi	
4	Cajas (20 paneles) Rapid yeast ID panel	Dade Behrigh	
1	Caja de agua destilada. 60 viales x 3 ml	Microscan	
1	Frasco de Peptidasa	Microscan	
1	Frasco de NaOH 0,05 N	Microscan	
2	Tapas cubre paneles	Microscan	
2	Cajas La- Sporoantibody sistem	IMMY	80 pruebas
1	Caja de Crypto- LA- test	Wampole lab	70 pruebas
1	Caja de Bichro- Latesx albicans	Lab Fumouse	60 pruebas
42	Cajitas de agarosa para serología	IMMY	
1	Frasco de Antígeno Histoplasma capsulatum	IMMY	1 ml
1	Frasco de Antígeno Paracoccidiodes brasiliensis	IMMY	1 ml
1	Frasco de Antígeno Coccidiodes inimitis	IMMY	1 ml

Cantidad	Reactivos	Marca	Capacidad
1	Frasco de Antígeno Aspergillus sp	IMMY	1 ml
1	Frasco de Antígeno Aspergillus Níger	IMMY	1 ml
1	Frasco de Antígeno Aspergillus nidulans	IMMY	1 ml
1	Frasco de Antígeno Aspergillus flavus	IMMY	1 ml
1	Frasco de Antígeno Aspergillus fumigatus	IMMY	1 ml
1	Frasco de Antígeno Aspergillus terreus	IMMY	1 ml
1	Frasco de Antígeno Blastomyces	IMMY	1 ml
1	Frasco de Antígeno Candida sp	IMMY	1 ml
1	Frasco de Anticuerpo Histoplasma capsulatum	IMMY	1 ml
1	Frasco de Anticuerpo Coccidioides immitis	IMMY	1 ml
1	Frasco de Anticuerpo Aspergillus sp	IMMY	1 ml
1	Frasco de Anticuerpo Aspergillus Níger	IMMY	1 ml
1	Frasco de Anticuerpo Aspergillus nidulans	IMMY	1 ml
1	Frasco de Anticuerpo Aspergillus flavus	IMMY	1 ml
1	Frasco de Anticuerpo Aspergillus fumigatus	IMMY	1 ml
1	Frasco de Anticuerpo Aspergillus terreus	IMMY	1 ml
1	Frasco de Anticuerpo Candida sp	IMMY	1 ml
2	Bandas intensificadoras fluid		
5	Cary Blair (medio de transporte) venc. 1990		500 gr.
1	Frasco de Aceite esencial de cedro		100 ml
1	Frasco de Aceite de Inmersión	Lab Relab	500 gr.
1	Frasco de Safranina		500 ml
1	Frasco de Lugol		500 ml
1	Frasco de Fascina		500 ml
1	Frasco de Giemsa		3 ml
1	Frasco de Lugol diluído 1/5		250 ml

Cantidad	Reactivos	Marca	Capacidad
1	Frasco de Metanol		250 ml
1	Frasco de Wright		500 ml
1	Frasco de Buffer de Wright pH 6,4		500 ml
1	Frasco de Yodo povidene		2 Lts
1	Galón de Agua desionizada		3 Lts
1	Frasco de Sabouraud maltosa agar		500 ml
1	Frasco de Alcohol etílico		500 ml
1	Frasco de Azul de Metileno		500 ml
1	Frasco de Safranina		50 ml
1	Frasco de Violeta Genciana		500 ml
1	Frasco de Fascina fenicada		500 ml
1	Frasco de alcohol al 96 %		100 ml
1	Frasco de Agar maltosa sabouraud		¼ libra
1	Frasco de Acido Fenico		500 gr.
1	Frasco de Corn meal agar		¼ libra
1	Frasco de Azul brillante		25 gr.
1	Frasco de Galactosa		100 gr.
1	Frasco de Glucosa	Merck	500 mg
1	Frasco de Dextrosa		500 gr.
1	Frasco de Lactosa		454 gr.
1	Frasco de Raffinose		100 gr.
1	Frasco de Microbiotic agar		454 gr.
1	Frasco de Alcohol Acetona		100 gr.
1	Frasco de Azul de metileno		250 ml
1	Frasco de Acido láctico		250 gr.
1	Frasco de Metanol		1 Lts.
1	Potassium Hydroxide-pallets		500 gr.
2	Frasco de Acido Acético glacial		1 Lts.
1	Frasco de parafina líquida		1 Lts.

Cantidad	Reactivos	Marca	Capacidad
1	Frasco de glicerina		1 Lts.
1	Frasco de Formaldehído		1 Lts.
1	Frasco de Etanol absoluto		2,5 Lts
1	Frasco de Xilol		1 Lts.
1	Frasco de Sabouraud Dextrosa broth		500 gr.
1	Frasco de Malosa		500 ml
1	Frasco de Inhibitory Mold agar		100 gr.
1	Frasco de Barbital	Merck	
1	Frasco de Melibiose		10 gr.
2	Frascos de Engon Agar		454 gr.
1	Frasco de Bacto Inositol		100 gr.
1	Frasco de Dulcitol		25 gr.
1	Frasco de Barbital sódico		500 gr.
1	Frasco de Glicina		100 gr.
1	Frasco de Natrium thiosulfat-Pentahydrat		500 gr.
1	Frasco de Tri-Natriumcityol-Dilydrat		500 gr.
1	Frasco de Potassium iodide		500 gr.
1	Frasco de Amido Black		25 gr.
1	Frasco de Amido Black		500 gr.
1	Frasco de Magrosium Sulfate		500 gr.
1	Frasco de Tri-Natriumcitiat – 2- hydrat		1 Kg.
1	Frasco de Nitrato Sódico		1 Kg.
1	Frasco de Di-Natriumtetraborat-Decahydrat		500 gr.
1	Frasco de Ácido Hydrodioric		500 ml
1	Frasco de Natriumchlorid		1 Kg.
1	Frasco de Skim Milk Powder		500 gr.

3.5.3.3 Ambiente físico: Plano del Laboratorio: (se anexará)

3.6 Procedimientos para obtención, transporte y conservación de muestras.

Fundamento del Método

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

Materiales

- ❖ Sindesmótomo
- ❖ Hojas de bisturí estériles
- ❖ Guantes descartables
- ❖ Portaobjetos
- ❖ Refrigerador
- ❖ Hisopos
- ❖ Tubos estériles
- ❖ Placas de Petri estériles
- ❖ Frascos estériles de boca ancha descartables
- ❖ Pinza de depilar
- ❖ Cinta adhesiva

Secuencia operativa

Precauciones de Seguridad Biológica

Consultar el Manual de Bioseguridad (MB)

Toma de muestra

Para optimizar la toma de muestras es necesario:

- ❖ Disponer de un protocolo de toma de muestra escrito, actualizado periódicamente
- ❖ Tomar las muestras asépticamente, utilizando contenedores estériles, remitirlas al laboratorio antes de las 2 horas y sembrarlas lo antes posible
- ❖ La muestra debe recogerse antes de iniciar el tratamiento y siempre de la parte activa de la lesión cuando se sospechan dermatoficias (micosis producidas por hongos Dermatofitos)
- ❖ Los hisopos deben ser evitados siempre que la lesión lo permita. Pero hay muestras (conducto auditivo, boca, faringe, vagina ó cérvix) que no pueden ser recogidas de otra manera.
- ❖ En el caso de heridas, drenajes o lesiones superficiales, debe limpiarse la zona previamente para evitar contaminaciones.
- ❖ Las muestras de lesiones cerradas y abscesos suelen ser de gran rendimiento. Deben ser aspiradas con jeringa y aguja y transferidas a un tubo o frasco estéril, prestando atención a la presencia de gránulos, si los hubiere en la muestra.
- ❖ En situaciones que requieran un estudio epidemiológico, debe establecerse la necesidad de toma de muestra ambiental, familiar o en animales.

3.6.1 Toma de muestra para diagnóstico de micosis superficiales

Las micosis superficiales se limitan a la piel, el pelo y las uñas. Otros procesos que afectan a las capas más superficiales de la piel son producidos por bacterias como en el eritrasma (*Corynebacterium minutissimum*) que se estudia clásicamente dentro de la Micología Médica y requiere habitualmente un diagnóstico diferencial con las micosis superficiales. Cuando es posible hablar con el paciente antes de acudir al laboratorio para tomarle la muestra, se le debe dar algunas indicaciones para mejorar la sensibilidad y especificidad del resultado del examen directo y del cultivo como:

1. Suspender el tratamiento por 10 a 15 días
2. No utilizar talcos o cremas, ojala 2 días antes del examen y solo utilizar agua y jabón.
3. Retirar el esmalte de las uñas 2 a 3 días antes del examen
4. No cortar las uñas en los días previos al examen.

Limpieza del área afectada: Antes de realizar la toma de muestra, la piel, pelos o uñas deben limpiarse con etanol (70%) para eliminar la flora bacteriana o exudación.

Recolección

Escamas: Borde de la lesión y contenido de las vesículas. En las lesiones descamativas, deben recogerse las escamas de las zonas afectadas, raspando su borde activo con una hoja de bisturí o sindesmótomo estéril, ya que dicho borde es el que más probablemente contenga elementos fúngicos viables. Cuando existen lesiones satélites (candidiasis), el raspado se realiza de dichas lesiones por ser las más jóvenes. El material

obtenido se recoge entre dos portaobjetos estériles. El uso de contenedores estériles de plástico puede tener el inconveniente de que las escamas se adhieran a sus paredes dificultando su recuperación. Los dermatofitos en las muestras de piel, pueden permanecer viables durante meses. En los intertrigos candidiásicos, las lesiones no suelen ser descamativas sino exudativas, en cuyo caso el material se toma con hisopo estéril seco o húmedo. Si el espécimen no va a ser procesado inmediatamente, se prefiere el empleo de un hisopo con medio de transporte (Ej. medio de Stuart) ya que las levaduras pierden rápidamente la viabilidad en los hisopos secos.

Pelos: Cabellos o vellos opacos, quebradizos, cortos, dilatados o que se fracturan al alcanzar la superficie y dan el aspecto de puntos negros.

Dependiendo del tipo de lesión observada, los pelos deben recogerse mediante diversas técnicas:

- ❖ En la piedra blanca o piedra negra: Ambas están confinadas a la vaina del pelo, por lo que debe cortarse la porción suprafolicular de los pelos afectados.
- ❖ En las tiñas del cuero cabelludo o de la barba: es importante tomar los pelos parasitados arrancándolos con la raíz intacta, ya que cortarlos es menos eficaz. En muchas ocasiones los pelos parasitados se reconocen porque están rotos, friables o se desprenden fácilmente con el raspado.
- ❖ En las tiñas microspóricas (*M. canis*): se reconocen por presentar una placa escamosa blanquecina con escasa o nula inflamación, que puede alcanzar varios centímetros de diámetro, y en el cual se observan pelos rotos a 5-10 mm de la superficie cutánea, estos pelos parasitados son friables y se arrancan con facilidad al raspar con el bisturí.
- ❖ Kerion de Celso: Son las formas supurativas de tinea capitis, es común en los niños. Se presentan como lesiones elevadas,

hemisféricas de consistencia blanda, exhiben muchas pústulas foliculares y al ser apretadas manan pus por múltiples puntos. El diagnóstico se realiza por el examen microscópico de los cabellos (que se arrancan con gran facilidad). Los agentes más frecuentes aislados son: *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum*, *Trichophyton mentagrophytes var mentagrophytes* y *Trichophyton verrucosum*.

- ❖ En las tiñas tricofíticas antropofílicas (*T. tonsurans* y *T. violaceum*), forman pequeñas placas escamosas con pelos de poca longitud, en forma de W o Z, situados en el espesor de la escama o bien rotos al nivel de la superficie dando un aspecto de “puntos negros”, casi siempre en ausencia de inflamación. Estos “puntos negros” son los que deben extraerse con la punta del bisturí o mediante pinzas. Sin embargo cuando la infección se debe a especies zoofílicas (*T. mentagrophytes var. mentagrophytes* y *T. verrucosum*) se observan placas escamosas de tamaño variable, que se inflaman y se elevan sobre la superficie cutánea, apareciendo numerosas pústulas foliculares que originan un Kerion. En estos casos cuando las lesiones son dolorosas en niños puede ser difícil la toma de muestra, entonces el uso de un hisopo humedecido sobre la zona afectada puede ser el único medio incruento de realizar la toma. Con esta técnica es posible obtener resultados positivos, pero resultados negativos no excluyen la infección. Los pelos situados en la placa tienen una longitud variable pudiéndose extraer con facilidad sin causar dolor al paciente.
- ❖ En la tiña favosa (*T. schoenleinii*) presenta costras amarillentas, cóncavas y centradas por un pelo, denominadas cazoletas fávicas. Están formadas por un conglomerado de hifas que originan una foliculitis y con el tiempo, alopecia cicatricial por destrucción de la matriz. La muestra de estas lesiones debe ser tomada con asa.

Uñas:

- ❖ Detrito subungueal y fragmentos de uña o raspado de la lámina en la lesión superficial blanca.
- ❖ El detrito, se toma de la parte más distrófica y con mayor hiperqueratosis, idealmente, con hoja de bisturí curva y roma y tan profundo y abundante como sea posible.
- ❖ Onicomycosis distal y lateral subungueal: la lesión comienza por el borde libre de la uña y va extendiéndose hacia la matriz, la sustancia de la uña se sustituye por un material amarillento y friable, mientras que la lámina exterior puede estar infectada o destruida. Esta lesión puede deberse a dermatofitos, *Scopulariosis* spp o *Scytalidium* spp. En estos casos, aparecen uñas hiperqueratósicas siendo los alicates especiales para recoger el material subungueal y cortar trozos de la parte proximal de la uña, ya que aunque sea la menos accesible, es la que menos se contamina y presenta elementos fúngicos más jóvenes y viables.
- ❖ Onicomycosis proximal subungueal: causada por *Candida* spp, *Fusarium* spp o por recidivas de una tinea unguium tratada. Se observa, de forma característica en pacientes con SIDA. En estos casos, se debe recoger el material blanquecino de la porción más profunda de la tabla ungueal.
- ❖ Onicomycosis blanca superficial: se manifiesta como una mancha blanca lechosa en un punto cualquiera de la superficie de la uña que se va extendiendo progresivamente. Es debida a dermatofitos (*T. mentagrophytes*, *T. rubrum*) u otros hongos miceliares (*Acremonium* spp., *Fusarium* spp., *Aspergillus* spp.) Sólo en este caso, se raspa la uña en la superficie afectada.
- ❖ Onicomycosis distal y lateral con paroniquia crónica: comienza con una inflamación del borde periungueal y termina con la afectación

lateral de la lámina que aparece plisada. Aunque casi siempre está causada por *Candida spp.* en ocasiones excepcionales algún hongo no dermatofito también puede ser el responsable. En estos casos, se recoge el material ungueal más cercano a la cutícula, raspando con el bisturí en la profundidad del surco periungueal. Con hisopo o asa estéril se obtiene el pus de la paroniquia acompañante tras incisión con lanceta o compresión de la porción lateral del dedo.

- ❖ Onicomycosis distrófica total: corresponde al estadio final de cualquier onicomycosis. En estos casos, se debe raspar preferentemente el material subungueal

Transporte de muestras

Transporte de muestras superficiales

La mejor muestra es aquella que se toma y procesa en el laboratorio. De ser necesario el envío, el material debe ser **abundante** y puede recogerse en sobres de papel pergamino delgado o de seda grueso o idealmente, en cajas de Petri pequeñas, estériles y selladas. Es muy importante evitar la contaminación y la humedad.

Las muestras de pitiriasis versicolor y dermatofitosis también pueden ser transportadas entre dos portaobjetos estériles envueltos en papel o en contenedor seco estéril. Se pueden almacenar a temperatura ambiente.

Toma de muestras respiratorias

Exudado y lavado nasofaríngeo

Mediante hisopo de algodón o catéter, aspirar el moco por vía per o retronasal. Hay que tener presente que la muestra obtenida pertenece al tracto respiratorio superior, por lo que en caso de ser positiva, tan sólo será indicadora de colonización de las vías aéreas superiores.

Espujo por expectoración espontánea (E)

La muestra debe obtenerse tras una expectoración profunda preferentemente matinal, mediante tos o fisioterapia respiratoria (se recomienda el lavado previo de la boca con solución salina y evitar que la expectoración se contamine con secreciones nasales o saliva).

Espujo inducido (EI)

Se obtiene tras hacer inhalar al paciente durante 15-20 min., nebulizaciones de 20-30 ml de solución salina hipertónica estéril, obtenidas mediante un nebulizador ultrasónico. Su valor diagnóstico equivale al espujo por expectoración espontánea, aunque con experiencia y meticulosa técnica de obtención se puede minimizar la contaminación nasobucal. Se recomienda como alternativa el espujo en el caso que no sea posible una expectoración espontánea.

Aspirado traqueal (AT)

Se introduce una sonda de aspiración a través del tubo endotraqueal o de la traqueotomía y se succionan las secreciones respiratorias. La instilación de una pequeña cantidad de solución salina estéril (± 5 ml) puede facilitar la obtención de las muestras muy viscosas. Se puede considerar la alternativa al espujo en el paciente intubado y su valor diagnóstico es muy similar.

Lavado bronquial (LB)

Mediante fibrobroncoscopía se realiza una aspiración de las secreciones del árbol bronquial, generalmente tras la instilación de 5-10 ml de solución fisiológica. No hay que olvidar que la muestra procede del árbol bronquial superior y no es representativa del territorio alveolar ni bronquiolar. En el enfermo intubado tiene el mismo valor diagnóstico que

el aspirado traqueal y en el no intubado puede estar contaminada por secreciones del tracto respiratorio superior, siendo su valor diagnóstico similar al del esputo. Sólo está indicado cuando el volumen del BAL es insuficiente y existe la sospecha de una infección fúngica pulmonar por patógenos primarios.

Lavado broncoalveolar (BAL)

Para la toma de muestra el fibrobroncoscopio debe enclavarse en el árbol bronquial e instilar \pm 120 ml de solución fisiológica que posteriormente será recuperada (10 -100 ml). La muestra representa las secreciones presentes en aproximadamente un millón de alvéolos y sus correspondientes bronquiolos (\pm 1% de la superficie pulmonar), se estima que en el líquido recuperado se encuentran diluídas 1 ml de secreciones. El fluido recuperado se considera la muestra más adecuada y sensible para el diagnóstico de las infecciones respiratorias causadas por hongos dimórficos patógenos primarios y para el diagnóstico de la neumonía por *Pneumocystis*. En enfermos inmunodeprimidos, es la técnica de elección para el diagnóstico de presuntas micosis invasoras oportunistas del tracto respiratorio inferior.

Lavado broncoalveolar protegido (BAL-protegido)

La toma de muestra es igual que para el BAL pero la introducción del broncoscopio se hace a través de la luz de un catéter con un globo final, que previamente se ha introducido e inflado con el fin de proteger la muestra de una posible contaminación por flora de las vías altas. Es de gran valor diagnóstico en neumonías bacterianas, especialmente en pacientes sometidos a ventilación mecánica, pero en el caso de las infecciones fúngicas tiene un valor equiparable al BAL convencional.

MiniBAL (Mini-BAL)

Se introduce un catéter telescopado en el árbol bronquial y se hace avanzar hasta encontrar resistencia, seguidamente se hace avanzar el catéter interno y se instilan con una jeringa unos 25 ml de suero fisiológico estéril. El líquido recuperado y la punta del catéter interno se emplean para los estudios microbiológicos. La técnica presenta la ventaja de no requerir el empleo de un fibrobroncoscopio y se plantea como una alternativa a éste diagnóstico de la neumonía asociada a ventilación mecánica. En la actualidad, no existen experiencias que permitan recomendarla para el estudio de las infecciones fúngicas.

Biopsia transbronquial

A través de un broncoscopio se introducen unas pinzas que, mediante visión fluoroscópica, permiten la obtención del parénquima pulmonar peribronquial o incluso alveolar. Está indicada para estudios histológicos. Aunque el pequeño tamaño de las biopsias obtenidas tiene sensibilidad de la muestra, debe tenerse presente su gran especificidad y valor diagnóstico de seguridad de las micosis invasoras.

Punción pulmonar percutánea o transtorácica

Empleando agujas ultrafinas y control radiológico o ecográfico, se punza la cavidad torácica y se recoge el exudado de las lesiones pulmonares por aspiración. Aunque es una muestra con alta especificidad, tiene baja sensibilidad, y la técnica no está libre de contraindicaciones (neumotórax, hemorragia), por lo que su empleo se limita al estudio de infiltrados pulmonares densos de localización periférica, con gran componente cavitario y / o consolidación, como puede ser el caso de algunas neumonías fúngicas.

Líquido pleural (LP)

A través de una punción transparietal mediante aguja de punción pleural, se extraen varios mililitros de líquido pleural. El empiema suele

presentarse como complicación de una neumonía bacteriana o tuberculosa, pero no debe descartarse la implicancia de un hongo que, en procesos neumónicos crónicos, puede invadir la cavidad pleural o introducirse en ella a través de un neumotórax o una fístula broncopleural.

Biopsia pleural

A través de una pequeña incisión en la pared torácica se introduce un trocar hasta perforar la hoja parietal de la pleura de donde se toman varias muestras. Las muestras se emplean para estudio histológico o para el diagnóstico de una posible paquipleuritis tuberculosa, siendo habitualmente poco útil en Micología.

Transporte y conservación de muestras respiratorias

Las muestras de esputo, LB y BAL deben enviarse al laboratorio en frascos estériles, bien cerrados, con tapa a rosca y en un plazo máximo de 2 horas desde su recogida. Los productos de aspiración se depositan en un tubo cónico estéril con tapa a rosca. Las secreciones que se obtienen por cepillado se transportan, en tubos cónicos estériles con tapa a rosca, diluídas en 1 ml de solución fisiológica estéril. Las piezas de biopsias deben dividirse en dos partes, uno se introduce en un frasco con formol al 10% provisto por anatomía patológica y se envía a ese servicio, y otro en tubo o frasco estéril con 1 ml de suero fisiológico para el Laboratorio de Micología. Si el procesamiento de la muestra va a demorarse durante varias horas, es preferible conservarla a 4°C (heladera) especialmente en muestras muy contaminadas como el esputo.

3.6.2 Toma de muestras de líquidos estériles y tejidos

I) Sangre

A) Sistemas Automatizados

Esta muestra habitualmente estéril es muy valiosa en Micología, no sólo por su rentabilidad diagnóstica, sino también por la dificultad de obtención o imposibilidad de repetición, lo que obligará a extremar todas las medidas para obtener el mayor rendimiento de la misma. Actualmente el cultivo de sangre sigue siendo la mejor técnica para el diagnóstico de candidemia, a pesar de su escasa sensibilidad global ($\approx 50\%$). Para ello se recomienda el uso de sistemas automatizados de monitoreo continuo utilizados para bacterias, pero si se sospecha una infección sistémica por un hongo dimorfo, la técnica de lisis-centrifugación parece ofrecer mayores ventajas. Sin embargo para la recuperación de la mayoría de los hongos filamentosos, ninguno de estos dos sistemas ha demostrado su eficacia. Los sistemas automatizados integran el sistema de detección, el incubador y el mecanismo de agitación en una sola unidad; cada frasco de hemocultivo se procesa individualmente. Actualmente en nuestro país hay dos sistemas comercializados, que se diferencian por el tipo de metabolito detectado, en el sistema de detección o en el tipo de agitación: BacT/Alert® (BioMerieux) y BACTEC® (Becton-Dickinson). Detectan el crecimiento microbiano midiendo la producción de CO₂ por colorimetría o por fluorescencia respectivamente. Cualquiera de ellos es útil para el aislamiento de levaduras en los frascos de hemocultivo. Para la toma de muestra utilizar guantes estériles y se comienza con la desinfección del tapón de goma del frasco con alcohol etílico 70% esperando 1 minuto antes de inocularlo. Después de localizar el lugar de la venopunción, limpiar con un algodón impregnado con alcohol etílico 70%, realizando movimientos concéntricos de adentro hacia fuera. Repetir la operación con otro algodón impregnado con yodo-povidona (2%) dejándola actuar durante 1 minuto. Una vez realizada la desinfección no se debe volver a palpar la vena; si fuera necesario, utilizar nuevos guantes estériles. Extraer la sangre e inocular los frascos de hemocultivo. Adultos de 5-10 ml (frasco adulto), niños: de 1-5 ml (frasco pediátrico), neonatos de 0.5-1.5 ml (frasco pediátrico). Limpiar los restos de yodo-povidona con

alcohol. Los frascos de hemocultivos MYCO/F LYTIC® (Becton-Dickinson) están diseñados para la recuperación de patógenos intracelulares. Incorporan al medio de cultivo un agente lítico (saponina) que induce la ruptura de los leucocitos y la posterior salida de microorganismos fagocitados que pueden ser detectados por el sistema automatizado BACTEC9240®. Hasta el momento, ha demostrado su utilidad en infecciones sistémicas por *H. capsulatum*.

B) Lisis-Centrifugación

Utilizar guantes estériles durante todo el proceso. Desinfectar la piel del paciente del mismo modo que la descrita en el punto anterior (sistemas automatizados). Se extrae sangre sobre una solución al 5% concentración final de saponina-polianetolsulfonato de sodio en solución fisiológica. Adultos: 9 ml en 1 ml de solución lisante, Niños: 1 a 5 ml en 0.5 ml de solución lisante, Neonatos: 0.5 a 1 ml en 0.5 ml de solución lisante. Se mezclan los tubos varias veces para activar la lisis celular se espera aproximadamente 1 hora y se centrifugan los tubos durante 30 minutos a 3000 r.p.m. En los adultos se siembra el precipitado diluido en algunos mililitros de sol. fisiológica estéril. En los niños y neonatos no es necesario centrifugar por lo que se siembra todo el material lisado.

II) LCR

El diagnóstico etiológico de una meningitis precisa LCR. La dificultad de su obtención hace del LCR una de las muestras biológicas estériles más valiosas en un laboratorio de Microbiología. Realizar la punción en condiciones de máxima asepsia. Desinfectar la zona con yodo-povidona al 2%. Realizar la punción en los espacios intervertebrales L3-L4, L4-L5, ó L5-S1. Al llegar al espacio subaracnoideo, retirar el estilete y dejar salir libremente el LCR, recolectarlo en tres tubos estériles cónicos con tapa a rosca. Extraer un volumen mínimo de 3 ml/tubo, enviar

rápidamente al laboratorio de Microbiología. Extraer también sangre para hemocultivo

III) L. pleural, peritoneal, pericárdico, sinovial y otros líquidos de punción

Realizar la punción en condiciones de máxima asepsia. Desinfectar la piel con yodo-povidona 2%, obtener la muestra por aspiración con aguja percutánea o por cirugía. Extraer un volumen mínimo de 5 ml y depositarlo en un tubo cónico estéril con tapa a rosca (o inocular un frasco de hemocultivo); enviar rápidamente al Laboratorio de Micología.

IV) Médula ósea

El aspirado de médula ósea, por punción esternal o de cresta ilíaca, es una de las mejores muestras para el diagnóstico de histoplasmosis diseminada. El estadio levaduriforme de este microorganismo es eminentemente intracelular, por lo que la utilización del sistema de lisis-centrifugación facilita la liberación de las levaduras fagocitadas, aumentando su recuperación en el medio de cultivo. Aplicar máximas condiciones de asepsia. Introducir el aspirado en un tubo cónico con solución de saponina (5% concentración final) como se describió oportunamente para la toma de muestra de hemocultivo por el método Lisis-centrifugación. Realizar en el momento de la toma de muestra un extendido en un portaobjeto para realizar la tinción de Giemsa. Tener la precaución que el material extraído no debe coagularse de ser necesario agregar 1 gota de heparina estéril al tubo.

V) Tejidos

Las muestras de tejidos se obtienen mediante cirugía, biopsia percutánea o autopsia. Realizar la biopsia aplicando las máximas medidas de asepsia. Introducir el tejido biopsiado en un recipiente estéril

de tapa a rosca con solución salina estéril y enviar al laboratorio rápidamente.

Transporte de líquidos de punción de cavidades estériles y tejidos

Si la muestra fue inoculada a un frasco de hemocultivo deberá enviarse rápidamente al laboratorio para su pronta incubación a 37°C. Si la muestra se recolectó en un frasco estéril de no procesarse en el día puede ser almacenada en la heladera 4°C durante 24- 48 hs. con unas gotas de solución salina estéril.

3.6.3 Toma de muestras genitourinarias

I) Exudado vaginal

Debe indicarse que no debe realizar tratamiento local o general previo. Abstinencia sexual (24 horas previas) No debe practicarse higiene vaginal previa que pueda alterar las características de la flora. Debe realizarse la toma de muestra ayudándose con un espéculo, sin utilizar lubricantes. Se toma la secreción mucosa de la pared posterior del canal vaginal, mediante un hisopo humedecido con solución fisiológica estéril haciendo rotar el mismo por la zona de mayor secreción. Para el examen directo puede tomarse material con espátula.

II) Exudado vulvar

Es conveniente lavar la superficie cutánea con solución salina estéril, antes de arrastrar el exudado con un hisopo. La obtención del exudado anal se realiza de la misma forma que el vulvar.

III) Surco balanoprepucial

Hisopado de los bordes de las lesiones y del surco balanoprepucial sin higiene previa

IV) Primer chorro de orina

Por la mañana después de una retención de 1-3 hs. sin vaciar la vejiga. Debe higienizarse la zona externa para evitar una contaminación, sobre todo en hombres no circuncidados, utilizando jabón nuevo y agua. Se recolecta el primer chorro de orina en frasco estéril con tapa a rosca.

V) Exudado uretral

El exudado uretral se recoge por la mañana o al menos después de 1-3 hs. sin vaciar la vejiga. Higienizar con agua y jabón nuevo la zona externa para evitar contaminación, sobre todo en hombres no circuncidados. Si existe secreción abundante, se exprime la uretra, se desecha la primer gota que contiene flora saprofita y se toma el resto con un hisopo fino (uretral) introducido 2 cm en el meato urinario, en caso de no existir secreción, se introduce el hisopo en la uretra después de realizar un masaje uretral.

VI) Micción espontánea / Chorro medio de orina

Realizar una higiene de sus genitales con agua y jabón nuevo. En el momento de la micción los hombres deberán retraer el prepucio y las mujeres colocarse un tapón vaginal. Recolectar chorro medio de la orina recién emitida en un frasco estéril, preferiblemente de boca ancha (se descarta la primera y última parte de la micción)

VII) Sonda vesical

El cateterismo vesical efectuado de manera aséptica, después de un lavado cuidadoso del meato uretral y de los genitales externos, es el procedimiento más adecuado para recoger orina cuando se sospecha una candiduria, pero implica peligro de sobreinfección de vías altas. Se recurre a este procedimiento ante la imposibilidad de obtener buenos resultados por los métodos directos o cuando se pretende corroborar un diagnóstico.

En pacientes con sonda permanente la orina se recolecta por punción aséptica de la sonda, nunca de la bolsa.

VIII) Punción suprapúbica

Cuando la recolección de orina es dificultosa por otro procedimiento, puede realizarse una punción vesical, sobre todo en lactantes, pero es una técnica contraindicada en pacientes con problemas de la hemostasia. La vejiga se punza directamente después del aseo, antisepsia y anestesia local.

Transporte de muestras genitourinarias

En general las muestras genitourinarias deben procesarse rápidamente, pues el crecimiento de levaduras a temperatura ambiente puede dar lugar a una falsa interpretación en cuanto a su concentración en la muestra. Los hisopados si van a demorarse se pueden colocar en solución fisiológica estéril. En las muestras de orina si se va a demorar el cultivo podrán guardarse en la heladera a 4°C 24 horas.

3.6.4 Toma de muestras de cavidad oral y otorrinolaringológicas

La toma de muestras se hará antes de administrar antifúngicos.

I) Cavidad oral

Irá precedida de un enjuague con agua o solución salina. Las lesiones pseudomembranosas y las secreciones se recolectan con un hisopo estéril y se colocan en tubo estéril con solución fisiológica.

II) Muestras rinosinusales

Debe tomarse con hisopo o torunda de algodón de la mucosa nasofaríngea, mediante aspiración o biopsias durante una intervención quirúrgica. También son muestras útiles los exudados nasales, así como

el contenido y tejido de los senos afectados. Deben colocarse en frasco estéril, con solución fisiológica estéril.

III) Muestras óticas

Deben efectuarse bajo visión directa con otoscopio y el material se extrae con una cucharita o cureta. También pueden emplearse hisopos humedecidos en solución fisiológica. Pero los resultados son menos satisfactorios.

IV) Biopsias o piezas quirúrgicas

Son de utilidad en otitis y rinosinusitis invasoras y deben obtenerse por procedimientos quirúrgicos. La muestra debe colocarse en recipiente estéril con unas gotas de solución fisiológica estéril

Transporte de muestras de cavidad oral y otorrinolaringológicas

Deben procesarse antes de las 2 horas. Los hisopos pueden introducirse en solución fisiológica estéril. Las muestras recogidas mediante enjuague o lavado oral se transportan en frasco estéril a temperatura ambiente. Las muestras de biopsias transportar en medio líquido, de lo contrario utilizar envase estéril con solución salina, pudiéndose guardar en la heladera a 4°C durante 24 -48 horas.

3.6.5 Toma de muestras gastrointestinales

I) Cepillado esofágico

Mediante escobillón guiado por endoscopia, se recolecta material preferentemente de las placas blanco-amarillentas o pseudo membranosas si las hubiere. Después se frota el cepillo por la superficie de uno o varios portaobjetos limpios y estériles.

II) Biopsia esofágica

Raramente es necesaria esta muestra ya que el cepillado esofágico es muy sensible para el diagnóstico de esofagitis candidiásica, además no diferencia colonización de infección. Se prefiere tomar varias muestras de mucosa gástrica para aumentar el rendimiento

Transporte de cepillado y biopsia esofágicos

Los portaobjetos se envían inmediatamente al Laboratorio protegidos en un recipiente limpio, seco y cerrado. En el caso de una muestra de biopsia enviar en recipiente estéril, añadiendo unos mililitros de solución fisiológica. De no ser procesado en el momento guardar en heladera a 4°C no más de 24 horas.

3.6.6 Toma de muestras oculares

I) Exudado conjuntival

Con un hisopo estéril, de algodón o alginato humedecido en solución salina estéril frotar la zona lesionada suavemente e introducirlo en medio de transporte. Repetir la toma de muestra en el ojo contralateral con otro hisopo. Si se dispone de medios de cultivo es preferible inocularlos en el momento de la toma de muestra.

II) Raspado corneal

Obtener exudado conjuntival de cada ojo por separado. Aplicar un colirio anestésico. Raspar la superficie de la lesión con un ansa de Kimura (ansa de platino ultrafina, flexible, de punta roma que puede enfriarse rápido si se esteriliza a la llama (este procedimiento debe realizarla el oftalmólogo, controlando la toma de muestra con microscopio o con lámpara de hendidura. Si la lesión es purulenta conviene tomar la muestra con hisopo, si es profunda se puede hacer una incisión con microbisturí. Si la lesión está mal definida se puede pasar un hilo quirúrgico por el área infectada y luego usarlo para inocular los medios.

III) Fluidos y aspirados oculares

En los casos de endoftalmitis y celulitis orbitaria, las muestras deben ser recolectadas por el oftalmólogo en el quirófano, mediante punción aspiración o vitrectomía y controladas por microscopía. Colocarlas en recipiente estéril, pero conviene inocular la muestra en los medios de cultivo directamente.

IV) Conductos lacrimales

Con hisopo húmedo en solución salina estéril, recoger el material purulento presionando los párpados y el saco lacrimal.

V) Lentes de contacto

Frotar en hisopo por la superficie de contacto corneal de cada lente

Transporte de muestras oculares

Todas las muestras deben (en lo posible) inocularse en el momento, de no ser posible enviarlas al laboratorio en envase estéril con tapa a rosca.

3.6.7 Toma de muestra de Catéteres

I) Catéteres intravasculares

Desinfectar con alcohol la zona cutánea alrededor de la inserción del catéter y asépticamente cortar 5 cm del extremo distal, que se introduce en contenedor estéril con tapa a rosca.

II) Catéteres de diálisis peritoneal

Extraer el catéter, seleccionar y cortar el segmento subcutáneo y el extremo distal e introducirlos en contenedores estériles.

Transporte de catéteres

Se recomienda el procesamiento de inmediato, de lo contrario conservar la muestra a 4°C máximo 24 horas.

3.6.8 Toma de muestra de material protésico

En el contexto general, las infecciones fúngicas del material protésico son muy infrecuentes. Entre todas, las prótesis de válvula cardíaca y las mallas de refuerzo abdominal son las más relacionadas con la infección fúngica. Si el material lo permite es aconsejable que el troceado lo realice el médico en el quirófano en condiciones asépticas y en el momento de su extracción, para facilitar la siembra en los diferentes medios de cultivo.

Transporte de material protésico

En frasco estéril y a temperatura ambiente.

3.7 Procedimientos para el diagnóstico micológico

Se describen básicamente dos tipos de estudios, el examen directo y el cultivo para asegurar una recuperación de hongos a partir de muestras clínicas, éstas deben de procesarse de inmediato mediante su inoculación sobre medios de cultivo.

Examen directo

Este procedimiento no sustituye al cultivo. Brinda información preliminar o presuntiva al ser una técnica rápida que puede ser útil al clínico y en algunos casos llegar a ser diagnóstica. Es un paso esencial que no se debe omitir en el diagnóstico micológico. Con este procedimiento podemos visualizar las estructuras fúngicas presentes en la muestra, hifas y/o blastoconidias, pseudomicelio, cantidad, morfología y tamaño de las blastoconidias, nº de gemaciones, tipo de células presentes (células epiteliales, leucocitos, macrófagos, etc.), así como evaluar la cantidad y calidad de la misma. Entre los principales exámenes directos tenemos:

Hidróxido de potasio (KOH)

Disuelve rápidamente las células permitiendo digerir material proteico, aclara pigmentos y disuelve el cemento que mantiene unidas a las células queratinizadas y las de otros tejidos; ello permite observar los elementos fúngicos más fácilmente. Su efecto de clarificar puede incrementarse al calentar a la llama ligeramente la preparación. Adicionalmente, se puede emplear colorante (tinta Parker azul negra ó tinta Parker Quink azul permanente al 10%) para pigmentar la pared de los hongos y mejorar la visualización. Cuando se sospechan mohos

dematiáceos, su pigmento se aprecia mejor sin tinta. La observación de hifas, permite sugerir la presencia de invasión micótica.

Hallazgos del examen directo:

Cuando el agente etiológico es un dermatofito, el examen directo de las distintas tineas, revela hifas hialinas septadas, las cuales pueden o no estar acompañadas de artroconidias y o de clamidoconidias. Sin embargo, estas estructuras son semejantes a las observadas en casos de dermatomicosis por mohos septados moniliáceos (hialinos), por lo que el cultivo es indispensable para su diferenciación. Si las lesiones son producidas por levaduras del tipo *Candida*, al directo se pueden observar también blastoconidias, las que no están presentes en los dermatofitos y además, pseudohifas, indiferenciables en muchos casos de las hifas verdaderas de los mohos. Por lo tanto, en la mayoría de los casos el cultivo es indispensable para la identificación del género y especie del hongo productor de las lesiones. Y si el agente etiológico es una *Malassezia* se observará levaduras redondas u ovaladas, en cantidad abundante, distribuidas en grupos o racimos, así como también podría observarse hifas cortas, acodadas, mezcladas con las levaduras.

En la tinea capitis endótrix, los límites del cabello están intactos y en su interior se observan hifas y artroconidias. En la variedad endo-ectotrix, el interior del cabello no siempre es visible y presenta hifas y artroconidias, mientras que en la superficie, hay predominio de artroconidias y escasas hifas. La cutícula del cabello se ve alterada, sin límites precisos.

A pesar de que el examen directo, de las lesiones por dermatofitos no permite diferenciar el género ni la especie del agente etiológico, ni si se trata de una dermatofitosis o de otro hongo de origen ambiental o vegetal, su resultado diferencia las lesiones producidas por hongos de

aquellas que no lo son y que clínicamente son similares. Además, su resultado disponible en minutos, permite al médico iniciar el tratamiento, mientras los resultados del cultivo están disponibles a las 3-4 semanas. Sin embargo, la sensibilidad de la prueba y por lo tanto su valor en el diagnóstico temprano, depende de una muestra adecuada en calidad y cantidad, de la selección del método para procesarla y de la capacidad de reconocimiento por parte del observador.

Tinta china

Es un método de contraste. Permite visualizar la cápsula de polisacárido de *Cryptococcus spp*, mediante la presencia de un halo claro y nítido alrededor de la levadura.

Existen artefactos (hematíes, burbujas de aire, leucocitos, gotas de grasa y partículas de talco) que pueden interferir y confundir al analista. La sensibilidad de la técnica es de 50% en pacientes sin VIH y se puede incrementar hasta 88% en pacientes VIH con meningitis criptocócica.

Coloración Giemsa

Es de utilidad para el diagnóstico de histoplasmosis, neumocistosis y otras micosis. Permite visualizar blastoconidias intracelulares al polimorfonuclear, como la fase tisular del *H. capsulatum*.

Coloración Gram

Es útil para observar blastoconidias y pseudomicelios de las especies del género *Candida*, *Malassezia* y *Cryptococcus*, las cuales son Gram positivas con variaciones en la intensidad de la coloración.

Cultivo

Una vez tomada la muestra, se procederá a sembrarla en los medios de cultivos habituales para el aislamiento de hongos. En micología se utilizan los siguientes medios:

- **Medios generales:** Sabouraud dextrosa agar (SDA) es el medio universal para el aislamiento de hongos, tanto filamentosos como levaduriformes.
- **Medios selectivos:** son aquellos medios que contienen antibióticos para inhibir la flora microbiana y/o saprófita asociada, permitiendo el crecimiento solo de hongos patógenos; entre ellos se encuentran el Mycosel o Dermasel que contiene cloranfenicol y actidiona, el agar Sabouraud más cloranfenicol (S+C) y la infusión cerebro-corazón más cloranfenicol (BHI, Brain Heart Infussion).
- **Medios enriquecidos:** son medios altamente nutritivos que favorecen el aislamiento de hongos patógenos de lento crecimiento y se utilizan para evidenciar el dimorfismo de los mismos, como agar sangre y agar BHI incubados a temperatura de 37°C.
- **Medios diferenciales:** se utilizan para inducir alguna propiedad específica del agente aislado, lo cual es esencial para su identificación taxonómica; entre ellos se encuentran el agar cromogénico para *Candida*, agar bilis, agar corn meal, agar urea y agar Gorodkova, entre otros.

Cultivo de micosis superficiales

El material recolectado sobre la hoja de bisturí se siembra introduciendo la punta del mismo en el agar, dejando una huella que

permita diferenciar el crecimiento de los hongos aislados de la muestra, de otros ambientales que puedan contaminar el medio durante la siembra. Ésta debe repetirse mínimo en 6 a 8 puntos. Aunque los cultivos pueden realizarse en tubos o cajas de Petri, se recomiendan las cajas por ofrecer más superficie para el crecimiento de los hongos, lo que a su vez, asegura mayor sensibilidad a la prueba. Así mismo, en las cajas se facilita la siembra, la identificación macroscópica de las colonias y su recuperación para el estudio microscópico o para tomar parte de la colonia y efectuar repiques. Si se emplean tubos, la cantidad debe ser suficiente para asegurar la siembra de suficiente material.

Medios de cultivo

Se deben emplear al menos dos tipos de medios de cultivo, idealmente tres. Los medios de cultivo más empleados son el agar Sabouraud dextrosa con antibióticos, que permite el crecimiento de dermatofitos y de hongos ambientales productores de dermatomicosis y limita el crecimiento de bacterias; agar Sabouraud dextrosa con actidiona (cicloheximida) y cloranfenicol, mycosel, el cual favorece el crecimiento de los dermatofitos, pero limita el crecimiento de mohos ambientales y de bacterias.

Cultivo de muestras respiratorias, cavidad oral y otorrinolaringológicas

- ❖ Colocar la muestra en tubos de ensayo con ASD y agar infusión cerebro-corazón. Emplear como mínimo seis tubos por muestra, tres de ellos se incubarán a temperatura ambiente y los otros tres a 37 °C. Los medios de cultivo deben de contener cloramfenicol 0,5g/L. Evitar el uso de cicloheximida debido a que puede inhibir el desarrollo de mohos, principalmente *Aspergillus spp.*, *Penicillium marneffe*, y *Cryptococcus spp.*

- ❖ El LBA se debe de colocar en recipiente estéril y con tapa rosca. La muestra se centrifuga (1500 g o 3000 rpm por 30 minutos) y a partir del sedimento se realiza el cultivo.

- ❖ Los cultivos se deben controlar hasta 45 días.

- ❖ El valor diagnóstico del hallazgo de los diferentes hongos es diverso. Son importantes los aislamientos de *Paracoccidioides brasiliensis* e *Histoplasma capsulatum*; otros como *Aspergillus spp.* y *Fusarium spp* tienen valor cuando si les observa en el examen directo y si se les aísla en forma reiterada a partir de especímenes seriados. Finalmente, algunos hongos como *Candida spp* son considerados como causantes de infección respiratoria si son observados por histopatología de biopsias o piezas quirúrgicas. *Cryptococcus spp* puede causar micosis pulmonar principalmente en pacientes VIH.

Cultivo de muestra de líquidos estériles y tejidos

Cultivo de muestra de sangre

- ❖ En laboratorios pequeños que tienen un bajo flujo de este tipo de muestras y no permite tener medios especiales es aceptable inocular 0,5 mL de sangre heparinizada directamente en la superficie de un medio de cultivo. Como medio de cultivo se debe emplear una botella bifásica que contenga 60 mL de caldo infusión cerebro corazón y agar cerebro corazón. Se inocula 10 mL de sangre en el medio bifásico, recibiendo ventilación a través de una aguja con tapón de algodón, colocando el medio de cultivo en forma vertical. Se incuba a 30 °C por 30 días. Examinar en forma diaria, hasta observar el crecimiento de microorganismos. Después

de examinar diariamente los cultivos, se debe de mezclar la fase líquida del medio de cultivo con el agar.

- ❖ Otro sistema de recuperación de hongos es el sistema de lisis centrifugación, que tiene la capacidad de lisar leucocitos sanguíneos con ulterior liberación al medio de microorganismos fagocitados, pero para su correcta realización hay que considerar las especificaciones del fabricante (anexo A).
- ❖ Para las técnicas automatizadas seguir las recomendaciones de los fabricantes de como inocular dos frascos en cada extracción (aeróbico y anaeróbico), pero en caso de niños emplear un frasco pediátrico por extracción. El volumen de sangre inoculado por frasco es esencial para incrementar la sensibilidad de la técnica.

Cultivo de líquido cefalorraquideo

- ❖ La muestra se obtiene por punción lumbar, y luego es depositada en un tubo de vidrio o frasco estéril con tapa rosca. El volumen requerido para un adecuado diagnóstico de hongos debe ser de 3 mL.
- ❖ Centrifugar la muestra a 1500 g ó 3500 rpm por 15 minutos. Con el sobrenadante emplear prueba serológicas de búsqueda de antígeno de *Cryptococcus spp.*
- ❖ El sedimento sembrado sobre ASD o agar infusión cerebro corazón o agar semilla de girasol (agar niger seed) de cuatro a seis tubos. Incubar a temperatura ambiente y 37 °C por cuatro semanas.

- ❖ Lectura e interpretación de los cultivos. Durante la primera semana de incubación realizar las lecturas a diario de los medios de cultivo, luego puede realizarse dos veces por semana hasta completar el tiempo de incubación establecida. Una vez realizado el aislamiento primario sembrar en medios de cultivo selectivos para su tipificación.

Cultivo de muestra de Tejidos

- ❖ Transvasar la muestra a una placa Petri estéril. Realizar lavados con solución salina estéril con antibióticos (cloramfenicol al 0,05%).
- ❖ Seccionar y triturar la muestra en trozos de 1 a 2 mm con ayuda de pinza y bisturí estéril para obtener un espécimen homogeneizado.
- ❖ Flamear al mechero cuatro láminas portaobjetos y en la cara flameada realizar improntas para hacer examen en fresco y coloraciones como Gram y Giemsa.
- ❖ Inocular la muestra, sumergiéndola ligeramente en la superficie del medio de cultivo agar Sabouraud dextrosa (ASD). Incubar un tubo a temperatura ambiente y otro a 37 °C. Controlar diariamente por un lapso de ocho semanas.

Cultivo de muestra genitourinaria

Cultivo de muestra de orina

- ❖ El urocultivo convencional es el método idóneo para el estudio de infección del tracto urinario, permitiendo diferenciar cualitativa y cuantitativamente una contaminación de una candiduria significativa.

- ❖ Inocular 1 ó 10 μL de orina no centrifugada en una placa Petri que contenga agar sabouraud dextrosa con antibiótico (ASD).
- ❖ Incubar a 35 - 37°C por 48 – 72 horas en aerobiosis.
- ❖ En la infección del tracto urinario, el valor del recuento de colonias en la orina no esta bien establecido. En general, se acepta que un recuento mayor a 10 000 UFC/mL, indicaría infección urinaria o candidiasis diseminada, un recuento inferior no es significativo de infección. Algunos investigadores señalan que hay que valorar cualquier recuento de levaduras como anormal y realizar nuevamente el cultivo antes de descartar una infección. En general, ante un cultivo positivo, se puede considerar las siguientes situaciones:
 - ❖ Candiduria inferior a 1000 UFC/mL: generalmente corresponde a ausencia de infección, con excepción si la muestra fue obtenida por punción suprapúbica.
 - ❖ Candiduria entre 1000 y 10 000 UFC/mL: de significado clínico dudoso y puede resultar de una contaminación sobre todo si existe flora mixta. En ciertos pacientes (niños, diabéticos, cateterizados), un recuento bajo puede ser de valor, sin embargo considerar una nueva muestra.
 - ❖ Candiduria entre 10 000 y 50 000 UFC/mL: sugiere la existencia de infección urinaria. La presencia de leucocitos y clínica del paciente pueden ayudar a valorar la candiduria. Al encontrar en el cultivo flora fúngica mixta o asociada con bacterias, sospechar de contaminación.
 - ❖ Candiduria superior a 50 000 UFC/mL: indica infección.

- ❖ Agentes etiológicos diferentes al género *Candida* obliga a la realización de recuentos de colonias y puede sembrarse inclusive el sedimento urinario.

Cultivo de catéter y exudado pericatóter

- ❖ Los métodos más empleados son las técnicas semicuantitativa de Maki y cuantitativa de Brum - Buisson.
- ❖ La técnica semicuantitativa de Maki, consiste en: Rodar cuatro veces con la ayuda de una pinza estéril 5 cm del segmento distal del catéter sobre la superficie de las placas Petri conteniendo agar sangre y ASD.
- ❖ La técnica cuantitativa de Brum – Buisson, consiste en: Introducir el extremo distal del catéter, en un medio de cultivo líquido. Agitar en un vórtex durante un minuto. Sembrar 50 µL en placas de agar sangre y ASD.
 - Incubación:
 - Agar sangre: a 35 - 37 °C, 72 h
 - Medio líquido: a 35 - 37 °C, 72 h
 - SDA: a 30 °C, para detectar el crecimiento de *Rhodoturula spp.*, 15 días
 - Agar Sabouraud Dextrosa-palmitico 3%: a 35 - 37 °C, para permitir el crecimiento de *Malassezia spp.*, 15 días.
 - Si se sospecha la infección por hongos filamentosos, prolongar la incubación 30 días.

3.8 Identificación de las principales micosis superficiales

Características de las colonias:

Al observar las colonias, es importante determinar el color de la superficie y del reverso y observar si hay pigmentos difusibles en el medio de cultivo; si la textura de la superficie es pulverulenta, granular, algodonosa, aterciopelada, con aspecto de lana, vellosa o glabra (micelio aéreo ausente o muy escaso). También debe considerarse la topografía, esto es, si la colonia es plana o levantada, tipo de pliegues y forma del borde o margen. La velocidad de crecimiento y el desarrollo a 37°C pueden ser útiles en algunas especies.

Esporulación:

Los dermatofitos son mohos hialinos y septados. En su fase anamorfa (asexuada), se reproducen por medio de macroconidias, microconidias, artroconidias y clamidoconidias de origen tálico, es decir, por transformación de: 1) un segmento terminal de la hifa en macro o y microconidias, 2) un segmento terminal o intercalar en estructuras redondeadas llamadas clamidoconidias o clamidosporos. 3) de un segmento de la hifa en artroconidias, estructuras cilíndricas de pared gruesa, las cuales se separan unas de otras por un proceso de esquizolisis.

La forma, número de septos, tamaño, características de la pared de las macro y microconidias, así como su organización sobre la hifa fértil o conidióforo, son la base principal de la diferenciación de las distintas especies de dermatofitos. Las características de las hifas vegetativas y fértiles, contribuyen al reconocimiento.

Identificación macroscópica, microscópica y fisiológica.

Epidermophyton floccosum.

Colonia:

- **Aspecto:** las colonias son sedosas, aterciopeladas, pulverulentas y en algunos casos, membranosas; son planas o levantadas y presentan pliegues radiales. Pueden presentarse zonas pleomórficas con acúmulos de hifas blancas algodonosas, especialmente en las colonias viejas; el pleomorfismo puede controlarse manteniendo las colonias en Sabouraud con NaCl del 3 al 5%. Las colonias son difíciles de mantener en el laboratorio, pues no resisten la refrigeración.
- **Color:** puede ser caqui, amarilla verdosa o café amarilla en la superficie. El reverso es amarillo-café a amarillo grisáceo.
- **Esporulación:** macroconidias abundantes de pared lisa con 0 a 4 células, de 20 a 40 mm x 6 a 8 mm, en forma de bate o clava, con la parte más angosta unida a la hifa, solitarias o en grupos. Muy temprano, se producen abundantes clamidoconidias intercalares y terminales y las macroconidias se transforman fácilmente en clamidoconidias por lo que la observación al microscopio debe ser temprano en el desarrollo de la colonia. No se producen microconidias.

Pruebas fisiológicas: No tiene requerimientos nutricionales especiales y ni invade ni perfora el cabello.

Microsporum canis.

Colonia:

- **Aspecto:** de vellosa a algodonosa, formando canales o depresiones un poco más densas que el micelio aéreo restante. Plana y de bordes

radiales. Se vuelve pleomórfica con el tiempo y presenta acúmulos de hifas blancas algodonosas y con pocas conidias.

- **Color:** el micelio aéreo es blanco o amarillo pálido. El reverso de la colonia es amarillo naranja o café naranja y ocasionalmente, amarillo pálido.
- **Esporulación:** macroconidias fusiformes con 0-15 septos, de pared gruesa y espinosa y con una protuberancia redondeada y curva en el extremo; miden de 18 a 125 mm x 5 a 25 mm. Las microconidias son lisas, en forma de clava a piriforme y casi siempre, escasas; no son diferentes a las microconidias de otras especies del género *Microsporium*.
- **Pruebas fisiológicas:** *M. canis* crece bien en arroz, produciendo pigmento amarillo y micelio blanco. Perfora el pelo, no tiene requerimientos nutricionales especiales y no cambia el pH en el medio de agar leche glucosado con azul de bromocresol púrpura. La esporulación puede inducirse en arroz, lactrimel, agar papa, agar papa con tiamina al 0.01% y agar papa con fragmentos de cabellos de bebe.

***Microsporium gypseum* (complejo *M. gypseum*, *M. fulvum*)**

Colonia:

- **Aspecto:** empieza con apariencia de gamuza suave y vellosa, luego se torna pulverulenta a granular, plana. Se vuelve pleomórfica con el tiempo y presenta acúmulos de hifas blancas algodonosas.
- **Color:** la superficie es crema pálido, rosado pálido o canela brillante y los bordes pueden ser blancos y algodónosos con aspecto rasgado.

Algunas colonias presentan un tinte violeta. El reverso es amarillo pálido a crema o café rojizo.

Esporulación: produce abundantes macroconidias que miden entre 25 a 60 mm x 7.5 a 15 mm, con 0-6 septos, elipsoidales a fusiformes, simétricas, de pared delgada y con espinas, pero más finas que las de *M. canis*. Las microconidias son de pared lisa, en forma de clava o piriformes.

- **Pruebas fisiológicas:** Perfora el cabello, no tiene requerimientos nutricionales especiales y no cambia el pH en el medio de agar leche glucosado con azul de bromocresol púrpura.

Trichophyton rubrum.

Colonia:

- **Aspecto:** Muy variable. La superficie de la colonia es algodonosa, vellosa o aterciopelada, glabra y rara vez pulverulenta. Las colonias glabras deben diferenciarse de *T. violaceum*. El aspecto puede ser desde peludo a gamuza, o lisa como en las glabras. La colonia puede ser plana, levantada en su totalidad o solo en el centro y algunas colonias pueden ser plegadas.
- **Color:** La superficie es usualmente blanca o grisácea. El reverso de la colonia es rojo vino, amarillo, naranja o con un pigmento melanoide difuso. Cuando la superficie es poco algodonosa, el color del reverso se aprecia bien en la superficie, con diferentes tonalidades.

Esporulación: Variable, algunos aislamientos presentan escasas microconidias unicelulares y rara vez, macroconidias multiseptadas. Otros presentan abundantes microconidias, con o sin macroconidias. En el primer caso, se observan microconidias piriformes o en forma de lágrima, a los lados de la hifa que puede no estar ramificada; miden de 2 a 3 mm x 3 a 5 mm; las macroconidias son escasas o pueden estar ausentes; son largas y delgadas, en forma de lápiz de 4 a 6 mm x 15 a 30 mm. En los aislamientos que producen abundantes conidias, las microconidias pueden ser más grandes y en forma de clava y son producidas directamente a lo largo de la hifa o al final de las macroconidias, característica que lo diferencia de *T. tonsurans* y de *T. mentagrophytes*. Las microconidias también pueden ser producidas en grupos sobre las hifas. Las macroconidias y las hifas pueden fragmentarse para producir artroconidias. Clamidoconidias, hifas pectinadas, e hifas semejantes a las hifas peridiales pueden ser producidas en algunos aislamientos.

- **Pruebas fisiológicas.**

- Urea: negativa
- Perforación del pelo: negativa
- Factores que requiere para el crecimiento: ninguno
- Agar leche glucosado con púrpura de bromocresol (BCP): no cambia el pH, y el crecimiento es restringido
- Agar papa con glucosa o agar con harina de maíz (Corn meal) con glucosa al 1%: favorece la producción de pigmento rojo al reverso de la colonia.

Trichophyton mentagrophytes.

Var. mentagrophytes

Colonia:

- **Aspecto:** Las colonias son pulverulentas a granulares, planas, de bordes radiados.
- **Color:** De crema a canela en la superficie. En el revés de la colonia, se aprecia un pigmento variable que va desde canela, hasta amarillo, rojo o café rojizo. Algunas veces se produce un pigmento difusible amarillo melanoide.

Var. interdigitale

- **Aspecto:** Las colonias son algodonosas densas, vellosas a aterciopeladas, planas a levantadas y de bordes netos.
- **Color:** La superficie presenta un centro crema con márgenes blancos. Muchos aislamientos son completamente blancos y algodonosos. Las colonias viejas adquieren un tinte rosado claro. El reverso de la colonia es café, amarilla a roja oscuro.

Esporulación:

Las formas zoofílicas o variedad *mentagrophytes*, son ricas en número y variedad de estructuras, mientras que la antropofílica o var. *interdigitale* tiene menos formas reproductoras y los aislamientos pleomórficos son esencialmente estériles.

En la variedad *mentagrophytes*, las microconidias son globosas a piriformes, están en acúmulos o a lo largo de las hifas y en la var. *interdigitale* piriformes, a lo largo de la hifa, difíciles de diferenciar de las de *T. rubrum*. Las macroconidias son multiseptadas en forma de clava, a veces irregulares, de pared delgada y lisa, se encuentran asociadas a microconidias y a otras estructuras. Se producen hifas en espiral que son más delgadas que las hifas vegetativas y por lo general están presentes; aunque ellas no son exclusivas de *T. mentagrophytes*, son siempre escasas en los cultivos de los demás dermatofitos que las producen. Pueden observarse también hifas pectinadas e hifas con aspecto de cuernos, cuerpos nodulares, clamidoconidias, artroconidias y estructuras semejantes a las hifas peridiales.

· **Pruebas fisiológicas:**

- Urea: positiva
- Perforación del cabello: positiva
- Factores que requiere para el crecimiento: ninguno

- Agar de Bromo Cresol Púrpura (BCP) con leche y glucosa: cambia el pH, y el crecimiento es profuso
- Agar papa con glucosa o agar harina de maíz (Cornmeal) con glucosa al 1%: no favorece la producción de pigmento rojo al reverso de la colonia aún en los aislamientos que secretan pigmento rojo en agar Sabouraud.
- Crece bien a 37°C.

Trichophyton tonsurans.

Colonia:

- **Aspecto:** variable, desde sedosa, aterciopelada a pulverulenta. Plana, cerebriforme, plegada o crateriforme.
- **Color:** Muy variable, desde blanca, crema, grisácea a café canela, algunas veces con tintes rosa y otras amarilla clara u oscura en la superficie, con tinte más o menos rojizo en el reverso de la colonia. En algunos casos las colonias pueden ser claras y poco pigmentadas.

Esporulación: Usualmente las microconidias son abundantes, de tamaño variable, en forma de lágrima, clava, balón, alargadas y a veces, filiformes, dispuestas a los lados de hifas terminales o ramificadas y gruesas. Las microconidias, individualmente, tienen tendencia a crecer y producir formas en clava o balón. Estas, pueden encontrarse agrupadas como en *T. mentagrophytes*. Las macroconidias de pared gruesa o delgada, multiseptadas, son sinuosas, más irregulares que las de *T. mentagrophytes* y no hay formas tan largas como las observadas en *T. rubrum*. Es frecuente la formación de artroconidias, clamidoconidias y cuerpos nodulares.

· **Pruebas fisiológicas:**

- Urea: positiva
- Perforación del pelo: usualmente negativa (raras veces positiva)
- Factores que requiere para el crecimiento: la tiamina estimula su crecimiento
- Agar leche glucosado con púrpura de bromocresol (BCP): muchos aislamientos alcalinizan el medio.
- Agar papa con glucosa o agar con harina de maíz (cornmeal) con glucosa al 1%: no favorece la producción de pigmento rojo

al reverso de la colonia, aún en los aislamientos con pigmento rojo.

3.9 Identificación de las principales levaduras

El laboratorio de micología identifica levaduras que tienen significancia clínica. Para lo cual se dispone de múltiples sistemas bioquímicos y fisiológicos rápidos; y también pruebas sencillas que son útiles para identificar el género y la especie de la(s) levadura(s) aislada(s) de la muestra analizada tales como: observar la micromorfología, producción de pigmento, asimilación de carbohidratos, producción de ureasa, susceptibilidad a la cicloheximida, desarrollo de película, desarrollo a 37 y 42 °C.

Pruebas rápidas: con el empleo de estas pruebas se pueden identificar género y especie de algunas levaduras de forma rápida en un tiempo no mayor de 48 horas de manera confiable.

a. Producción de tubo germinal o filamentización en suero: consiste en colocar una pequeña porción de una colonia obtenida de un cultivo de 24 horas en 0,5 ml de suero e incubar a 37 °C por 2 horas. Esta prueba es positiva para *C. albicans*, quien produce un tubo fino y continuo, sin constricción en el lugar de origen.

b. Producción de clamidoconidias: para obtener esta estructura de resistencia característica de *C. albicans*, es necesario utilizar el medio de bilis agar y/o corn meal agar (CMA), colocando en el mismo una pequeña porción de la colonia de levadura, incubando a 28 °C por 24-48 horas.

c. Resistencia a la actidiona o cicloheximida (Mycosel): la mayoría de las especies de *Candida* no-*albicans* son sensibles a la actidiona por lo que no crecen en éste medio; son pocas las que son resistentes a dicho antibiótico y la especie más importante resistente al mismo es *C. albicans*.

d. Producción de color en medio cromogénico: empleando el medio de CHROMAgar *Candida*, se obtiene un color característico según la especie, al término de la incubación por 24 a 48 horas a 28 o 37°C. El fundamento se basa en la detección de actividades enzimáticas por parte de las levaduras mediante la hidrólisis específica de un substrato cromogénico en presencia de un indicador. Tanto en el medio producido por Oxoid® como en el de Becton Dickinson® se pueden identificar 3 especies con una alta confiabilidad por el color de la colonia. *C. tropicalis* produce colonias lisas, cremosas de color azul intenso o colonias verde azuladas oscuras y ambas con tono metálico; *C. krusei* produce colonias de color rosa pálido, de aspecto vellosos o ligeramente aterciopelados, opaco o seco y de superficie plana; *C. albicans* produce colonias de color verde esmeralda, brillantes, lisas y cremosas. Es importante recordar que *C. dubliniensis* se comporta fenotípica y bioquímicamente igual a *C. albicans* y por lo tanto también produce colonias verdes, haciendo indistinguible una especie de la otra, aunque algunos autores señalan que *C. dubliniensis* produce colonias de color verde oscuro y no crece a 42°C. La única diferencia entre ellas se realiza por biología molecular, técnica no siempre disponible en nuestros laboratorios.

Las colonias con otros colores obtenidos en el medio cromogénico, requieren pruebas complementarias adicionales para identificar la especie de *Candida* correspondiente.

Se recomienda la utilización de éste medio para obtener aislamiento primario a partir de muestras clínicas provenientes de pacientes críticamente enfermos con sospecha clínica de candidiasis, y así ofrecer una orientación preliminar en la confirmación de la impresión diagnóstica. Esto permite instaurar una terapia antifúngica adecuada y eficaz en el menor tiempo posible. Además otra ventaja importante que nos ofrece el uso del medio cromogénico es la detección de 2 o más especies de *Candida* que pueden estar presentes en la muestra y que no es posible detectar en los medios de cultivos habituales.

e. Prueba de crecimiento en cloruro de sodio (NaCl) al 6,5%: permite diferenciar fenotípicamente *C. albicans* de *C. dubliniensis*. Consiste en preparar una suspensión de la levadura sospechosa a 0,5 McFarland y agregar 25 µl de esta suspensión a un tubo de ensayo con 1 ml de NaCl al 6,5% y una gota de extracto de levadura al 10%; posteriormente se incuba a 37 °C por un máximo de 72 horas. Si al término de este tiempo se obtiene turbidez y crecimiento en el tubo la identificación corresponderá a *C. albicans*. El resultado contrario, sin turbidez y sin crecimiento, corresponderá presuntivamente a *C. dubliniensis*. Es importante guardar este aislamiento para su confirmación posterior por técnicas de biología molecular.

f. Prueba de termotolerancia: ésta consiste en incubar las colonias de levaduras a temperatura de 42 a 45 °C. La mayoría de las especies de *Candida* no *albicans*, no crecen a temperaturas mayores de 37°C.

g. Hidrólisis de urea: con esta prueba se pone en evidencia la actividad de la enzima ureasa presente en algunas especies de levaduras. La hidrólisis de urea se produce en el medio de agar Urea de Christensen, después de inocular a la levadura en proceso de identificación en el medio por 48 horas a 28°C. Una prueba positiva se manifiesta por el viraje de color del medio naranja a fucsia. Entre los géneros de levaduras que son ureasa positivos están *Cryptococcus*, *Rhodotorula* y *Trichosporon*.

Pruebas convencionales: consisten en la implementación de una serie de procedimientos que requieren un mayor tiempo de incubación para llegar a la identificación de género y especie de la levadura que no pudo ser identificada con las pruebas rápidas.

a. Características morfológicas

Macroscópicas: en medios sólidos se observa el aspecto de las colonias (mucosa o brillante, opaca o mate, butirosa o plegada, lisa, rugosa, levantada o plana, aterciopelada), tamaño y color. En medios líquidos, como el caldo Malta, se observan características como la formación de velo, anillo o sedimento, según el requerimiento de oxígeno por parte de la levadura.

Microscópicas: en medio líquido observaremos forma, tamaño y reproducción de las levaduras, empleando para ello el caldo Malta. Se inocula una porción de la colonia y se incuba por 3 días a 28°C. En medio sólido se observará la disposición de las blastoconidias y formación de pseudomicelio, característicos para cada especie de *Candida*. Para ello se usará el método de Dalmau, que consiste en sembrar por estrías una porción de la colonia en el medio de CMA y se le coloca encima una laminilla cubre objeto; posteriormente se incuba a 28°C por 24 a 48 horas y luego se observa en el microscopio la morfología característica para cada especie.

b. Reproducción sexual: esta propiedad es inducida empleando el medio de agar Gorodkova, el cual favorece la formación de ascas en aquellas levaduras que poseen reproducción sexual. Consiste en sembrar una porción de la colonia en dicho medio e incubar a 28°C por 21 días; durante la incubación se realizan las coloraciones de Kufferath o Wirtz a los 7, 14 y 21 días, con el fin de observar la morfología típica (en forma de sombrero, circulares, con muescas ecuatoriales, etc.) y número de ascosporas por ascas. La formación de ascas es característica de algunos géneros de levaduras como *Saccharomyces*, *Pichia* y *Zigosaccharomyces*, que tienen fase sexual descrita.

c.Pruebas bioquímicas y fisiológicas

Fermentación de azúcares (zimograma): se fundamenta en la propiedad que tienen las levaduras de utilizar los azúcares en anaerobiosis, lo cual se evidencia por la producción de gas. Los azúcares más utilizados son: glucosa, maltosa, sacarosa, galactosa, trehalosa y lactosa en concentración al 2% y rafinosa al 4 %. Los azúcares se preparan en medio basal (peptona, extracto de levadura y agua). La formación de gas (CO₂) se detecta incorporando al medio líquido un tubo de Durham invertido. La observación se hace diariamente, debido a que el gas se puede reabsorber.

Técnica

- Preparar una suspensión de la levadura en estudio bien turbia (patrón N° 4 Mc Farland).
- Añadir 3 gotas de la suspensión a los tubos que contienen los azúcares antes mencionados con el tubo de Durham invertido, agitar suavemente e incubar a 28°C por 21 días, observando diariamente.
- Interpretar e identificar según tabla de identificación de levaduras

NOTA: todo azúcar fermentado es asimilado, pero no todo azúcar asimilado es fermentado.

Asimilación de azúcares o carbohidratos (auxanograma): se fundamenta en la propiedad que tienen las levaduras de utilizar azúcares como fuente de carbono en condiciones de aerobiosis. El medio basal sólido para el auxonograma está exento de azúcares y alcoholes.

Técnica

- Fundir el medio H-S (Yeast Nitrogen Base, agar noble y agua). Este medio está preparado en tubos con tapa de baquelita, a razón

de 20 ml. Después de fundido se debe mantener a una temperatura aproximada de 40 °C.

- Preparar 1 ml de una suspensión de la levadura en estudio bien turbia (patrón N° 4 Mc Farland) en solución salina estéril 0,85% por cada tubo a utilizar.
- Añadir la suspensión al medio H-S previamente fundido, mezclar suavemente por inversión, verter en placas de petri de 90 mm de diámetro y dejar solidificar a temperatura ambiente.
- Colocar sobre las placas discos de papel de filtro impregnados con los siguientes carbohidratos: glucosa, maltosa, sacarosa, inositol, lactosa, celobiosa, rafinosa, melibiosa, eritritol, ramnosa, galactosa, dulcitol, xilosa y trehalosa.
- Incubar a 28 °C por 24 a 72 horas.
- Lectura e interpretación: se considera la prueba de asimilación positiva si hay crecimiento de la levadura alrededor del disco y es negativa si no hay crecimiento.

Asimilación de nitratos (KNO₃): consiste en la utilización de nitratos por las levaduras como única fuente de nitrógeno. Se utiliza un medio basal con glucosa y deben usarse como controles positivos urea o KNO₃.

Técnica

- Fundir 20 ml del medio basal de carbono, el cual está dispensado en tubo, y mantenerlo a una temperatura aproximada de 40 °C.
- Preparar 1 ml de una suspensión de la levadura en estudio bien turbia (patrón N° 4 Mc Farland) en solución salina estéril 0,85%.
- Añadir la suspensión al medio de carbono fundido, mezclar suavemente por inversión y verter en placas de petri de 90 mm de diámetro; dejar solidificar a temperatura ambiente.

- Colocar sobre la placa dos discos de papel de filtro: uno impregnado con solución de peptona como control y otro con solución de nitrato (KNO₃).
- Incubar a 28 °C por 24 a 48 horas.
- Lectura e interpretación: crecimiento de la levadura alrededor del disco con KNO₃ y del disco control se considera una prueba positiva para la asimilación de nitratos.

d. Principales especies del Género *Candida* y *Cryptococcus*

Se han descrito más de 160 especies de levaduras pertenecientes al género *Candida* aproximadamente, y cerca de 10 especies son las que se aíslan con mayor frecuencia como agentes causales de candidiasis invasora.

Candida es una levadura que, dependiendo de la especie, presentará una morfología característica que ayudará en la identificación. Dentro de esa diversa morfología podemos observar formas redondas o globosas, ovaladas, cilíndricas, pequeñas o grandes; su gemación puede ser uni, bi o multipolar y además puede formar o no pseudomicelio.

Bioquímicamente asimilan y fermentan carbohidratos y no hidrolizan la urea. Los géneros de levaduras que hidrolizan urea son *Cryptococcus*, *Rhodotorula* y *Trichosporon*.

A continuación se describen las características morfológicas macro y microscópicamente más resaltantes de las levaduras de importancia médica que se aíslan con mayor frecuencia.

Candida albicans

Morfología macroscópica (SDA): colonias de crecimiento rápido, cremosas, de color blanco o ligeramente crema, lisas, convexas, de aspecto mate u opaco. En agar cromogénico se observan colonias de

color verde claro o verde esmeralda, ligeramente brillantes, lisas y convexas. Crecen en Mycosel y a 42°C.

Morfología microscópica (CMA): produce pseudohifas ramificadas con blastoconidios de tamaño regular redondos y gemantes, de paredes lisas, dispuestos en acumulo o racimos en los puntos de constricción de la pseudohifa; pueden o no estar presente las clamidoconidias características de ésta especie. Las clamidoconidias son estructuras redondas, de pared gruesa y lisa, con inclusiones citoplasmáticas; por lo general se ubican en posición terminal en la pseudohifa, aunque también pueden presentarse intercaladas. En el medio de Bilis agar podemos observar las clamicoconidias con las mismas características descritas. *Candida albicans* produce tubo germinal, liso y continuo después de 2 horas de incubación en suero a 37 °C; esta es otra característica micromorfológica que ayuda en la identificación.

Candida glabrata

Morfología macroscópica (SDA): colonias de crecimiento rápido, cremosas, de color blanco o beige, lisas, convexas, de aspecto ligeramente brillante. En agar cromogénico se observan colonias de color amarillo ocre, moradas o marrón claro, ligeramente brillantes, lisas y convexas. No crece en Mycosel y crece a 42 °C.

Morfología microscópica (CMA): no produce pseudohifas o pseudomicelio. Se observan blastoconidios pequeños, ovalados con gemación uni o bipolar; son de paredes lisas y finas.

Candida parapsilosis

Morfología macroscópica (SDA): colonias de crecimiento rápido, cremosas, de color blanco o ligeramente crema, lisas, convexas, de aspecto mate u opaco. En agar cromogénico se observan colonias de color crema o marrón claro, liso y convexo. No crece en Mycosel y no crece a 42°C.

Morfología microscópica (CMA): produce pseudohifas ramificadas con blastoconidios pequeños ovalados o alargados, de paredes lisas, dispuestos en pequeños racimos a lo largo de la pseudohifa. Los blastoconidios pueden presentar gemaciones y la pseudohifa, en la mayoría de los casos, presenta un aspecto curvo por uno de sus lados.

Candida tropicalis

Morfología macroscópica (SDA): colonias de crecimiento rápido, cremosas, de color blanco, lisas, convexas, de aspecto mate u opaco. En agar cromogénico se observan colonias de color azul púrpura intenso u oscuro con brillo metálico, son lisas y convexas. No crece en Mycosel, aunque hay cepas que presentan un crecimiento débil y crece a 42°C.

Morfología microscópica (CMA): produce pseudohifas ramificadas con blastoconidios de tamaño regular redondos u ovalados únicos o en pequeños grupos con poca gemación, de paredes lisas, distribuidos espaciosamente a lo largo de la pseudohifa. Raramente produce clamidoconidios y de presentarse son muy escasos. También pueden producir el tubo germinal después de la incubación en suero por 2 horas a 37°C, pero la diferencia está en que el tubo que germina de la célula madre presenta una constricción en el punto de salida, y el diámetro es

mayor o grueso, el tubo no es continuo, ni fino como el que produce *C. albicans*.

Candida krusei

Morfología macroscópica (SDA): colonias de crecimiento rápido, cremosas, de color beige, vellosas, planas, opacas, de aspecto seco y con el borde micelial en cultivos con más de 5 días de incubación. En agar cromogénico se observan colonias de color rosa pálido a rosadas, secas, planas y vellosas o aterciopeladas. No crece en Mycosel y si crece a 42 °C.

Morfología microscópica (CMA): produce pseudohifas largas, ramificadas ligeramente gruesas o robustas con blastoconidios alargados o cilíndricos de tamaño medio y paredes lisas, agrupados a intervalos regulares, dispuestos como troncos cruzados.

Candida lusitanae

Morfología macroscópica (SDA): colonias de crecimiento rápido, cremosas, de color crema, lisas, convexas y brillantes. No crece en Mycosel y si crece a 42°C.

Morfología microscópica (CMA): produce pseudohifas ramificadas cortas y curvas en forma de S, con cadenas cortas de blastoconidios globosos y alargados, de tamaño regular y paredes lisas.

Candida guilliermondii

Morfología macroscópica (SDA): colonias de crecimiento rápido, cremosas, de color crema a rosa pálido, lisas, planas y brillantes. No crece en Mycosel y no crece a 42°C.

Morfología microscópica (CMA): produce pseudohifas finas y cortas, blastoconidios muy pequeños ovalados con poca gemación, agrupados en racimos en los puntos de constricción de la pseudohifa.

Rhodotorula rubra

Morfología macroscópica (SDA): se caracterizan por presentar pigmentos carotenoides que confiere a la colonia un color naranja o rojo anaranjado, de aspecto cremoso o rugoso, brillante y de superficie lisa.

Morfología microscópica (CMA): levaduras redondas, ovoides de 2 – 6,5 micras de diámetro, en ocasiones forman pseudomicelio rudimentario, se encuentran dotadas de una fina cápsula visible al examen directo con tinta china.

Trichosporon spp

Morfología macroscópica (SDA): son de rápido desarrollo, liso, plegado, aterciopelado, ceroso, de color blanco – amarillento – crema. La textura plegada es más prominente en el tiempo.

Morfología microscópica (CMA): se visualiza artroconidias y blastoconidias. Las blastoconidias son unicelulares y de forma variable y nacen en brotes en los ángulos de las artroconidias. La principal

característica es la de presentar artroconidias usualmente en forma cúbica o de barril.

Geotrichum spp.

Morfología macroscópica (SDA): son de crecimiento rápido, en el período de una semana presentan un color blanco – grisáceo que posteriormente cambia a un tinte amarillento con aspecto ceroso, polvoriento a rugoso. La temperatura óptima de crecimiento es 25 °C, la mayoría de las cepas no desarrollan o lo hacen débilmente a 37 °C.

Morfología microscópica (CMA): se observa artroconidias unicelulares, en cadena, hialinas que resultan de la fragmentación de hifas no diferenciadas por fisión a través de un doble septo, estas estructuras tienen forma rectangular y redondeada en los extremos, semejante a un barril. Carecen de blastoconidias, conidióforos y pseudohifas.

Cryptococcus neoformans

Morfología macroscópica (SDA): colonias de crecimiento rápido, cremosas, mucosas y brillantes, lisas, convexas, de color crema a marrón a medida que aumentan los días de incubación. En agar cromogénico producen un color café o marrón brillante. No crece en Mycosel y no crece a 42°C. Son ureasa positiva.

(a)(b)

Morfología microscópica (CMA): se observan blastoconidios redondos, globosos y ovalados, grandes, de pared gruesa y lisa; pueden presentar gemación polar o multipolar y no producen pseudohifas. En el interior del blastoconidio pueden observarse a veces inclusiones citoplasmáticas. La

presencia de cápsula es característica de las levaduras pertenecientes a este género y se evidencia en preparaciones con tinta china.

Malassezia spp

Las levaduras de *Malassezia furfur* por ser lipofílicas, se desarrollan en medios de cultivo que contengan en su composición aceites naturales u otras sustancias grasas, siendo el método más común el cultivo en ASD que contiene cicloheximide o actidione y aceite de oliva, sin embargo existen medios de cultivo alternativos como el agar de Dixón que en su formulación incluye al glicerol mono – oleato que estimula el crecimiento *in vitro* de la levadura. La identificación se basa en comparar características morfológicas y fisiológicas.

Morfología macroscópica (SDA): Se caracterizan por ser redondas de consistencia cremosa y de color blanco amarillento.

Morfología microscópica: Se observa células globosas, elipsoidales a cilíndricas que se reproducen por gemación.

e. Métodos automatizados para la identificación de levaduras

En las últimas décadas se han desarrollado métodos comerciales, manuales y automatizados, basados en la asimilación de nutrientes. Entre los comerciales de ejecución manual se encuentran API 20C®, API Candida®, Auxacolor®, Candifast®, Fungichrom®, Fungifast® y RapID Yeast Plus (Remel)®; entre los comerciales automatizados están Biolo YT Microplate®, ID32C®, Microscan RYID (Rapid Yeast identificación)®, Vitek YBC (Yeast Biochemical Card)®, Vitek 2 YST®, Vitek 2 ID-YST® y MIS Microbial ID® (análisis de ácidos grasos). Estos últimos se encuentran actualmente disponibles en el mercado al alcance de los

laboratorios de microbiología, con la ventaja de que son más rápidos que los métodos convencionales, fáciles de utilizar y requieren el empleo de softwares para la identificación de las diferentes taxa. En Venezuela los sistemas automatizados disponibles son: Microscan RYID®, Vitek YBC® y Vitek 2 YST®. En el laboratorio de micología del Hospital Domingo Luciani contamos con un Microscan RYID®.

El sistema Microscan RYID® (Siemens) es un sistema automatizado para la identificación de levaduras aisladas en muestras clínicas, que mide principalmente actividades enzimáticas, usando sustratos cromogénicos e identificando las levaduras en un período de 4 horas. Las pruebas cromogénicas rápidas están basadas en la detección de enzimas preformadas en un microorganismo desconocido, de este modo, el medio de cultivo en el que ha crecido el organismo influirá en los resultados de la prueba, debido a que promueve la expresión de diferentes enzimas.

El MicroScan® (Siemens) consta de una placa de 96 pocillos de microdilución con 27 sustratos deshidratados: 13 de aminoácidos β -naftilamidas, 3 de carbohidratos, 9 de sustratos nitrofenilos, 1 de 3-indoxil fosfato y urea. Además, el panel incluye dos pocillos control para ayudar a interpretar las reacciones: control β -naftilamida (BNAC) y control nitrofenilo (NPC). La lectura de estas reacciones se hace por comparación con un control de crecimiento y la identificación se obtiene, a partir de un código numérico, mediante un catálogo analítico o un programa informático.

Los resultados de las reacciones bioquímicas son empleados para crear perfiles numéricos de nueve dígitos, que son comparados con una base de datos numérica de identificación de organismos que provee el sistema, o se realiza la interpretación automática mediante el AutoScan-4 o Walkaway. Las identificaciones se consideran correctas cuando el porcentaje de identificación obtenido es superior o igual a 85 %.

El Vitek Yeast Biochemical Card® (YBC) (bioMerieux) es un sistema automatizado útil para la identificación rápida de levaduras clínicamente importantes. Consiste en una tarjeta de plástico con 30 pocillos, 26 de los cuales son pruebas bioquímicas convencionales y 4 controles negativos. Se usa en conjunto con un sistema automatizado, que incluye un ordenador programado, incubador lector, módulo envase, módulo sellador y la impresora. La tarjeta de plástico, después de su inoculación con la levadura en estudio, se incuba a 30°C durante 24 o 48 h y es leída de forma automática. Las identificaciones consisten en la conversión de los resultados de las pruebas bioquímicas en un número de nueve dígitos, que posteriormente se compara con los códigos de la base de datos del ordenador. Las respuestas se expresan en una o más posibilidades, siendo considerada una identificación correcta de la levadura cuando el porcentaje de identificación es igual o superior al 85%.

El Sistema Vitek 2 YST® (bioMerieux) es un sistema automatizado para la identificación de levaduras. Consiste en una tarjeta de plástico con 64 pocillos, de los cuales 4 son para detección de aminopeptidasas, 25 para asimilación de carbohidratos, 1 para hidrólisis de esculina, 3 para glucosidasas, 3 para asimilación de KNO₃ y compuestos nitrogenados, 9 para asimilación de ácidos orgánicos y 1 para hidrólisis de urea. Después de la inoculación de la tarjeta con la levadura en estudio, se incuba a 35°C durante 18 h y es leída de forma automática. El software compara el conjunto de reacciones de las pruebas con las reacciones suministradas en la base de datos para cada organismo. Se calcula un valor de concordancia (porcentaje de probabilidad) que representa el nivel de comparación entre las pruebas bioquímicas observadas y el patrón habitual de cada organismo; si existe una concordancia excelente el valor de la probabilidad es del 99%. Se

considera que la identificación de la levadura es correcta cuando el porcentaje de identificación es igual o superior al 85%.

f. Identificación mediante aspectos inmunológicos

Estas metodologías permiten la rápida identificación de aislamientos de *C. albicans* y *C. krusei*, mediante aglutinación de partículas de látex, usando anticuerpos monoclonales específicos para ambas especies. Entre los kits disponibles tenemos a: Bichro – látex albicans ®, krusei – color ®.

También tenemos la determinación de anticuerpos en el suero del paciente de hongos productores de micosis profundas, mediante la técnica de Inmunodifusión doble en agarosa para *Histoplasma capsulatum*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Coccidioides immitis*, y *Aspergillus spp.*

g. Pruebas de susceptibilidad a los antifúngicos

El estudio de la susceptibilidad *in vitro* está basado en la determinación de la sensibilidad y/o resistencia de los microorganismos a los antimicrobianos. Y tiene como fin el proporcionar un resultado *in vitro* fiable de la actividad relativa de un antifúngico para predecir la respuesta clínica más probable al tratamiento. En este laboratorio se hacen las pruebas de sensibilidad frente a los antifúngicos de uso frecuente como son fluconazol y voriconazol, por el método de difusión de Disco en Agar.

1. Métodos de dilución (M27-A2/CLSI y EUCAST) para la determinación de la CIM por microdilución en caldo. Estos métodos por su complejidad están restringidos a los centros de referencia. En la Tabla 2 se resumen las condiciones necesarias para la realización de

estos métodos y en la Tabla 3 los puntos de corte establecidos para la lectura de los antifúngicos ensayados.

Si bien es cierto que estos son los métodos de referencia, tienen varias desventajas, entre las que se encuentran: la técnica es muy delicada, el medio de cultivo utilizado (RPMI 1640) es muy costoso y se contamina fácilmente, es necesario disponer del antifúngico químicamente puro suministrado por el laboratorio que obtuvo la patente del mismo, entre otras. Debido a estas razones, son métodos de difícil implementación en un laboratorio de microbiología de rutina. Conociendo estas debilidades, el CLSI posteriormente estandarizó la realización de pruebas de susceptibilidad a los antifúngicos por el método de difusión en agar, publicadas en el documento M44-A.

2. Métodos de difusión en agar (M44-A-CLSI y/o Etest). Con el primero se determina la sensibilidad o resistencia cualitativa con discos, a través de la medición del diámetro de un halo de inhibición medido en milímetros. Con las tiras de Etest se determina CIM en $\mu\text{g/ml}$. Estos métodos son los que se utilizan en los laboratorios asistenciales, debido a que son sencillos, rápidos y fáciles de interpretar; tienen una concordancia con el método de referencia de 90% para el disco y 96% para el Etest.

Actualmente, es necesario implementar las pruebas de susceptibilidad a los antifúngicos, sobre todo cuando el agente causal involucrado es una levadura de importancia médica, aislada de pacientes críticamente enfermos y con factores de riesgo para el desarrollo de una candidiasis invasora y/o diseminada, con el fin de conocer su comportamiento *in vitro*. Esto permitirá posteriormente establecer pautas terapéuticas que ayuden a minimizar la resistencia en los centros de salud.

Es importante utilizar controles de calidad en las pruebas de susceptibilidad a los antifúngicos, independientemente del método. Las

cepas de referencia recomendadas por el CLSI son *C. parapsilosis* ATCC 22019 y *C. krusei* ATCC6258. También se deben controlar ciertos parámetros para confiar en los resultados de la prueba, entre ellos: inóculo a partir de un repique no mayor a 24 horas, temperatura de incubación 35°C, pH del medio de cultivo y solución buffer según el caso y el adecuado mantenimiento de las drogas antifúngicas, entre otras. A continuación se anexan las tablas con los valores de referencia para CMI por microdilución en caldo y por difusión.

Los métodos comerciales existentes, como ETEST y NEO-SENSITABS, están basados en el manual del CLSI y para su realización deben seguirse estrictamente las instrucciones del fabricante, para poder interpretar los resultados obtenidos.

4.0 Identificación de los principales hongos filamentosos

Aspergillus fumigatus

Morfología macroscópica (SDA): las colonias desarrollan con rapidez sobre SDA o agar Czapek a 25 °C. La textura de las colonias es aterciopelada, afelpada, vellosa o algo plegada, con margen blanquecino o beige. El color inicialmente es blanco virando en aproximadamente siete días a un verde azulado por la producción de conidias. El reverso de la colonia es incoloro.

Morfología microscópica: presentan conidióforo corto, liso de hasta 300 µm de longitud y de 5 a 8 µm de diámetro, vesícula de 20 a 30 µm de diámetro con fiálides (6 a 8 µm de largo), uniseriada, ocupando 2/3 de la vesícula. Los conidios en cadenas forman una compacta columna sobre la vesícula, son de color verde, finamente rugosos, globosos o subglobosos y de 2 a 3 µm de diámetro.

Aspergillus flavus

Morfología macroscópica (SDA): Las colonias desarrollan rápidamente sobre SDA o agar Czapek a 25 y 37 °C en cinco a siete días. El color es verde – amarillo. La textura de las colonias es pulverulenta con surcos radiales, rugosas o granuladas, ocasionalmente algodonosas en el centro o margen de la colonia. El reverso de la colonia es incoloro.

Morfología microscópica: Los conidióforos no ramificados de pared gruesa, hialinos, rugosos, de ≥ 1 mm de longitud y de 10 a 20 µm de diámetro. Las vesículas son globosas o subglobosas de 10 a 65 µm de diámetro produciendo fiálides uni o biseriadas alrededor de la vesícula. Los conidios son de colores verde amarillentos, lisos o finamente rugosos,

esféricos o subesféricos con un diámetro de 3,5 a 4,5 μm de diámetro. Los esclerotes pueden estar presentes.

Aspergillus niger

Morfología macroscópica (SDA): Colonias de rápido desarrollo sobre ASD o agar Czapek a 25 y 37°C. El color de las colonias al principio es blanco a amarillo, luego es negro. La textura de las colonias es granular. El reverso de la colonia es incoloro o crema.

Morfología microscópica: Los conidióforos son de pared lisa, hialina o pigmentada y miden de 1,5 a 3 μm de largo y de 15 a 20 μm de diámetro. La vesícula es globosa con 50 - 100 μm de diámetro y produce fiálides alrededor de ella. Las fiálides son biseriadas, las ramas primarias miden 30 μm de largo y pueden estar tabicadas, mientras que las secundarias son cortas y miden 8 μm de longitud, a partir de las cuales brotan los conidios, los cuales son globosos y rugosos con 4 a 5 μm de diámetro, de color castaño o marrón a negro.

Fusarium solani

Morfología macroscópica (SDA): Las colonias tienen un rápido desarrollo a 25 y 37 °C (siete días). El color de las colonias es blanco, crema, pardo claro o pardo rojizo mezcladas con zonas de color púrpura; raramente en cepas de aislamientos clínicos pueden presentar masas mucosas verdes azuladas, formadas por macroconidias que nacen de esporodoquios. La textura es algodonosa o lanosa. La colonia puede ser inhibida por la cicloheximida.

Morfología microscópica: Se caracteriza por presentar conidióforos de esporodoquios cortos, ramificados. Conidióforos de hifas aéreas

generalmente no ramificados, muy largos, reducidos a una simple fiálide más o menos cilíndrica, en cuyo ápice se puede encontrar un conidio no desprendido. Macroconidias en masas mucosas, hialinos, mayormente con tres septos, ligeramente curvados, fusiformes, pero con extremos más o menos redondeados 28 – 50 x 4 – 6 µm. Microconidias en masas mucosas, hialinos, lisos, generalmente unicelulares, pueden ser ligeramente curvados, elipsoidales o subcilíndricos de 7 – 16 x 2,5 – 4,5 µm. Presencia de clamidosporas terminales e intercalares, lisas o verrugosas, parduscas y de hasta 10 µm de ancho.

Scedosporium apiospermum

Morfología macroscópica (SDA): Crecimiento moderadamente rápido a 25 °C, y también desarrollar a 40 °C (siete días), de color blanco y textura algodonosa, pero a medida que se incrementa la esporulación el color cambia a gris o gris pardusco. El reverso de las colonias es amarillo pálido a marrón oscuro o negro dependiendo de la edad del cultivo. Las cepas aisladas de muestras clínicas raramente desarrollan la fase sexual. Crece sobre medios de cultivo que contienen clorhexidina.

Morfología microscópica: Células conidiógenas (anélides) casi cilíndricas, se desarrollan directamente sobre hifas indiferenciadas o a partir de conidióforos escasamente ramificados. Los conidios se acumulan en masas mucosas sobre las anélides o solitarios y sésiles desarrollándose de las hifas del micelio, lisos, de color pardo amarillento, ovals o elipsoidales (5 – 12 x 4 – 6,5 µm) con la base truncada. Presenta anillos hialinos acentuados.

Mucor spp.

Morfología macroscópica (SDA): Las colonias desarrollan rápidamente a 25 °C, cubriendo la superficie del medio de cultivo; crecen pobremente a 37 °C. El color de las colonias es blanquecino al inicio, con el tiempo cambia a marrón. El reverso de la colonia es blanquecino. La textura es algodonosa.

Morfología microscópica: Presentan hifas aseptadas y gruesas. Se caracteriza por presentar esporangióforos, esporangios. Carecen de apófisis, estolón y rizoides. Las columelas son hialina, siendo visibles si el esporangio se encuentra intacto. Los esporangios son esféricos o redondos (50 – 300 µm70 diámetro) y de color gris a negro, estando llenos de esporas.

Rhizopus oryzae

Morfología macroscópica (SDA): Colonias de crecimiento rápido a 37 °C a los cuatro días llegan a ocupar totalmente la placa Petri. Inicialmente son blancas pero luego cambian a gris parduscas. No desarrollan a 45 °C.

Morfología microscópica: El micelio carece de septos. Presentan estolones y rizoides. Los esporangióforos no son ramificados, tienen una longitud de 2 mm, generalmente están en grupos, formando verticilios en cuya base se sitúan los rizoides. Las apófisis pueden estar presentes pero son poco evidentes. Presentan esporangios esféricos cuyo ancho es de 50 a 300 µm, los cuales son de color gris pardusco a negro. La columela es subesférica abarcando entre 50 a 70% del esporangio. Las esporangiosporas son angulares y con estrías longitudinales, grisáceas, subes-féricas o elipsoidales con dimensiones de 6 a8 x 4 a 5 µm.

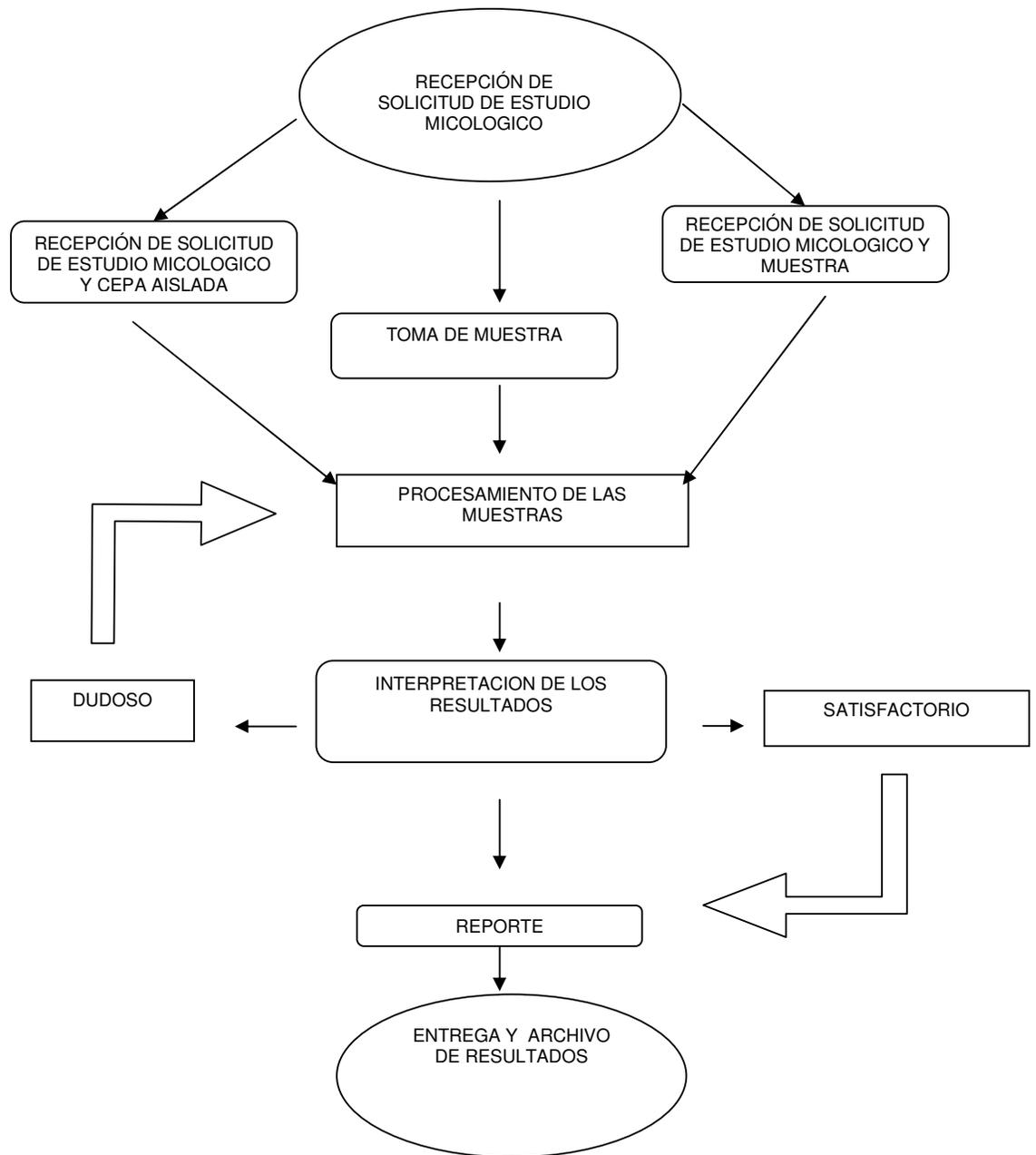
Absidia corymbifera

Morfología macroscópica (SDA): Colonias que desarrollan rápidamente a los cuatro días, incubando a 37 °C, abarcando la totalidad de la placa Petri. Son colonias de textura algodonosa y de color blanco a pardo.

Morfología microscópica: Se caracteriza por presentar hifas aseptadas. Desarrollan rizoides y estolones. Los esporangióforos nacen a partir de los estolones y entre los rizoides, únicos o en grupo.

4.1 Estandarización de procesos y flujogramas

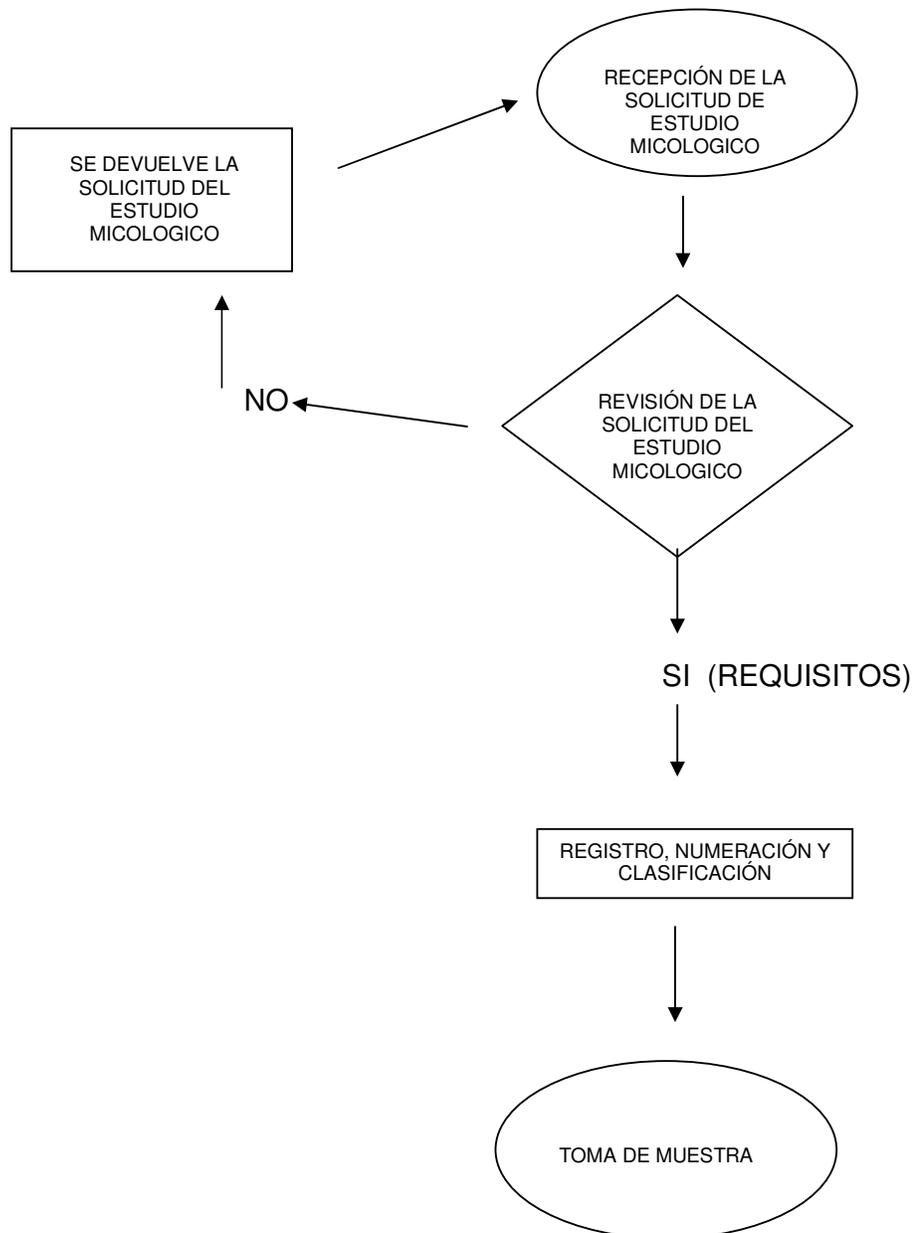
4.1.1 Procesos y flujogramas del Laboratorio de Micología del Hospital Dr. Domingo Luciani



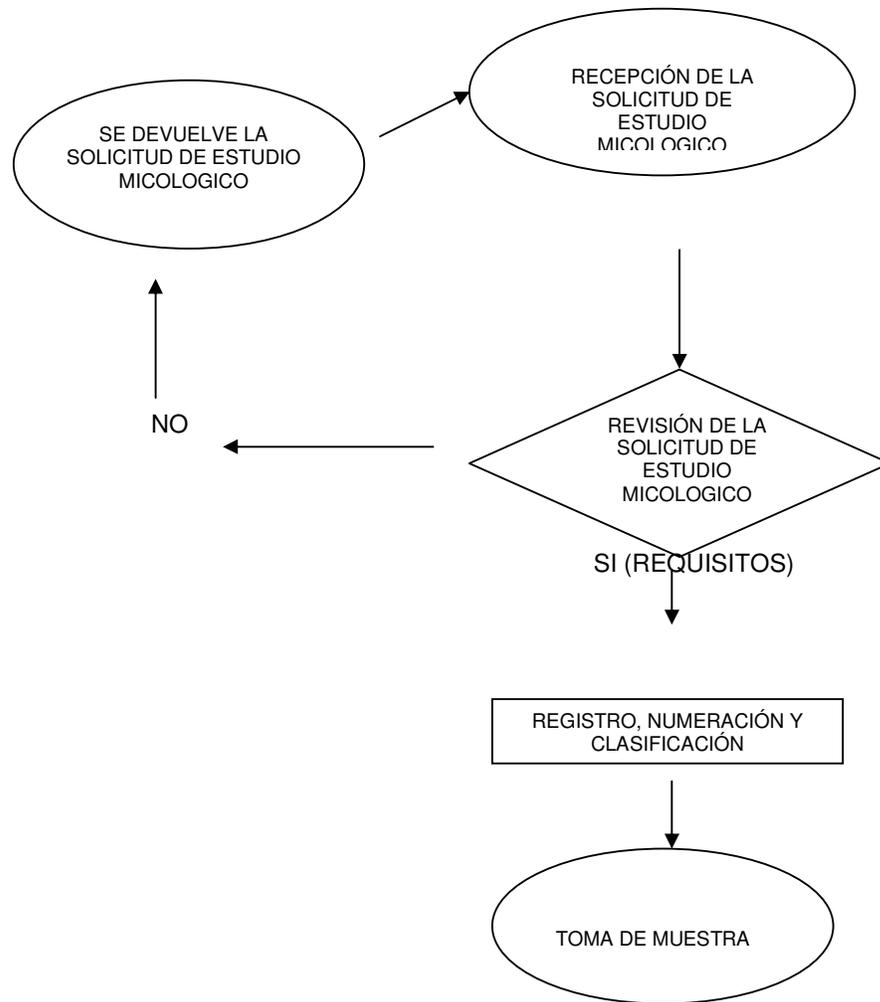
4.2 Procedimientos

4.2.1 Recepción de Solicitud de Estudio

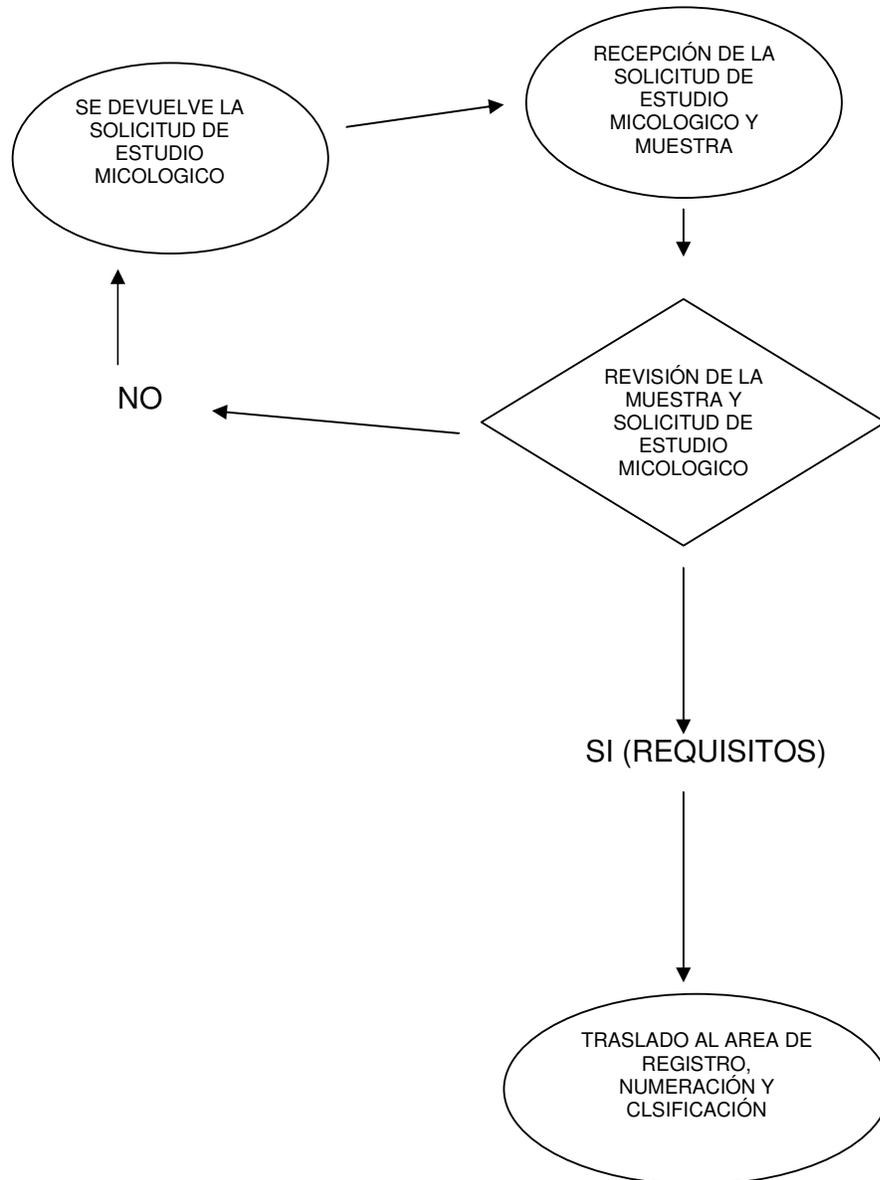
1. Consulta Externa o Ambulatorio



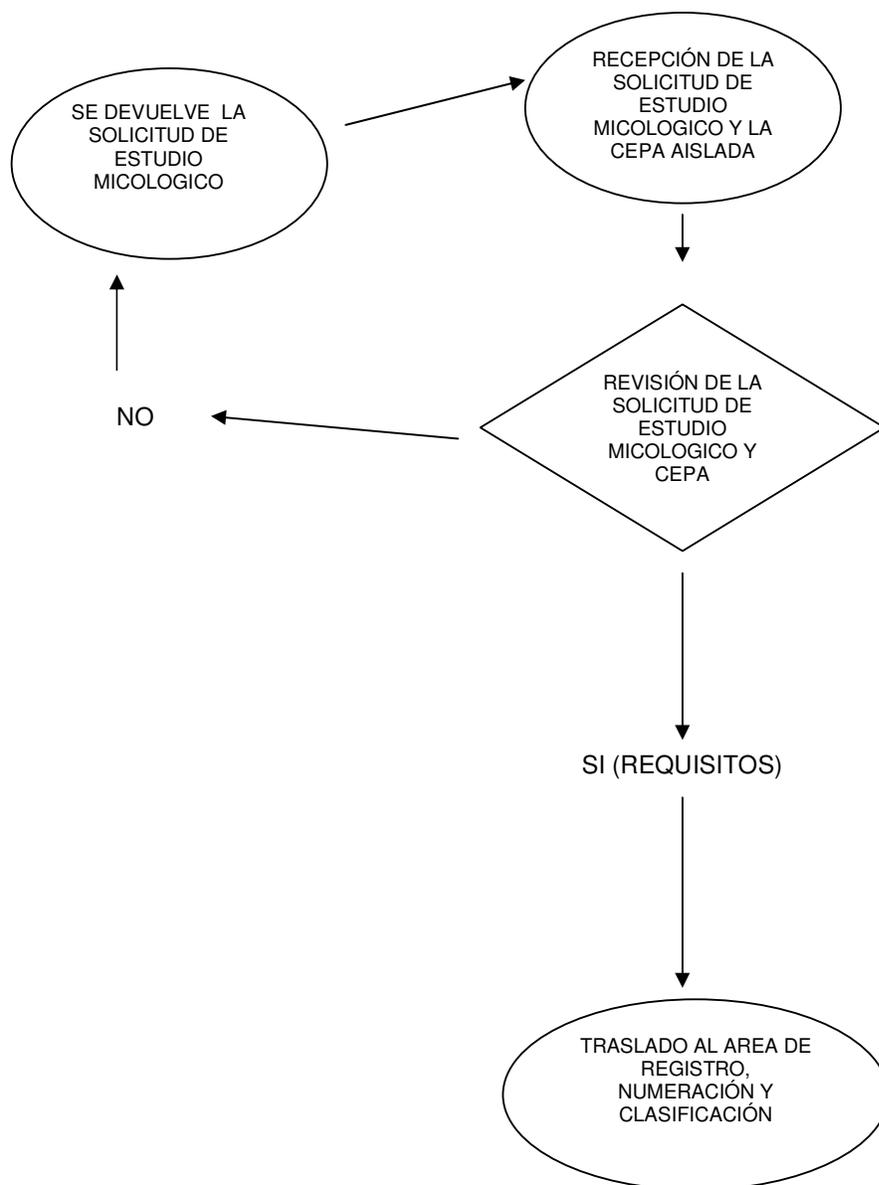
2. Paciente Hospitalizado



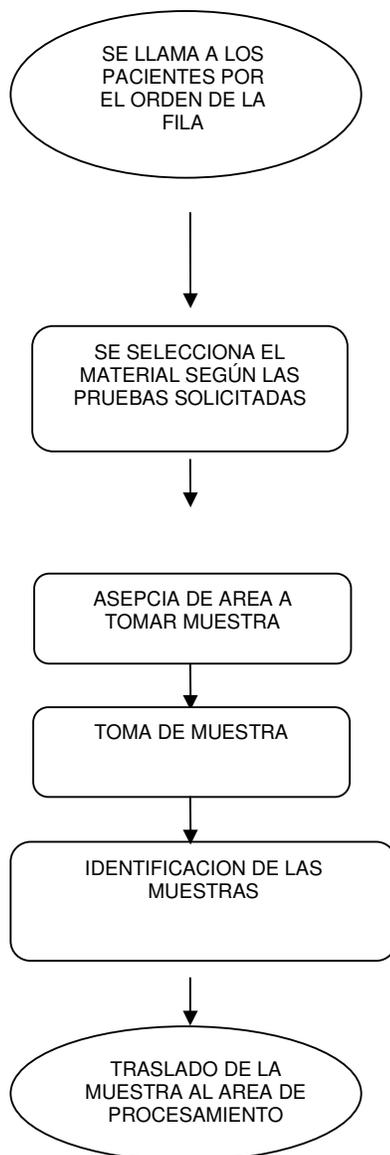
4.2.2 Recepción de solicitud de estudio micológico y muestra



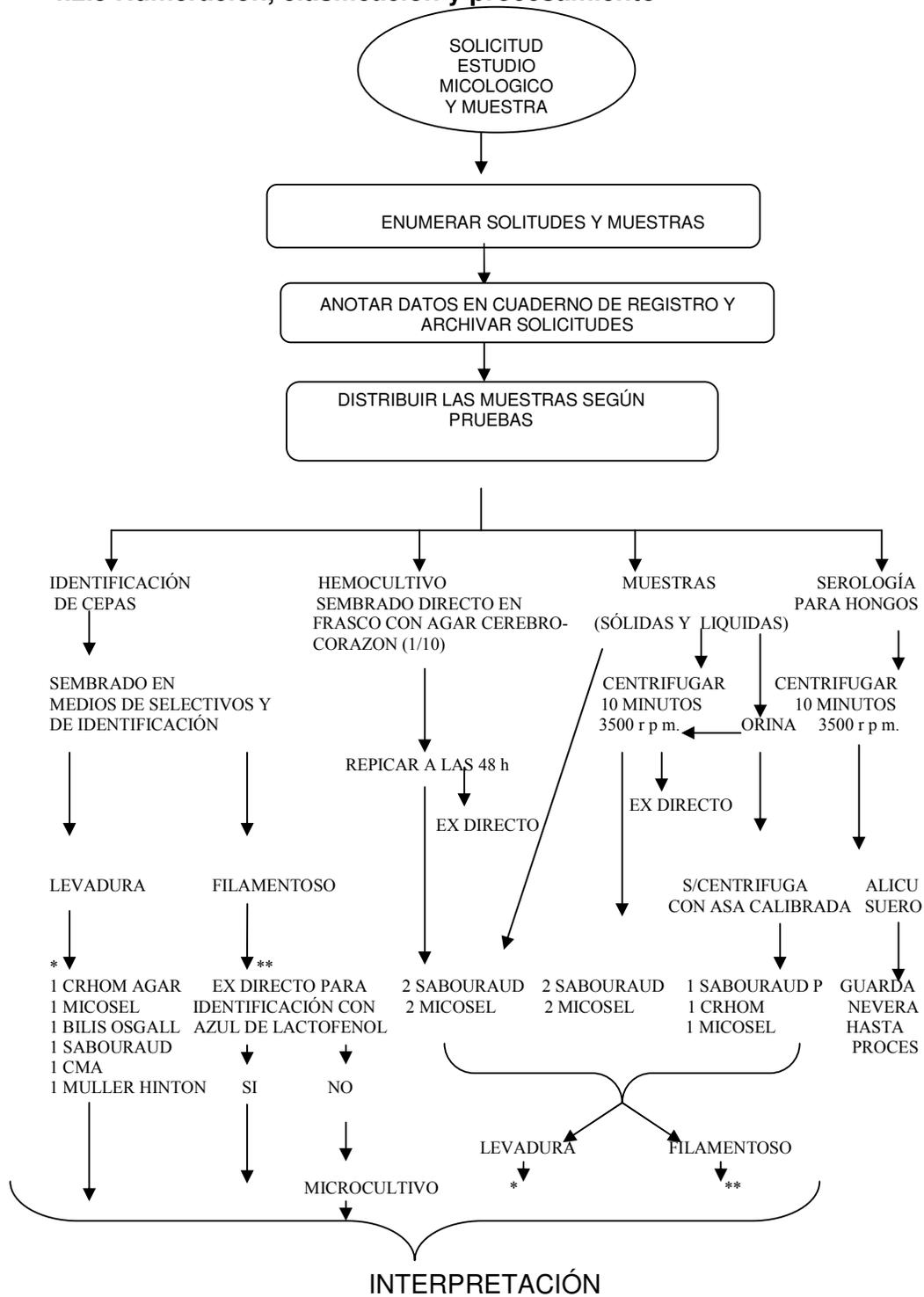
4.2.3 Recepción de solicitud de estudio y cepa aislada



4.2.4 Toma de muestra



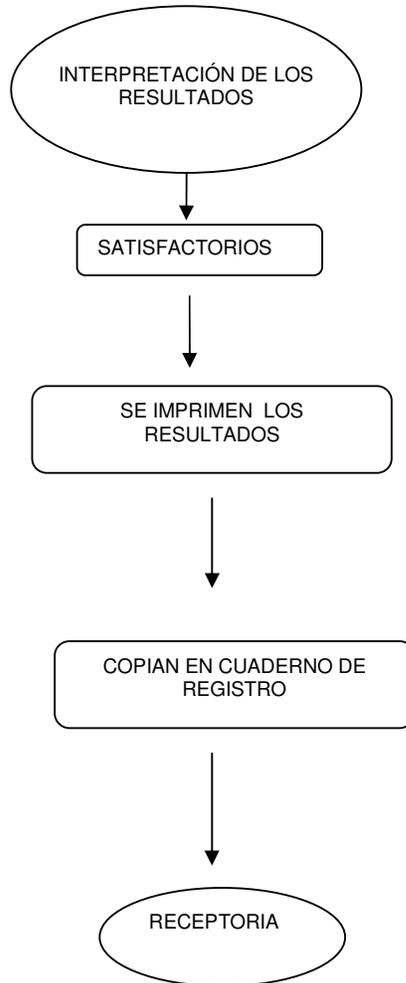
4.2.5 Numeración, clasificación y procesamiento



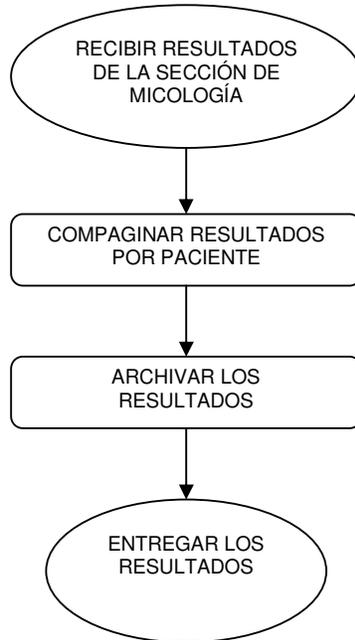
4.2.6 Interpretación de los Resultados

Ver capítulo V, capítulo VI, capítulo VII, interpretación de las principales micosis.

4.2.7 Reporte



4.2.8 Archivo y entrega de resultados



CONCLUSIONES

1. El personal encuestado en general no conoce el Manual de Normas. Procedimientos u organización de la sección de Micología servicio de Bioanálisis del Hospital Dr. Domingo Luciani ni ha recibido copia del mismo. Algunas personas creen conocer la Misión y Visión del Servicio sin embargo a la hora de enunciarlo resultó bajo el porcentaje que pudo hacerlo correctamente. Esto pudiera ser la principal causa de las dificultades del funcionamiento de este servicio, que por desconocimiento de esta información, las personas que aquí laboran, no participan en el logro de los objetivos que establece la Jefatura del Servicio y mucho menos toman parte en la toma de decisiones de las mismas. Por lo que consideramos que la información aquí recopilada debe ser difundida y aplicada oportunamente.
2. El manual de organización y estandarización de la sección de micología del Hospital del Este Dr. Domingo Luciani, es de vital importancia ya que en el se encuentra registrada y transmitida sin distorsión la información básica referente al funcionamiento de esta unidad, facilitando las labores de auditoria, la evaluación y su vigilancia, la conciencia en los empleados y en sus jefes de que el trabajo se está realizando adecuadamente.
3. Al definir el manual descriptivo del recurso humano se pudo resaltar que es importante establecer las atribuciones y funciones de las unidades administrativas que integran la sección de micología, señalando así los niveles jerárquico, grados de autoridad, responsabilidades, canales de comunicación y coordinación, así como las acciones afines ejecutadas por cada persona, las cuales son

esenciales para la ejecución de procedimientos, que permiten con su desarrollo, el logro de los objetivos establecidos en este laboratorio.

4. El establecer los recursos económicos – financieros y materiales del laboratorio de este laboratorio, nos permitió organizar administrativamente el mismo, ya que al tener claro que equipos y reactivos que tenemos disponibles, podemos planificar los futuros consumibles de este laboratorio, y así poder distribuir mejor la partida presupuestaria que corresponde, aprovechando al máximo los recursos, fundamentados en el rendimiento social.
5. Establecer la metodología que se usa en el laboratorio de micología del Hospital del Este Dr. Domingo Luciani, para el procesamiento de las diversas muestras biológicas con sospecha de infección fúngica, adaptadas a los Sistemas de calidad y programas de acreditación, mejora el diagnóstico, disminuye la prevalencia de patologías fúngicas no tratadas y permite detectar tempranamente los nuevos agentes oportunistas, colaborando así al establecimiento de la real epidemiología de los hongos en nuestro país.
6. El manual de organización y estandarización es un documento necesario en la sección de micología del Hospital del Este Dr. Domingo Luciani, porque permite alcanzar el fin último de esta unidad, que es proporcionar resultados confiables y oportunos de nuestros análisis de laboratorio, para contribuir a la prevención, diagnóstico y terapéutica de las enfermedades producidas por hongos, y así restituir la salud de toda la población que acude a este laboratorio.

RECOMENDACIONES

1. Es necesario dar a conocer a cada uno del personal que labora en esta área, así como al personal nuevo, lo contenido en este manual organizativo y de estandarización así como la misión, visión y valores del mismo, ya que el personal en general no conoce el Manual de Organización de este laboratorio, ni ha recibido nunca copia del mismo, para que los objetivos puedan llevarse a cabo eficientemente y además sirva de modelo a seguir en otras instituciones donde se hace micología. Sugerimos colocar el enunciado de la Misión y Visión de este servicio en una cartelera, visible y accesible a todo el personal, así como las funciones de cada uno de los que laboran en este servicio ya que al estar al tanto de estos conocimientos no exista dualidad de funciones y con esto se mejoraría el desempeño diario de esta sección y cada uno de los trabajadores pudiera tener un pensamiento más claro de la forma de colaborar en el buen funcionamiento y mejoramiento continuo de la Calidad de todo el servicio de Bioanálisis.
2. Se recomienda sensibilizar la personal de esta área por medio de charlas y conferencias donde se explique sencillamente la importancia de conocer el manual organizativo y de estandarización.
3. Se recomienda continuar con el manual de bioseguridad, que contempla parte del manual organizativo de este laboratorio para así lograr la certificación, acreditación y sobre todo el perfecto funcionamiento de esta área tan importante en los últimos años para la medicina como es el laboratorio de Micología y así evitar la

morbilidad tan acentuada de las enfermedades producidas por hongos, en nuestro país.

Referencias Bibliográficas

1. Arenas, R. (2004). Micología Medica Ilustrada. México: DF.
2. Bartizal, K., Gill, C., Abruzzo, G., et al. In vitro preclinical evaluation studies with the echinocandin antifungal MK-0991. *Antimicrob Agents Chemoter* 1997; 41:2326-2332.
3. Baenett JA, Payne R, Yarow D. A guide to identifying and classifying yeasts. Cambridge University Press. Cambridge, Great Britain 1979.
4. Cantón, E., Viudes, A., Pemán, J. Infección sistémica nosocomial por levaduras. *Rev. Iberoam Micol* 2001; 18:51-55.
5. Colombo AL, Nucci M, Park BJ, Nouér SA, Skaggs BA, da Matta DA, Warnock D, Morgan J. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centres. *J Clin Microbiol* 2006; 44 (8): 2816-23.
6. Del Palacio, A., Alhambra, A., Cuetara, M. Factores de riesgo de la candidiasis invasora: estratificación. *Rev Iberoam Micol* 2006; 23: 29-31.
7. Díaz MC. Utilidad clínica de la determinación de sensibilidad antifúngica *in vitro* . Programa de Microbiología y Micología, ICBM, Facultad de Medicina Universidad de Chile. Medwave. 2005
8. Diccionario de la lengua española © Espasa-Calpe S.A., Madrid. 2005
9. Dolande. Maribel, Reviakina. Vera, Panizo, Ma. Mercedes, Ferrara. Guisepe. Manual de identificación y pruebas de susceptibilidad de levaduras a los antifúngicos. Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel. 2009

10. Galván B, Mariscal F. Epidemiología de la candidemia en UCI. Rev Iberoam Micol 2006; 23:12-15.
11. García JC. Micosis en los pacientes hematológicos. Rev Iberoam Micol 2002; 19: 13-6.
12. Guevara Robles Miriam. Manual de Procedimientos y técnicas de laboratorio para la identificación de los principales hongos oportunistas causantes de micosis humanas. Ministerio de Salud. Lima, Perú, 2007
13. Fernandez, C. Mazziotta, D. (2005). Gestión de la Calidad en el Laboratorio Clínico. Ditorial medica Panamericana S. A. Madrid
14. Guía Técnica para la elaboración de Manuales de Procedimientos. Subsecretaría de administración y finanzas. Dirección general de programación, Organización y presupuesto. Dirección de Diseño y Desarrollo Organizacional. México. 2004.
15. Javier Pemán, Estrella Martín-Mazuelos, María del C. Rubio Calvo. Guía práctica de Identificación y Diagnóstico en Micología Clínica. Revista Iberoamericana de Micología. 1ª edición. Bilbao, España. 2001.
16. Méndez J, Herrera M. Métodos de susceptibilidad antifúngica. Revisión metodológica. Rev Méd Hosp Nac Niños (Costa Rica). 2001; 36 (1-2) : 37-44
17. Negroni. Ricardo, Guelfand. Liliana y col. Manual de Procedimientos para Laboratorios de Micología Médica. Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana .supl. 1, editado por la Federación Bioquímica de la Pcia. de Bs. As. Argentina, 1999
18. Pfaller M A, Diekema D J, M. G. Rinaldi, R, Barnes, B. Hu, A. V. Veselov, N. Tiraboschi, E. Nagy, D. L. Gibbs, and the Global Antifungal Surveillance Group. Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study: a 6.5 – Year Analisis of

- Susceptibilities of Candida and Other Yeast species to Fluconazole and Voriconazole by Standardized Disk Diffusion testing. *Journal of Clinical Microbiology*, 2005, vol 43, N° 12 p. 5848 -5859.
19. Reyes G. Heidi et al. Concentración inhibitoria mínima en levaduras susceptibles a fluconazol y voriconazol por el método de difusión de discos. *Rev. Hosp. Dr. Domingo Luciani*. Volum 3. N° 1. Enero – Junio 2005. pp 44-47.
 20. Robbins, Stephed. (1991). *Comportamiento Organizacional*. Mexixo. DF
 21. Rodero L, Davel G, Soria M, Vivot,W, Cordoba S, Canteros CE, Saporiti A, y participantes del grupo EMIFN. Estudio multicentrico de fungemias por levaduras en la Republica de Argentina. *Rev Argentina de Microbiol* 2005; 37: 189-95.
 22. Riuz. Ausina, Foraster. Ferrándiz. *Micosis de Piel y Mucosas*. En Farreras Rozman. Volumen 1, *Medicina Ineterna*1. 14 Edición. Madrid España; 2000. P. 2701.
 23. Rodríguez JL, Cuenca M, Mellado E, Monzón A. Presente y futuro de la micología médica. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2003; 21 (2): 75-80
 24. Silva V, Zepeda G, Abarca C, Cabrera M, Contreras L. Aspectos epidemiologicos de las infecciones del torrente sanguineo por levaduras. *Confrontando nuestra realidad con el mundo*. *Rev Ciencia y Salud* 2002; 6 (1): 51-8.
 25. Stanton, Etzel y Walker, *Fundamentos de Marketing*, Mc Graw Hill, 13a. Edición, 2004, Págs. 212-219.
 26. Steven D, Brown M, Traczewsk M. Caspofungin disk diffusion breakpoints and quality control. *J Clin Microbiol*

Doi:10.1128/JCM.00279-08. En <http://www.asm.org/journals>.

Consultado en Marzo 2008.

27. Yáber, Guillermo y Valarino, Elizabeth. Tipología, fases y modelo de gestión para la investigación de postgrado en Gerencia. Proyecto de investigación y aplicación. www.monografias.com. Manual de procedimientos.
28. [www.monografias.com/muestreo y tamaño de muestra](http://www.monografias.com/muestreo-y-tamano-de-muestra)
29. www.gestiopolis.com/recursos/documentos/
30. www.cvisiontech.com. La gestión de Calidad y el Mejoramiento del Diagnostico de Microorganismos Fúngicos. 2005.

ANEXOS

ANEXO 1. ENCUESTAS

UNIVERSIDAD CATÓLICA ANDRÉS BELLO GERENCIA DE SERVICIOS DE SALUD

ENCUESTA

MISIÓN Y VISIÓN

(SECCION DE MICOLOGÍA- HOSPITAL DR. "DOMINGO LUCIANI")

LA PRESENTE ENCUESTA ES PARTE DE UN TRABAJO DEL POST-GRADO DE **GERENCIA DE LOS SERVICIOS ASISTENCIALES DE SALUD**. ES UNA ENCUESTA ANÓNIMA Y SOLO TENDRÁ USO ACADEMICO. GRACIAS POR TU TIEMPO.

FECHA:

SEXO: F M

1. HA RECIBIDO UNA COPIA DEL MANUAL DE NORMAS, PROCEDIMIENTOS U ORGANIZACIÓN DE LA SECCIÓN DE MICOLOGÍA DEL SERVICIO DE BIOANALISIS:

SI NO

2. SABE CUAL ES LA MISIÓN DE LA SECCIÓN DE MICOLOGÍA DEL SERVICIO DE BIOANALISIS?:

SI NO

PODRÍA ENUNCIARLA:

3. SABE CUAL ES LA VISIÓN DE LA SECCIÓN DE MICOLOGÍA DEL SERVICIO DE BIOANALISIS?:

SI NO

PODRÍA ENUNCIARLA:

ANÁLISIS

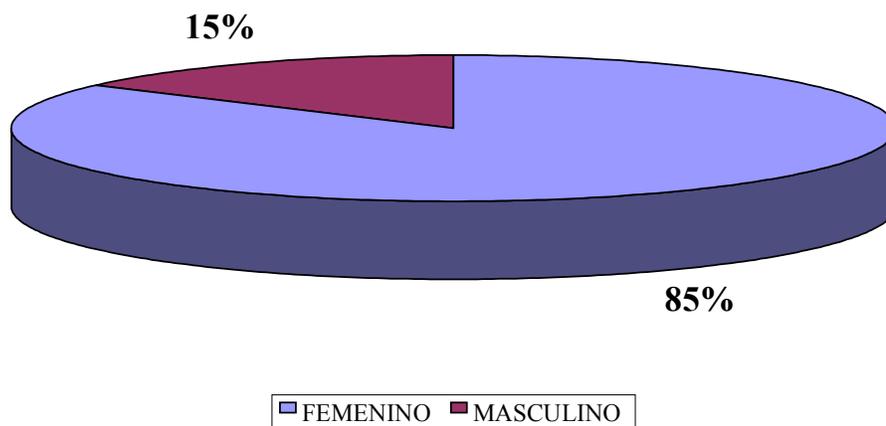
Características demográficas de los encuestados

A.1 Distribución por Género del personal del servicio de Bioanálisis encuestado.

TABLA A.1 DISTRIBUCION POR GÉNERO DEL PERSONAL ENCUESTADO DEL SERVICIO DE BIOANALISIS DEL HOSPITAL Dr. DOMINGO LUCIANI. JULIO 2009.

GENERO	NUMERO	PORCENTAJE
FEMENINO	51	85
MASCULINO	9	15
TOTAL	60	100

GRÁFICO A.1 DISTRIBUCIÓN POR SEXO DEL PERSONAL ENCUESTADO DEL SERVICIO DE BIONALISIS HDL JULIO 2009

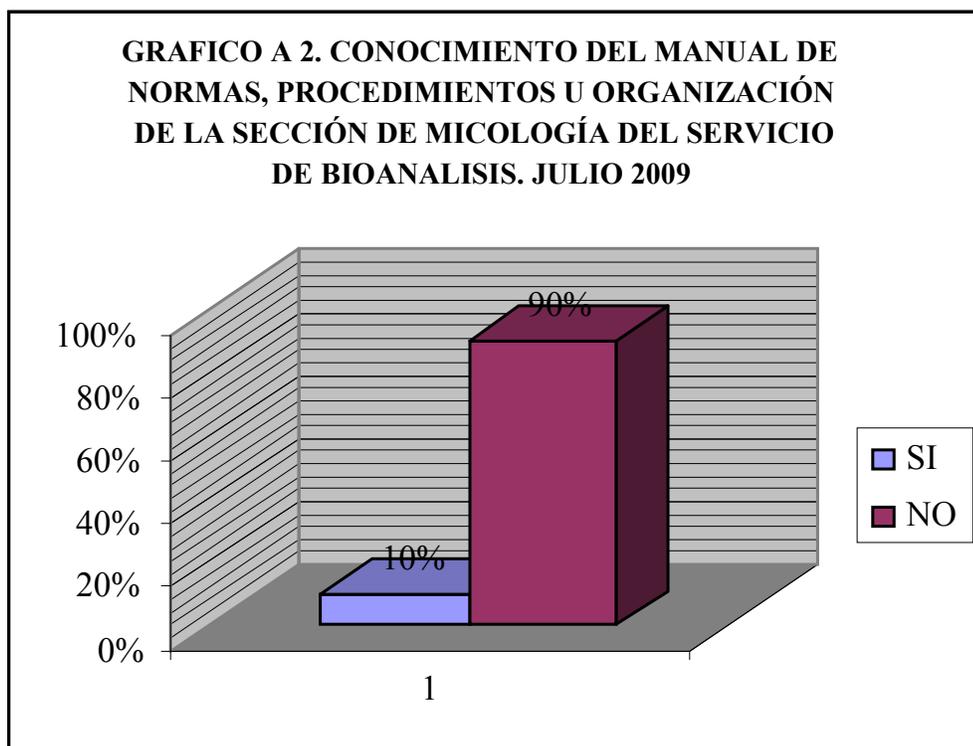


ANÁLISIS: Se observó un predominio del sexo femenino entre el personal encuestado, que se corresponde con la distribución por género del Servicio de Bioanálisis del Hospital

A.2 Conocimiento del personal del Servicio de Bioanálisis del Hospital Dr. Domingo Luciani acerca del Manual de Normas, Procedimientos u Organización de la sección de Micología.

TABLA A. 2 CONOCIMIENTO DEL MANUAL DE NORMAS, PROCEDIMIENTOS U ORGANIZACIÓN DE LA SECCIÓN DE MICOLOGÍA DEL SERVICIO DE BIOANALISIS DEL HOSPITAL DR. DOMINGO LUCIANI. JULIO 2009

	RESULTADO	PORCENTAJE
SI	6	10%
NO	54	90%
TOTAL	60	100%



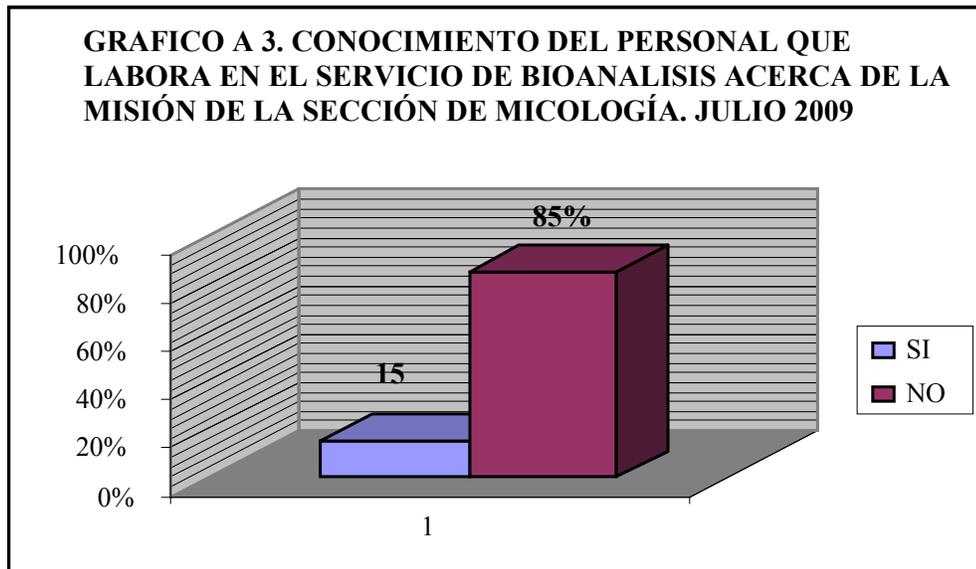
ANÁLISIS: Se observó que un 90% del personal encuestado no conoce el Manual de Normas, Procedimientos ni organización de la sección de Micología del

servicio de Bioanálisis ni ha recibido copia del mismo y solo un 10 % lo conoce y tiene copia del mismo

A.3 Conocimiento del personal del Servicio de Bioanálisis del Hospital Dr. Domingo Luciani acerca de la Misión de la sección de Micología de este servicio.

TABLA A. 3 CONOCIMIENTO DEL PERSONAL DEL SERVICIO DE BIOANALISIS DEL HOSPITAL DR. DOMINGO LUCIANI ACERCA DE LA MISION DE LA SECCIÓN DE MICOLOGÍA. JULIO 2009

	RESULTADO	PORCENTAJE
SI	9	15%
NO	51	85%
TOTAL	60	100%

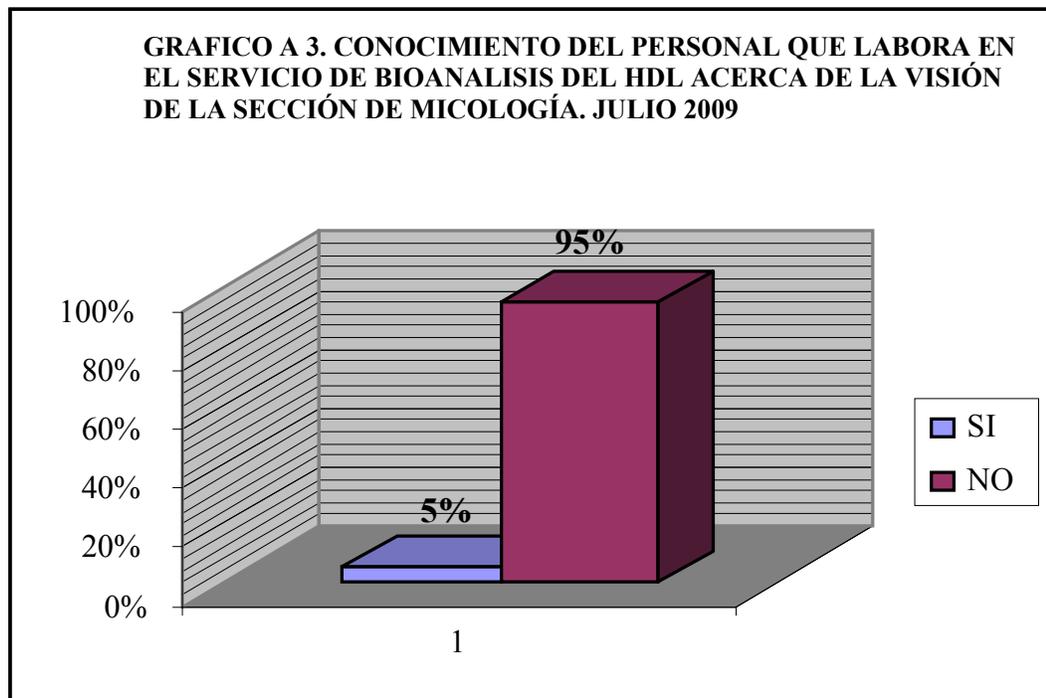


ANÁLISIS: Se observó que un 15% del personal encuestado contestó que si tienen conocimiento de la Misión de la sección de Micología del Servicio de Bioanálisis del Hospital Dr. Domingo Luciani y un 85% contestó que no la conoce, sin embargo del que contestó conocerla realmente un 5% supo enunciarla correctamente y un 10% tienen una somera idea sin tenerla claramente definida.

A.4 Conocimiento del personal del Servicio de Bioanálisis del Hospital Dr. Domingo Luciani acerca de la Visión de la sección de Micología de este servicio.

TABLA A. 4 CONOCIMIENTO DEL PERSONAL DEL SERVICIO DE BIOANALISIS DEL HOSPITAL DR. DOMINGO LUCIANI ACERCA DE LA VISION DE LA SECCIÓN DE MICOLOGÍA DE ESTE SERVICIO.

	RESULTADO	PORCENTAJE
SI	3	5%
NO	57	95%
TOTAL	60	100%



ANÁLISIS: Se observó que un 5% del personal encuestado contestó que si tienen conocimiento de la Visión del Servicio de Bioanálisis del Hospital Dr. Domingo Luciani y un 95% contestó que no la conoce.

CONCLUSIONES Y SUGERENCIAS DE LA ENCUESTA

El personal encuestado en general no conoce el Manual de Normas, Procedimientos u organización de la sección de Micología servicio de Bioanálisis del Hospital Dr. Domingo Luciani ni ha recibido copia del mismo. Algunas personas creen conocer la Misión y Visión del Servicio sin embargo a la hora de enunciarlo resultó bajo el porcentaje que pudo hacerlo correctamente. Esto pudiera ser la principal causa de las dificultades del funcionamiento de este servicio, que por desconocimiento de esta información, las personas que aquí laboran, no participan en el logro de los objetivos que establece la Jefatura del Servicio y mucho menos toman parte en la toma de decisiones de las mismas.

Consideramos que esta información donde se describe la Misión y Visión, las Normas, Procedimientos y organización de la sección de Micología de este servicio de Bioanálisis, debería ser entregado a todo el personal una vez que es admitido a laborar en este Servicio conjuntamente con la inducción o entrenamiento.

Por todo esto sugerimos colocar el enunciado de la Misión y Visión de este servicio en una cartelera, visible y accesible a todo el personal, así como las funciones de cada uno de los que aquí laboran para que al estar al tanto de estos conocimientos no haya dualidad de funciones y con esto se mejoraría el desempeño diario de esta sección y así cada uno de los trabajadores pudiera tener un pensamiento más claro de la forma de colaborar en el buen funcionamiento y mejoramiento continuo de la Calidad de todo el Servicio de Bioanálisis.

ENCUESTA 2

**UNIVERSIDAD CATÓLICA ANDRÉS BELLO
GERENCIA DE SERVICIOS DE SALUD**

ENCUESTA

NECESIDAD DEL SERVICIO DE LABORATORIO DE MICOLOGÍA
(SERVICIO DE BIOANÁLISIS- HOSPITAL DR. "DOMINGO LUCIANI")

LA PRESENTE ENCUESTA ES PARTE DE UN TRABAJO DEL POST-GRADO DE **GERENCIA DE LOS SERVICIOS ASISTENCIALES DE SALUD**. ES UNA ENCUESTA ANÓNIMA Y SOLO TENDRÁ USO ACADEMICO. GRACIAS POR TU TIEMPO.

FECHA:

SEXO: F M

MÉDICO RESIDENTE: PRIMER AÑO
SEGUNDO AÑO
TERCER AÑO
CUARTO AÑO

MÉDICO ADJUNTO:
ESPECIALIDAD: _____

DEBIDO AL AUMENTO DE LAS INFECCIONES FÚNGICAS SEVERAS O POR AGENTES OPORTUNISTAS, EN NUESTRO PAÍS Y EL MUNDO, EL LABORATORIO DE MICOLOGÍA SE HA CONVERTIDO EN UNA HERRAMIENTA ESENCIAL PARA EL MÉDICO, CONTRIBUYENDO A LA PREVECIÓN, DIAGNOSTICO Y TRATAMIENTO DE LAS ENFERMEDADES PRODUCIDAS POR HONGOS. EL LABORATORIO DE MICOLOGÍA DE ESTE HOSPITAL FUNCIONA ACTUALMENTE EN EL HORARIO DE LA TARDE DE 1:00 PM A 7:00 PM.

4. CONSIDERA NECESARIO QUE ESTE LABORATORIO FUNCIONE 12 HORAS AL DIA, INCREMENTANDO SU HORARIO DE FUNCIONAMIENTO 6 HORAS MÁS, EN EL TURNO DE LA MAÑANA DE 7:00 AM A 1:00 PM

SI NO

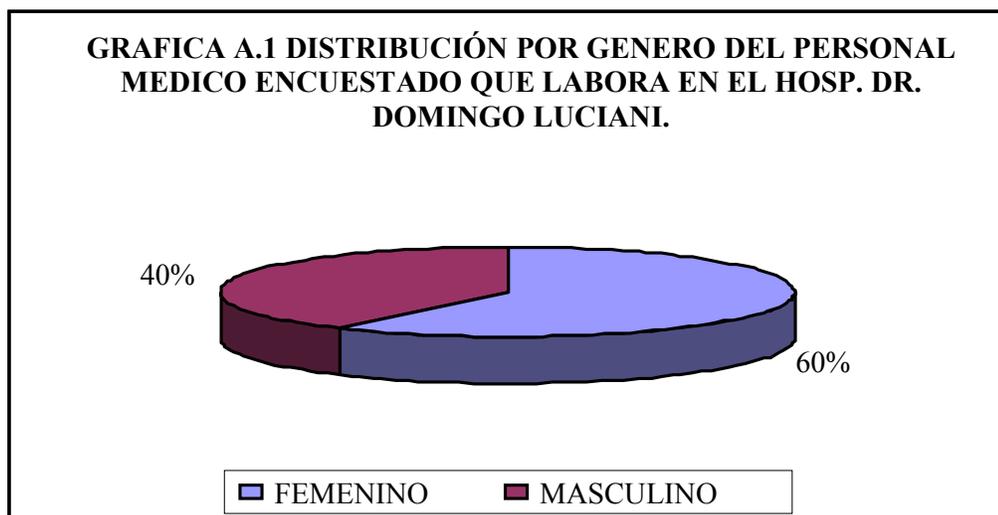
ANÁLISIS

Características demográficas de los encuestados

A.1 Distribución por Género del personal Médico que encuestado, que presta sus servicios en el Hospital Dr. Domingo Luciani.

TABLA A.1 DISTRIBUCION POR GÉNERO DEL PERSONAL ENCUESTADO DEL SERVICIO DE BIOANALISIS DEL HOSPITAL Dr. DOMINGO LUCIANI. JULIO 2009.

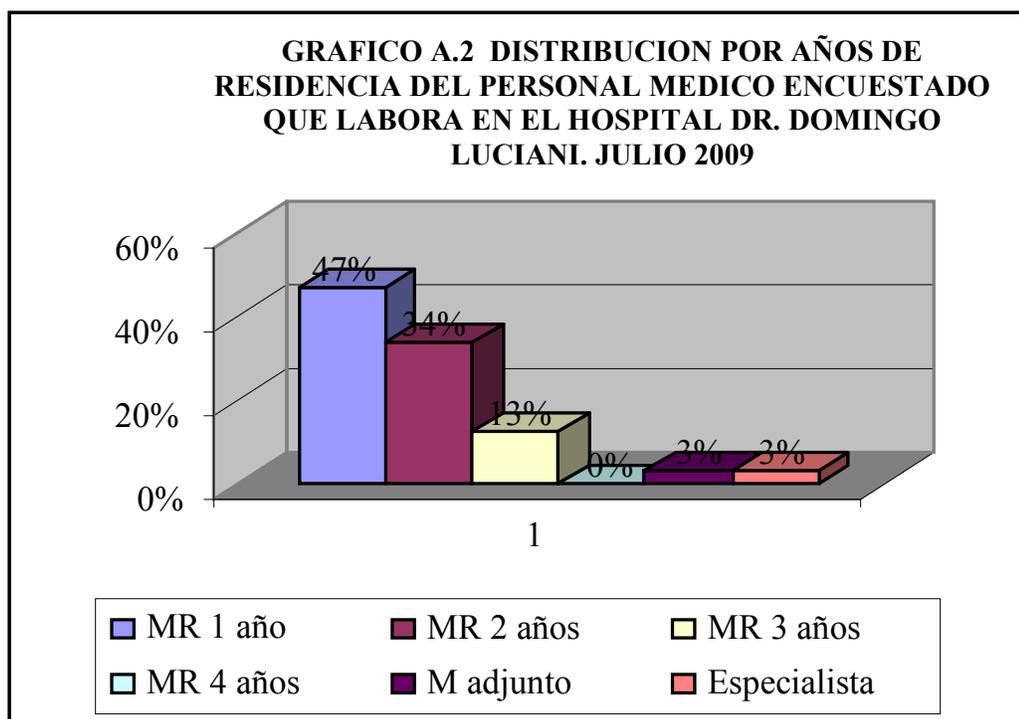
GENERO	NUMERO	PORCENTAJE
FEMENINO	18	60
MASCULINO	12	40
TOTAL	30	100



ANÁLISIS: Se observó un predominio del sexo femenino entre el personal Médico encuestado, que se corresponde con la distribución por género de este personal en el Hospital Dr. Domingo Luciani.

A.2 Distribución por años de residencia en el Hospital Dr. Domingo Luciani del personal Médico encuestado.

AÑOS DE RESIDENCIA	NUMERO	PORCENTAJE
1 AÑO	14	47%
2 AÑO	10	34%
3 AÑO	4	13%
4 AÑO	0	0%
MEDICO ADJUNTO	1	3%
MEDICO ESPECIALISTA	1	3%
TOTAL	30	100%



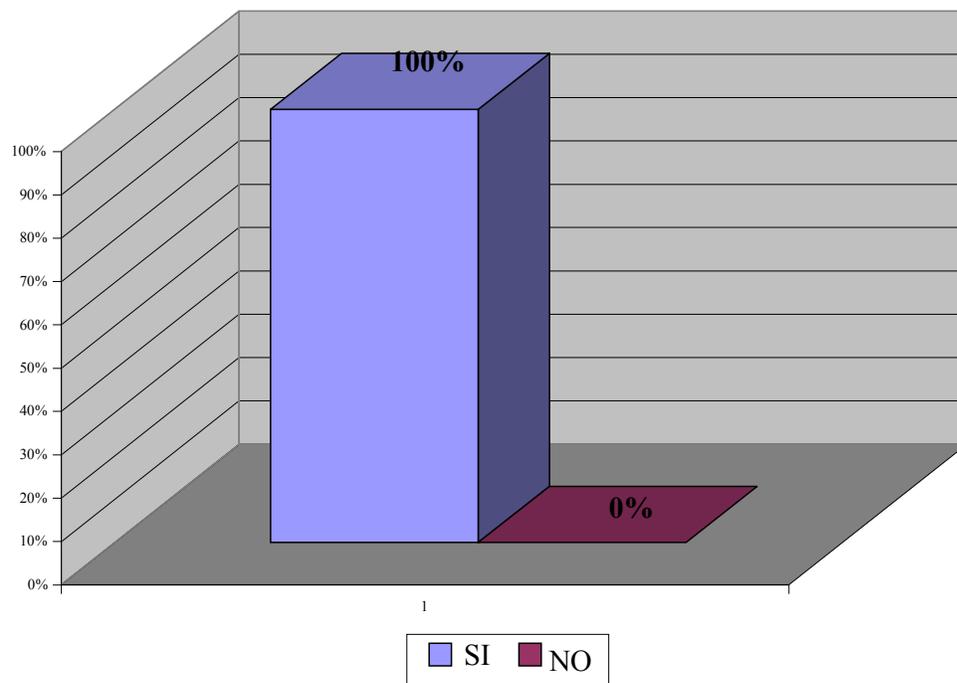
ANALISIS: Se observó que los médicos de primer año son el personal que mas utiliza los servicios que ofrece el laboratorio de Micología del servicio de Bioanálisis del Hospital Dr. Domingo Luciani, seguido de los de segundo y tercer

año respectivamente. Esto corresponde a que forma parte de las funciones de los residentes de los primeros años llevar las muestras biológicas respectivas de cada paciente así como la búsqueda de resultados y seguimiento de la evolución de los mismos.

A.3 Necesidad que la sección de Micología funcione 12 horas al día, incrementando su horario de funcionamiento 6 horas mas, en el turno de la mañana de 7:00 AM A 1:00 PM.

NECESIDAD DE MICOLOGIA EN LA MAÑANA	NUMERO	PORCENTAJE
SI	30	100%
NO	0	0%
TOTAL	30	100%

GRAFICO A.3 NECESIDAD DE FUNCIONAMIENTO DE LA SECCIÓN DE MICOLOGÍA EN EL TURNO DE LA MAÑANA Y DE LA TARDE



ANALISIS: Se observó que el 100% de los médicos encuestados opina que la sección de Micología perteneciente al servicio de Bioanálisis del Hospital Dr. Domingo Luciani, es necesario que funcione 12 horas al día, incrementando su horario de funcionamiento 6 horas mas, en el turno de la mañana de 7: 00 AM a 1:00 PM, ya que el laboratorio de Micología se ha convertido en una herramienta esencial para el médico, contribuyendo a la prevención, diagnostico y tratamiento de las enfermedades producidas por hongo las cuales han venido en aumento en los últimos años.

ANEXO 2. Formatos en los cuales se reportan los resultados

Formato de Cultivo para Hongos



REPUBLICA BOLIVARIANA DE VENEZUELA
MINISTERIO DEL TRABAJO
INSTITUTO VENEZOLANO DE LOS SEGUROS SOCIALES

N° _____

HOSPITAL GENERAL DEL ESTE "DR. DOMINGO LUCIANI"

SERVICIO DE BIOANALISIS
SECCIÓN DE MICOLOGÍA

PACIENTE: _____
SERVICIO: _____
N° HISTORIA: _____
FECHA: _____

INFORME DE MICOLOGÍA

MUESTRA DE : _____

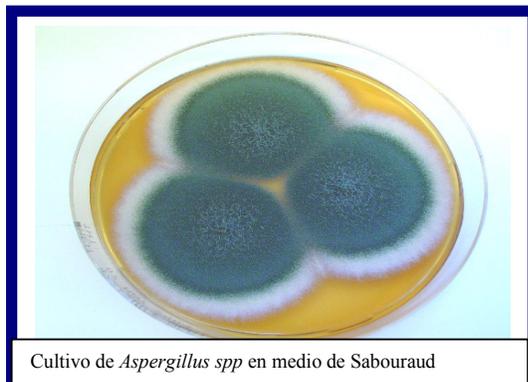
EXAMEN DIRECTO: _____

CULTIVO: _____

OBSERVACION: _____

FECHA DE SALIDA: _____

BIOANALISTA



Formato de Serología para Hongos



REPUBLICA BOLIVARIANA DE VENEZUELA
MINISTERIO DEL TRABAJO
INSTITUTO VENEZOLANO DE LOS SEGUROS SOCIALES

HOSPITAL GENERAL DEL ESTE "DR. DOMINGO LUCIANI"

SERVICIO DE BIOANÁLISIS
SECCIÓN DE MICOLOGÍA

N° _____

PACIENTE: _____

SERVICIO: _____

Nº HISTORIA: _____

FECHA: _____

SEROLOGIA PARA HONGOS (METODO IDD)

ANTICUERPOS:

Histoplasma capsulatum

Paracoccidioides brasiliensis

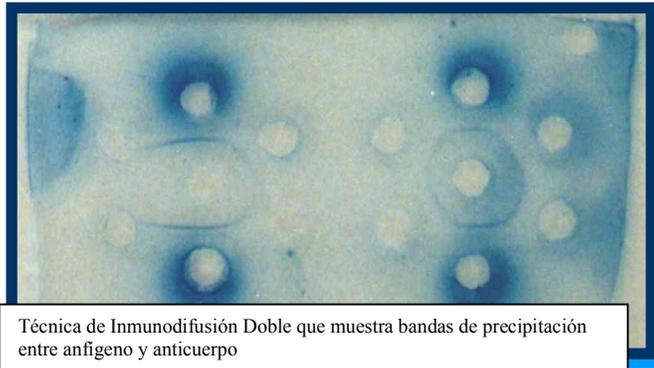
Coccidioides immitis

Aspergillus sp

RESULTADO:

FECHA DE SALIDA: _____

BIOANALISTA



Técnica de Inmunodifusión Doble que muestra bandas de precipitación entre antígeno y anticuerpo

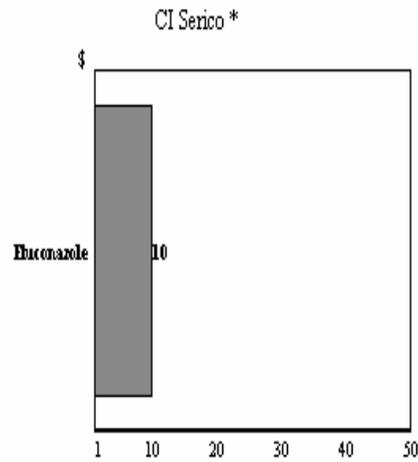
Formato Sensibilidad para hongos

HOSPITAL DR. DOMINGO LUCIANI Avenida Rio de Janeiro, El Llanito, Caracas 1070, Venezuela

Fecha de Toma de Muestra:	Iniciales
Numero de Muestra	# Aislado
Paciente	Numero del Paciente
Lugar	
Tipo de Muestra	
Observaciones	

Microorganismo					
Candida albicans					
Medicamento	MM	Categoria	MIC (mcg/ml)	Costo	CI Serico *
Fluconazole	34	S	1		10
Voriconazole	36	S	0,06		

Actividad Relacionado



* CI, Cociente Inhibitorio = Concentracion Tisular en las mas Baja Dosis Usual/CMI

CLSI/NCCLS interpretation to S, SDD or R for Voriconazole are considered tentative.



Método de Difusión en agar con discos de fluconazol y voriconazol

ANEXO A

TÉCNICA DE LISIS CENTRIFUGACIÓN

- 1) Emplear guantes estériles en todo el procedimiento.
- 2) Desinfectar el tapón de goma del tubo *Isolator 10* con alcohol yodado, sin inundar la cavidad. Dejar secar.
- 3) Abrir el sistema *vacoutainer* y colocar la aguja al portatubos.
- 4) Insertar el tubo *Isolator 10* en el portatubos hasta la línea marcada.
- 5) Localizar el área de venopunción y limpiar con algodón impregnado con alcohol al 70%.
- 6) Repetir la limpieza, pero con algodón impregnado con yodo povidona al 2%. Dejar actuar por un minuto.
- 7) No volver a palpar la vena.
- 8) Realizar la venopunción.
- 9) Empujar el tubo hasta el fondo del portatubos o hasta que la sangre fluya al interior del tubo.
- 10) Cuando se llene el tubo (10 mL) retirarlo del portatubo.
- 11) Invertir el tubo cuidadosamente por 4 ó 5 veces, facilitando la lisis celular y evitar la coagulación de la sangre.
- 12) Retirar la aguja del portatubo y desechar apropiadamente.
- 13) Transportar al laboratorio en forma segura.
- 14) Procesar de inmediato, de lo contrario colocar el tubo a temperatura ambiente.
- 15) Centrifugar empleando rotores de 35° de inclinación a 3000 g por 30 minutos.
- 16) Retirar cuidadosamente los tubos de la centrífuga y colocarlos en un gradilla, evitando la mezcla del sobrenadante y sedimento.
- 17) Desinfectar el tapón de goma con alcohol yodado, sin inundar la cavidad. Dejar secar.
- 18) Colocar la gradilla en la prensa Isostat y cubrir cada tapón con una cápsula estéril Isostat.
- 19) Colocar cada tubo con su cápsula, debajo de la prensa y empujar

rápidamente el asa de la prensa hacia abajo.

20) Colocar el asa en posición original y realizar la maniobra con cada tubo.

21) Retirar la gradilla de la prensa.

22) A partir de aquí, se empleará una cabina de seguridad biológica.

23) Introducir la punta de una pipeta en el tubo a través de la membrana de la cápsula, manteniendo el tubo comprimido.

24) Introducir la pipeta hasta que el bulbo haga contacto con la cápsula.

25) Absorber cuidadosamente el sobrenadante.

26) Distribuir equitativamente el sedimento en placas Petri conteniendo agar Sabouraud dextrosa y con la punta de la pipeta sembrar en zig zag.

27) Desechar la pipeta.

28) Colocar las placas sembradas hacia arriba a 35 °C y a las 24 horas se invierte su posición.

29) Examinar diariamente por siete días.

ANEXO B

PREPARACIÓN DE REACTIVOS

B.1 Hidróxido de potasio

- ❖ Pesar:
 - Hidróxido de potasio 10 g
 - Agua destilada 100 mL
- ❖ Mezclar para disolver totalmente el KOH.
- ❖ Guardar a temperatura ambiente en frasco de color ámbar.
- ❖ Se puede agregar glicerina al 10% para tener preparaciones de mayor duración reduciendo la evaporación.
- ❖ También se puede agregar dimetilsulfóxido (DMSO) al 40% para reducir o eliminar la necesidad de calentar el preparado.

B.2 Tinta china

En una lámina portaobjeto colocar:

- ❖ Tinta china 1 gota
- ❖ Agua destilada o solución fisiológica 1 - 2 gotas
- ❖ Emulsificar la muestra.
- ❖ Colocar laminilla cubreobjeto.

B.3 Azul de lactofenol

- ❖ Es empleado para examinar muestras obtenidas a partir de los cultivos. El fenol mata al hongo, el ácido láctico es un agente aclarante que preserva la estructura del hongo, la glicerina previene la desecación y el azul de algodón colorea la quitina y celulosa del hongo.
- ❖ Solución A:
 - Fenol (cristales) 20 g
 - Acido láctico 20 g
 - Glicerina 40 mL

- ❖ Mezclar.
- ❖ Solución B:
 - Azul de algodón 0,05 g
 - Agua destilada 20 mL
- ❖ Mezclar las soluciones A y B. Conservar a temperatura ambiente hasta por seis meses.

B.4 Coloración giemsa

SOLUCIÓN CONCENTRADA DEL COLORANTE

- ❖ Pesar:
 - Giemsa en polvo 0,6 g
 - Metanol 50,0 ml
 - Glicerina neutra 50,0 ml
- ❖ Pulverizar cristales del colorante antes de pesar.
- ❖ Macerar el polvo en un mortero con 30 mL de glicerina.
- ❖ Transferir la mezcla a un frasco limpio y completar el volumen de glicerina.
- ❖ Colocar al baño María a 55 °C por dos horas.
- ❖ Utilizar 20 ml de alcohol para remover el colorante adherido al mortero.
- ❖ Retirar el frasco del baño María, dejar enfriar y adicionar el alcohol que fue usado para lavar el mortero y el resto del alcohol.
- ❖ Dejar madurar el colorante durante dos semanas y luego filtrar.
- ❖ Guardar el filtrado en frasco ámbar.

SOLUCIÓN TAMPÓN pH 7,2

- Na₂HPO₄ 6,77 g
- KH₂PO₄ 2,59 g
- Agua destilada 1 L

SOLUCIÓN DE TRABAJO

- Solución concentrada del colorante 2 mL
- Solución tampón 6 mL

❖ Mezclar la solución antes de usarla

B.5 Coloración gram

SOLUCIÓN DE CRISTAL VIOLETA

SOLUCIÓN A

- Cristal violeta 4,0 g
- Etanol 20,0 mL

❖ Disolver el colorante en etanol y diluir la solución al 1:10 en agua destilada.

SOLUCIÓN B

- Oxalato de amonio 0,8 g
- Agua destilada 80,0 mL

❖ Disolver el oxalato en el agua destilada. Mezclar una parte de la solución A con cuatro partes de la solución B.

SOLUCIÓN DE YODO (LUGOL)

- Yodo 1 g
- Yoduro de potasio 2 g

❖ Disolver el yodo y el yoduro en 5 mL de agua destilada y completar a un volumen de 240 mL con agua destilada.

CONTRACOLORANTE (COLORANTE DE FONDO)

- Safranina O al 2,5% en alcohol al 95% 10 mL
- Agua destilada 100 mL

❖ Fijar el frotis con calor o metanol.

❖ Agregar el cristal violeta. Dejar un minuto.

- ❖ Lavar con agua.
- ❖ Aplicar lugol. Dejar un minuto.
- ❖ Lavar con agua.
- ❖ Decolorar con etanol al 95% por 30 segundos.
- ❖ Agregar Safranina O. Dejar por 10 segundos.
- ❖ Lavar con agua y dejar secar.
- ❖ Examinar al microscopio empleando los objetivos de 40X y
- ❖ 100X.

B.6 Reducción del nitrato

- MEDIO 5X.
- KNO₃ 5 g
- NaH₂PO₄H₂O 11,7 g
- Na₂HPO₄ 1,14 g
- ❖ Solución de cloruro de benzalconio al 17% 1,2 mL
- ❖ Agua destilada 200 mL
- ❖ Preparación
- ❖ Rehidratar con agua destilada los componentes.
- ❖ Calentar suavemente hasta disolver.
- ❖ Distribuir en un frasco.
- ❖ Autoclavar a 121 °C por 15 minutos.
- ❖ Dejar enfriar antes de su empleo y refrigerar (4 °C a 10 °C) para su conservación.

Reactivos

Reactivo B

- Acido sulfanílico 0,16 g
- Acido acético 5M* 20 mL

Reactivo A

- naftilamina 0,1 g
- Acido acético 5M* 20 mL

*: El ácido acético 5M es preparado adicionando una parte de ácido acético glacial a 25 partes de agua destilada.

B.7 Solución de L – dopa – citrato férrico

Buffer fosfato

A. Fosfato de sodio dibásico.

- Na₂HPO₄ (0,067 M) 0,951 g
- Agua destilada 100 mL

B. Fosfato de potasio monobásico

- KH₂PO₄ (0,067 M) 0,912 g
- Agua destilada 100 mL

- ❖ Se mezclan volúmenes iguales de A y B (pH final 6,8)

Solución de L – dopa (L – B – 3,4 - dihidroxifenilalanina)

- ❖ Suspender la L – dopa en una a tres gotas de dimetilsulfóxido
- ❖ Agregar agua destilada hasta alcanzar una concentración final de 3 mg/mL

Solución de citrato férrico.

- ❖ Disolver el citrato férrico en agua destilada hasta alcanzar una concentración de 1 mg/mL. Calentar suavemente hasta disolver.

Solución de L – dopa - citrato férrico.

- ❖ Solución de L – dopa 1 mL
- ❖ Solución de citrato férrico 0,5 mL
- ❖ Buffer fosfato 3,5 mL
- ❖ Esta solución debe tener un color azul claro.

ANEXO C

PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO

C.1 AUXONOGRAMA DEL CARBONO EN PLACA (ASIMILACIÓN DE CARBOHIDRATOS)

Medio base: se usa como soporte de los discos de azúcares y para observar el crecimiento de las levaduras para su posterior identificación.

Pesar:

- Extracto de levadura 0,67 g
- Agar noble 20 g
- Agua destilada 1000 mL
- ❖ Disolver los ingredientes en agua destilada.
- ❖ Poner en ebullición por un minuto.
- ❖ Autoclavar a 121 °C por 15 minutos.
- ❖ Conservar en refrigeración a 4 °C.

Discos de azúcares para el auxonograma del carbono

- Discos de papel filtro estéril de 5 mm de diámetro.
- Carbohidratos (glucosa, lactosa, sacarosa, maltosa, galactosa y rafinosa); 20 g de cada uno.
- Agua destilada 100 mL por carbohidratos.
- ❖ Disolver cada tipo de azúcar en 100 mL de agua.
- ❖ Esterilizar por filtración.
- ❖ Sumergir en las distintas soluciones de azúcares durante 24 horas.
- ❖ Colocar los discos de papel en una placa Petri y colocar en estufa a 37 °C por 24 horas.
- ❖ Guardar los discos en un frasco estéril de boca ancha.

C.1.1 Preparación de las soluciones a base de carbohidratos para impregnar discos de papel para la asimilación de carbonos

- ❖ Preparar soluciones al 20% de cada carbohidrato a ensayar en agua destilada, esterilizar por filtración y conservar en refrigeración.

- ❖ Se coloca una capa de discos estériles de 0,25 pulgadas (6 mm de diámetro) en placas de Petri y con una jeringa se coloca una gota de la solución de carbohidrato a cada disco, éstos se dejan secar entre 48 a 72 horas a temperatura ambiente. Los discos impregnados con inositol, rafinosa y maltosa requieren una segunda saturación.

C.1.2 Medio auxanográfico para asimilación de nitrógeno (Delf)

- Yeast Carbon base 12 gr
- Agar noble o lavado 20 gr
- Agua destilada 1000 ml
- ❖ Dispensar 20 ml en tubo tapa de rosca, esterilizar en autoclave a 121 °C, 15 lb por 15 minutos.

C.1.3 Medio para la prueba de Fermentación de carbohidratos sin indicador

- Peptona 2,5 gr
- Extracto de levadura 2,5 gr
- Agua destilada 100 ml
- ❖ Disolver los componentes en agua destilada
- ❖ Distribuir alícuotas de 5 ml en tubos de 12 x 120 mm, que contengan el tubo de Durham invertido.
- ❖ Autoclavar a 121 °C, 15 lb por 15 minutos.
- ❖ Agregar al medio basal 1 ml de la solución de azúcar al 20%, previamente esterilizada por filtración.
- ❖ Guardar en refrigeración.

C.2 AGAR ACEITE DE OLIVA

Pesar:

- Agar Sabouraud dextrosa 6,5 g
- Tween 80 2 mL

- Aceite de oliva 2 mL
- Vitamina A 10 gotas
- Cloramfenicol 0,5 g
- Agua destilada 100 mL
- ❖ Disolver el agar Sabouraud dextrosa en agua destilada.
- ❖ Agregar los demás ingredientes.
- ❖ Esterilizar a 121 °C por 15 minutos.
- ❖ Almacenar a 4 °C.

C.3 AGAR DE DIXON MODIFICADO

Pesar:

- Extracto de Malta 36 g
- Peptona 6 g
- Agar 12 g
- Buey de bilis desecada 20 g
- *Tween* 40 10 mL
- Monooleato de glicerol 2 mL
- Acido oleico 2 mL
- Agua destilada 1000 mL
- ❖ Disolver los ingredientes por 15 minutos en un poco de agua.
- ❖ Agregar el volumen restante y ebulir.
- ❖ Autoclavar a 121 °C por 15 minutos.
- ❖ Repartir en tubos de vidrio estériles en posición de plano inclinado.

C.5 CALDO SABOURAUD

- ❖ Seguir las indicaciones proporcionadas por el fabricante.
- ❖ Autoclavar a 121 °C por 15 minutos.
- ❖ Dispensar alicuota de 7,5 mL en tubo de vidrio estéril con tapa rosca.

- ❖ Almacenar a 4 °C.

C.6 AGAR ARROZ

Pesar:

- Arroz 200 g
- Agar 15 g
- Agua destilada 1000 mL
- ❖ Hervir el arroz durante 30 minutos.
- ❖ Filtrar con gasa.
- ❖ Completar al volumen final.
- ❖ Agregar el agar.
- ❖ Autoclavar a 121 °C por 15 minutos.
- ❖ Repartir en placa Petri estéril.
- ❖ Conservar en refrigeración a 4 °C.

C.7 AGAR HARINA DE MAÍZ

- ❖ Se utiliza para la producción de pseudohifas de levaduras del género *Candida* y producción de clamidoconidios de *C. albicans*.

Composición:

- Harina de maíz 62,5 g
- Agua destilada 1500 mL
- Tween 80 15 g
- Agar 19 ml

Procedimiento:

- ❖ Disolver la harina de maíz en el agua destilada.
- ❖ Dejar reposar a temperatura ambiente durante 15 minutos.
- ❖ Filtrar a través de papel filtro y reconstituir el anterior volumen.
- ❖ Añadir el agar.

- ❖ Añadir el *tween* 80,
- ❖ Esterilizar a 120 °C durante 20 minutos.

C. 7.1 MEDIO COMERCIAL. Corn Meal Agar (CMA)

Corn meal agar 17 gr

Dextrosa 2 gr

Sucrosa 3 gr

Extracto de levadura 1 gr

Agua destilada 1000 ml

Disolver en agua destilada caliente todos los componentes y esterilizar en autoclave a 121 °C, 15 lb por 15 minutos. Dispensar en placas o tubos.

C.7 AGAR PAPA DEXTROSA

- ❖ Permite la observación de las levaduras a diferentes temperaturas.

Pesar:

- Papa 200 g
 - Dextrosa 10 g
 - Agar 20 g
 - Agua destilada 1000 mL
- ❖ Pelar y cortar la papa en trozos pequeños. Disolver la dextrosa en agua y agregar los demás ingredientes. Hervir 30 minutos y filtrar con gasa. Completar el volumen. Esterilizar a 121 °C por 15 minutos.
 - ❖ Repartir.

C.8 AGAR MICOSEL O MICOBIÓTICO

- ❖ Permite distinguir la susceptibilidad a la cicloheximida o actidione.

- ❖ Seguir las indicaciones proporcionadas por el fabricante.
- ❖ Autoclavar a 121 °C por 15 minutos.
- ❖ Dispensar en tubo de vidrio estéril y colocar en forma de plano inclinado.
- ❖ Almacenar a 4 °C.

C.9 AGAR CZAPEK – DOX

- ❖ Se emplea para la identificación de *Aspergillus spp* y *Penicillium spp*.

Pesar:

- Sacarosa 30 g
- Nitrato de Sodio 2 g
- Fosfato dipotásico 1 g
- Sulfato de magnesio 0.5 g
- Cloruro de potasio 0.5 g
- Sulfato ferroso 10 mg
- Agar 15 g
- Agua destilada 1000 mL
- ❖ Disolver por calor todos los ingredientes.
- ❖ Colocar en ebullición por diez minutos.
- ❖ Esterilizar a 121 °C por 15 minutos.
- ❖ Envasar.

C.10 AGAR SEMILLA DE GIRASOL (AGAR DE STAIB O AGAR NIGER SEED)

- ❖ El medio de cultivo contiene ácido cafeico contenido en el extracto de la semilla de girasol (*Guizzotia abbinica*) que permite detectar la enzima fenol oxidasa desarrollada por *Cryptococcus neoformans*. La reacción enzimática produce melanina, la cual es

absorbida por la pared celular del hongo produciendo un color marrón.

Pesar:

- Glucosa 1,0 g
- Creatina 0,78 g
- Agar 18,0 g
- Cloramfenicol 0,05 g
- Extracto de semilla de girasol 350 mL

- ❖ Calentar hasta disolver. Distribuir 50 – 100 mL por frasco.
- ❖ Autoclavar a 121 °C por 15 minutos.

La preparación del extracto consiste en:

- ❖ Pulverizar las semillas de girasol.
- ❖ Pesar 70 g del pulverizado y suspenderlo en 350 mL de agua destilada. Hervir. Filtrar con gasa. Autoclavar 15 minutos a 121 °C. Mantener en refrigeración con cierre hermético.
- ❖ En el momento de usar, fundir el medio y plaqurear. Emplear un control positivo de *Cryptococcus neoformans*, el cual desarrollará una pigmentación marrón y un control negativo de *Candida spp.* que desarrollará de color blanco.

C.11 AGAR SABOURAUD DEXTROSA

- ❖ Se le emplea para el aislamiento primario, identificación y mantenimiento de la mayoría de los hongos patógenos. Para mejorar la inhibición bacteriana se puede adicionar cloramfenicol 0,5 g/L.

Pesar:

- Peptona 10 g
- Glucosa 20 g
- Agar 20 g
- Agua destilada 1000 mL

- ❖ Disolver los ingredientes en el agua destilada.

- ❖ Controlar el pH a 5,6.
- ❖ Esterilizar a 121 °C por 15 minutos.
- ❖ Verter en tubos o placas.

C.12 MEDIO BASE PARA AZÚCARES

- ❖ Se emplea para proporcionar los requerimientos nutricionales para el desarrollo de levaduras.

MEDIO BASE

Pesar:

- Peptona 5 g
- Extracto de carne 1 g
- Cloruro de sodio 5 g
- Agar 15 g
- Agua destilada 990 mL
- Púrpura de bromocresol 10 mL

- ❖ Disolver y autoclavar.
- ❖ El pH final es de 5,6.

INDICADOR

Pesar:

- Púrpura de bromocresol 0,1 g
- Hidróxido de sodio 0,01 N 18,5 mL

- ❖ Diluir a 250 mL con agua destilada obteniendo una concentración al 0,04%.

AZÚCARES

- ❖ Pesar 10 g de cada uno de los siguientes azúcares: glucosa, lactosa, sacarosa, galactosa, maltosa y rafinosa. Disolver en agua destilada estéril y esterilizar por filtración (diámetro del filtro 0,2 μ m)
- ❖ Concentración final de cada azúcar: 10%.

- ❖ Mezclar cada azúcar con el medio base que se encuentra a 45–50 °C. Repartir en tubos de vidrio con tapa rosca. Controlar a 37 °C por 24 horas.

C.13 AGAR INFUSIÓN CEREBRO CORAZÓN

Este medio de cultivo favorece la conversión de algunos hongos dimórficos. Para la preparación seguir las recomendaciones proporcionadas por el fabricante.

C.14 AGAR UREA

- ❖ Permite evidenciar la producción de ureasa por *Cryptococcus neoformans*, algunas especies de *Candida sp.* *Rodotorula sp.* Y *Trichosporon sp.*

Pesar:

- Dextrosa 1 g
 - Peptona 1 g
 - Cloruro de sodio 5 g
 - Monofosfato de potasio 2 g
 - Urea 20 g
 - Agar 15 g
 - Rojo fenol 12 mg
 - Agua destilada 1000 mL
- ❖ Disolver la urea en 100 mL de agua destilada y esterilizar por filtración.
 - ❖ Disolver los ingredientes restantes en 900 mL de agua destilada.
 - ❖ Esterilizar a 121 °C por 15 minutos.
 - ❖ Enfriar hasta unos 45– 50 °C.
 - ❖ Agregar la solución de urea en un área estéril.

C. 15 AGAR MALTA

- Extracto de Malta 30 ml
 - Agar 15 gr
 - Agua destilada 1000 ml
- ❖ Disolver en baño de María, ajustar pH a 5.5, esterilizar en autoclave a 121 °C, 15 lb por 15 minutos y distribuir en tubos y/o placas.

C. 16 CALDO MALTA

- Extracto de Malta 15 ml
 - Agua destilada 1000 ml
- ❖ Ajustar el pH a 4.0. Distribuir 5 ml del medio por tubo, esterilizar en autoclave a 121 °C, 15 lb por 15 minutos.

C.17 MEDIO DE BILIS AGAR (Feo)

- Bilis en polvo (Bacto Oxgall) 20 gr
 - Agar 1 gr
 - Cloranfenicol 0,25 gr
 - Agua destilada 1000 ml
- ❖ Mezclar los componentes y calentar en baño de María por 15 minutos, distribuir 2 ml del medio en tubos 13 x 100 y esterilizar en autoclave a 121 °C, 15 lb por 15 minutos, pH final 7,0

C. 18 MEDIO DE GORODKOWA AGAR

- Glucosa 0,1 gr
 - Peptona 1 gr
 - Cloruro de sodio (NaCl) 0,5 gr
 - Agar 2 gr
 - Agua de chorro 100 ml 40
- ❖ Ajustar el pH a 7,0, distribuir en tubos a razón de 5 ml en cada uno, esterilizar en autoclave a 121 °C, 15 lb por 15 minutos y luego inclinar.

C. 19 COLORACIÓN DE ASCAS – KUFFERATH MODIFICADO

- Colorante de Ziehl Neelsen
- Alcohol clohídrico: ácido clohídrico concentrado al 1% en alcohol de 95%
- Azul de metileno al 1%

Técnica

- ❖ Hacer un extendido en una lámina con la suspensión de la levadura, dejar secar y fijar al calor.
- ❖ Cubrir la preparación con el colorante de Ziehl Neelsen y calentar hasta la emisión de vapores, mantener caliente durante 5 minutos. Lavar con agua corriente.
- ❖ Decolorar con el alcohol clohídrico y lavar con agua.
- ❖ Colorear con azul de metileno al 1%, durante 1 minuto, lavar con agua y dejar secar.
- ❖ Los ascosporos se colorean de rojo y las células vegetativas de azul.
- ❖ (Los ascosporos de *Schizosaccharomyces* no son ácido resistentes)

C.20 COLORACIÓN DE WIRTZ

- Solución de Bicromato de potasio al 1%
- Solución de Verde de Malaquita al 5%
- Solución alcohólica de Safranina, según Fleming:
- Alcohol etílico absoluto 50 ml
- Agua destilada 21 ml
- Safranina 0,5 gr

Técnica

- ❖ Fijar el frotis y cubrir con solución de bicromato de potasio al 1% por 15 segundos.

- ❖ Lavar la preparación y cubrir la lámina con la solución acuosa de verde de Malaquita al 5%, calentar hasta la emisión de vapores por 5 minutos.
- ❖ Lavar
- ❖ Contracolorar con solución alcohólica de safranina por 30 segundos. Lavar y secar.
- ❖ Los ascosporos se colorean de verde, ascas de rosado claro y las células vegetativas de rojo

C.21 MEDIOS DE CULTIVOS PARA LAS PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD DE DIFUSIÓN CON DISCOS

C.21.1 MEDIO DE MUELLER HINTON AGAR

Para 1 litro de Mueller hinton seguir las instrucciones del fabricante y agregar 20 gramos de glucosa y 100 µl de la solución stock de azul de metileno. Autoclavar por 15 minutos a 1 atmósfera. Dejar enfriar a 50°C y dispensar 25 ml por placa de petri.

C.21.2 SOLUCIÓN STOCK DE AZUL DE METILENO

Preparar la solución stock, agregar 0,1 g de azul de metileno en 20 ml de agua destilada (5mg/ml) concentración final en el medio de cultivo será de 5µg/ml.

C.21.3 MEDIO DE RPMI1640 AGAR

- ❖ Los componentes se preparan en dos soluciones separadas: RPMI x2 y agar x2.

Solución 1: RPMI 2%G x2

- RPMI 1640 10,4 g
- MOPS 34,5 g
- Glucosa 19 g
- Agua destilada estéril CSP 500 ml

- ❖ Disolver en frío. Ajustar pH a 7 con NaOH 10 M. Llevar a 500 ml con agua destilada en probeta y comprobar el pH 7. Esterilizar por filtración.
- ❖ Calentar y mantener a 65 °C.

Solución 2: Agar x2 (30g/l)

- Bacto agar 15 g
- Agua destilada 500 ml
- ❖ Calentar y agitar hasta disolver completamente el agar. Autoclavar por 15 minutos a 121 °C. Enfriar y mantener a 65 °C.
- ❖ Una vez mantenidas ambas soluciones a 65 °C, se mezclan evitando la formación de burbujas en la siguiente proporción: 500 ml de la solución 1 y 500 ml de la solución 2.
- ❖ Dispensar 20 ml en placa de Petri de 90 mm. Las placas con el medio solidificado se guardan sin secar a 4 °C. Antes de su utilización se secan destapadas, durante 20 minutos a 37 °C.

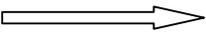
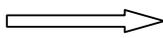
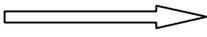
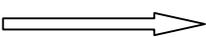
C.22 MEDIOS DE CULTIVO COMERCIALES

Con respecto a los medios de cultivos comerciales disponibles como agar Mycosel® o Dermasel®, Chromagar *Candida* por Oxoid® o Becton Dickinson®, es importante seguir las instrucciones del fabricante para garantizar la calidad del producto.

ANEXO D

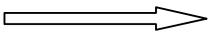
CLAVE N.º 1

CLAVE PARA IDENTIFICAR *Trichosporon spp.*

- 1 a. Crecimiento con melibiosa  2
- 1 b. No crecen con melibiosa  3
- 2 a. Tolerante a cycloheximida..... *T. mucoides*.
- 2 b. No toleran la cycloheximida..... *T. cutaneum*.
- 3 a. Crecen con myo-inositol, no crecen con L-arabinosa..... *T. inkin*.
- 3 b. Crecen con myo-inositol, crecen con L-arabinosa  4
- 4 a. Colonias con escaso desarrollo, talo consistente de clampas de células meristemáticas.....
..... *Fisussuricella filamenta*, *T. asteroides*.
- 4 b. Colonias y microscopía  5.
- 5 a. Apresorio presente en microcultivo..... *T. ovoide*.
- 5 b. Apresorio ausente en microcultivo  6.
- 6 a. Artroconidia en forma de barril; talos no meristemáticos.....
..... *T. asahii*.
- 6 b. Artroconidias elongadas, o talos mersitemáticos.....
..... *T. asteroides*.

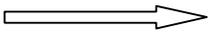
CLAVE N.º 2

CLAVE MORFOLÓGICA PARA ALGUNOS *Geotrichum spp.*

- 1 a. Colonias que crecen rápidamente; hifas marginales de 12 um de ancho, a menudo con ramificación dicotómica..... *G. candidum*.
- 1 b. Colonias de moderado crecimiento; hifas marginales de 4 um de ancho; sin ramificación dicotómica  2.
- 2 a. Conidias simpodiales que se producen abundantemente desde cicatrices *G. capitatum*.
- 1 b. Conidias sympodiales ausentes.....*G. clavatum*.

CLAVE N.º 3

CLAVE FISIOLÓGICA PARA ALGUNOS *Geotrichum spp.*

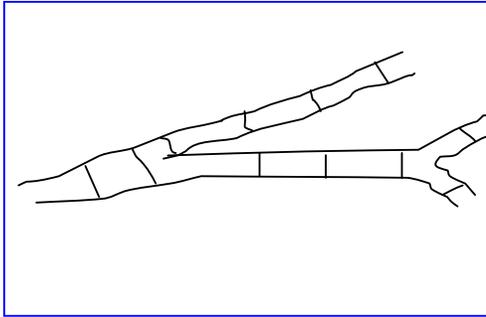
- 1 a. Asimilan D – Xylosa.....*G. candidum*.
- 1 b. No asimilan D - Xylosa  2.
- 2 a. Asimilan celobiosa, salicina y arbutina.....*G. clavatum*.
- 2 b. No asimilan celobiosa, salicina y arbutina.....*G. capitatum*.

ANEXO F

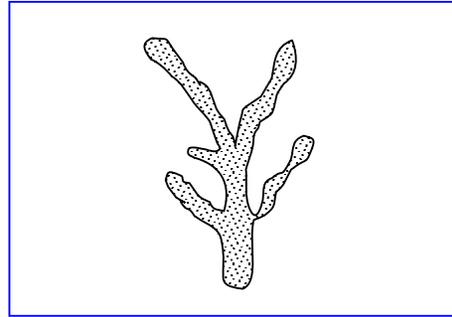
IMÁGENES Y FOTOGRAFÍAS PARA ORIENTACIÓN DIAGNÓSTICA

(Cortesía Lic. Maribel Dolande, Lic María Mercedes Panizo, Lic. Heidi Reyes, Atlas virtual de Micología Médica. Universidad de Panamá)

HIFAS



HIFAS TABICADAS

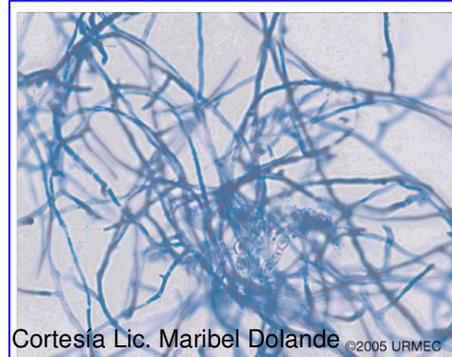


HIFAS SIFONADAS



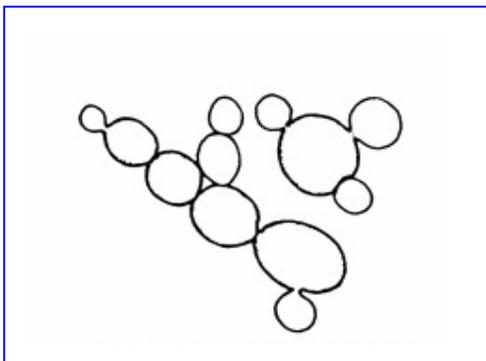
*Cortesía Lic. Maribel Dolande

HIFAS SIFONADAS

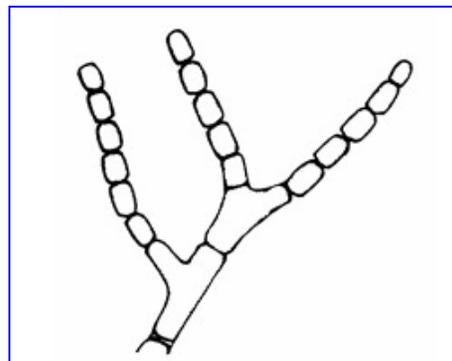


Cortesía Lic. Maribel Dolande ©2005 URMEC

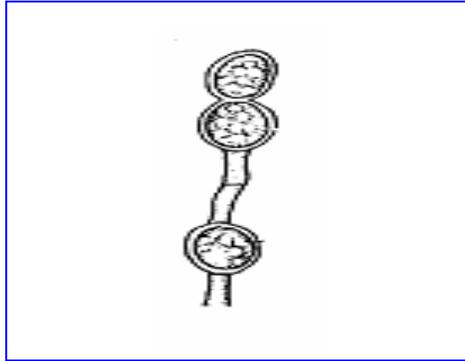
MICELIO: CONJUNTO DE HIFAS



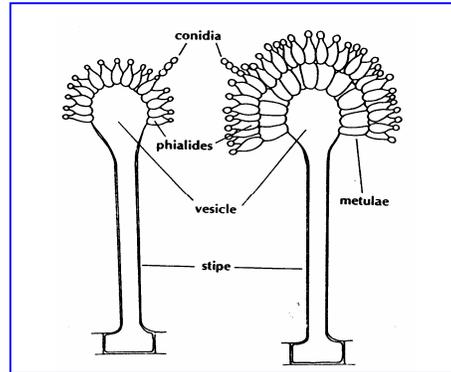
BLASTOCONIDIAS



ARTROCONIDIAS



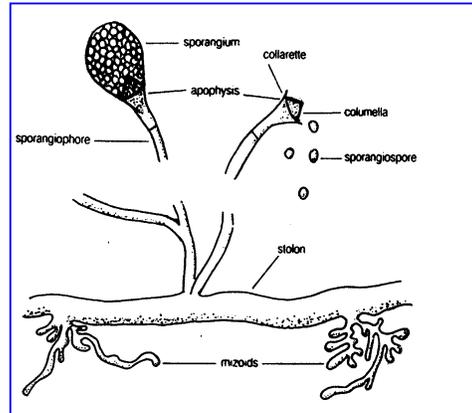
CLAMIDOCONIDIAS



VESICULA, METULA, FIALIDE



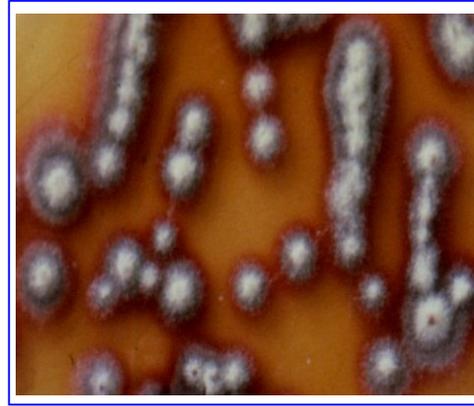
CAPSULA (*Cryptococcus neoformans*)



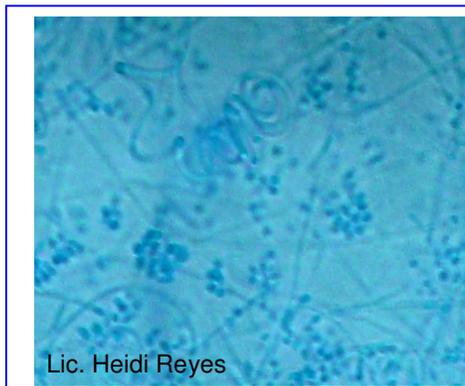
APOFISIS, ESPORANGIO,
RIZOIDES, COLUMNELA

AGENTES CAUSANTES DE MICOSIS SUPERFICIALES

Trichophyton rubrum



Trichophyton mentagrophytes



Lic. Heidi Reyes



Lic. Heidi Reyes

Microsporum canis

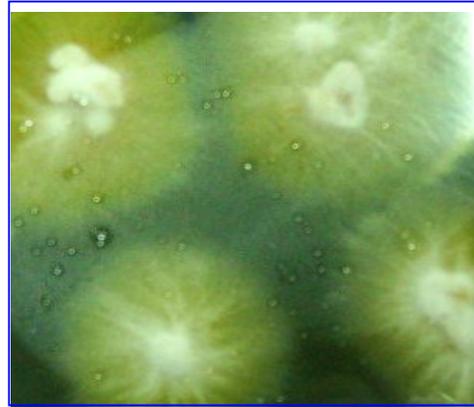
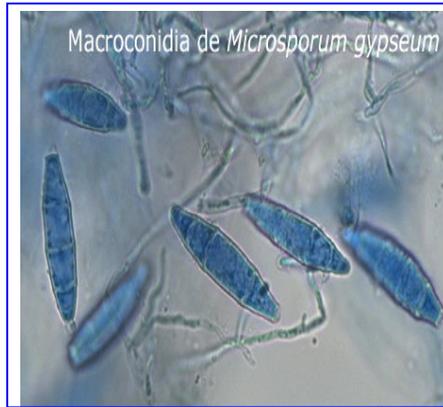


Lic. Heidi Reyes

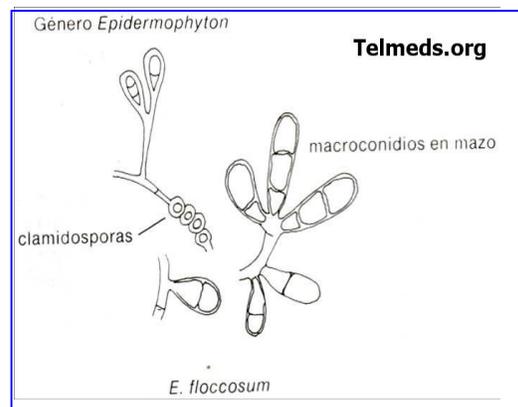
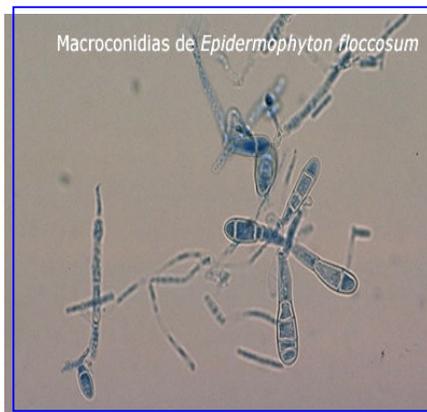


Lic. Heidi Reyes

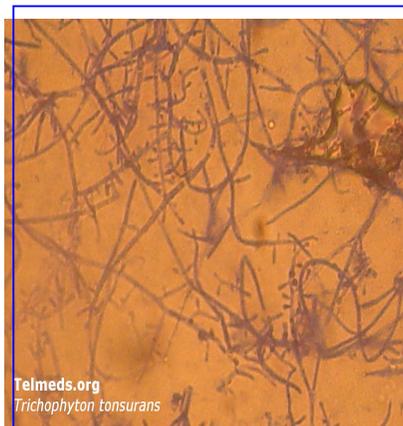
Microsporium gypseum

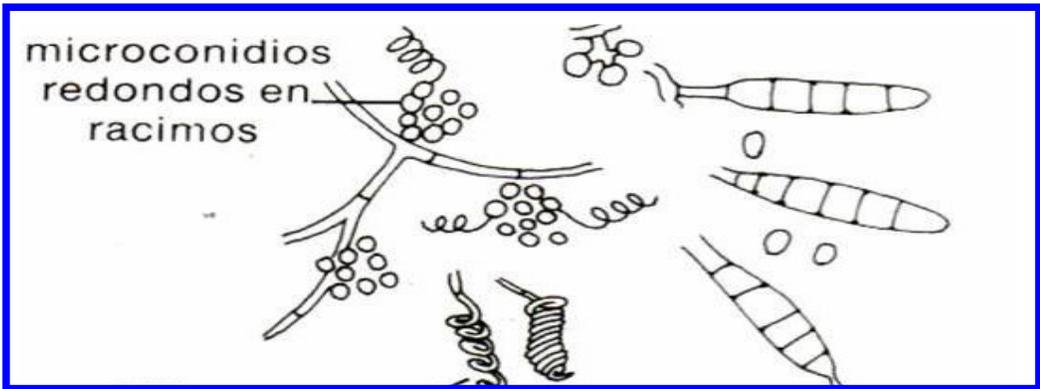
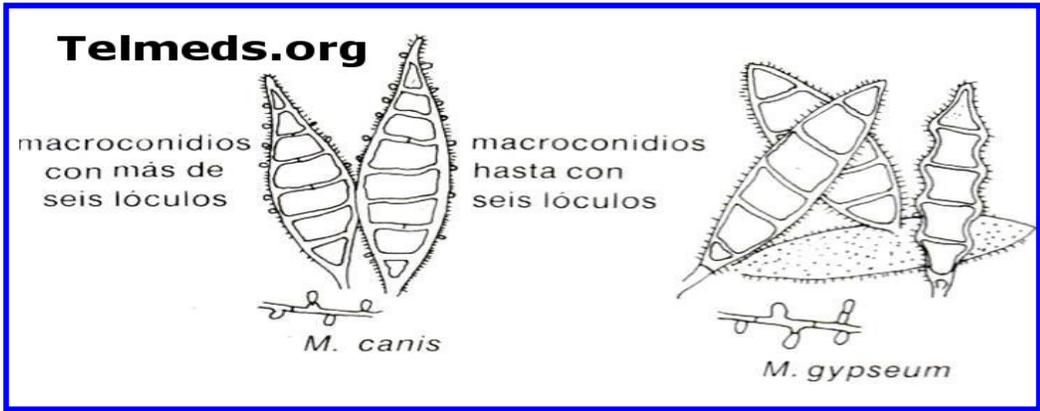
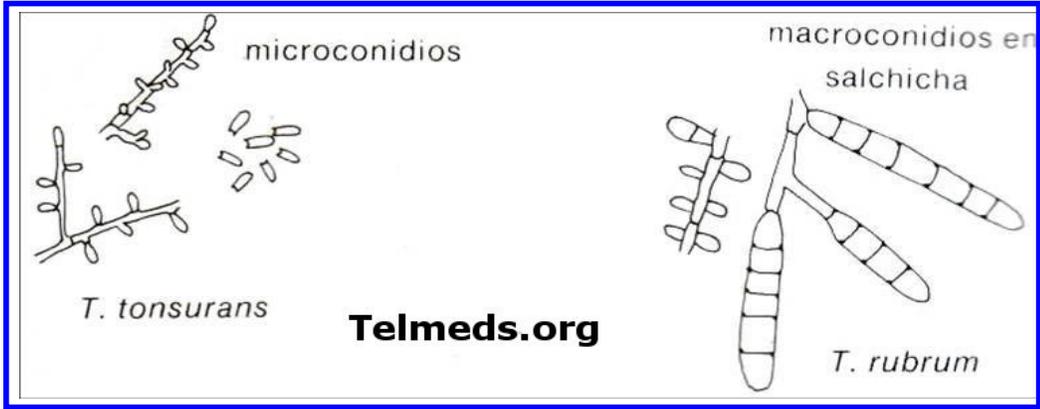


Epidermophyton floccosum



Trichophyton tonsurans



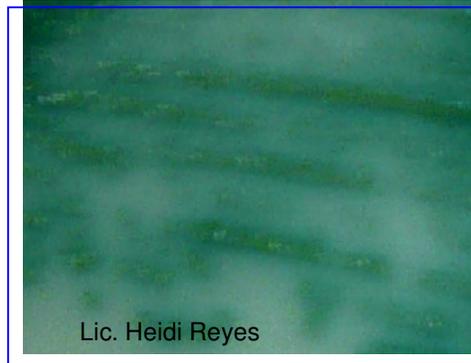
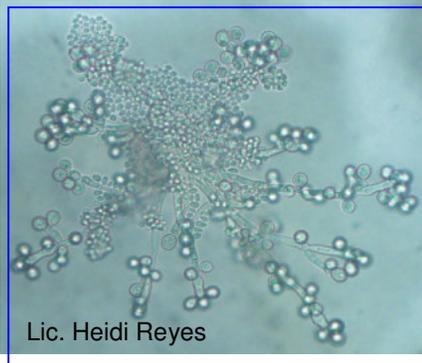


CANDIDA

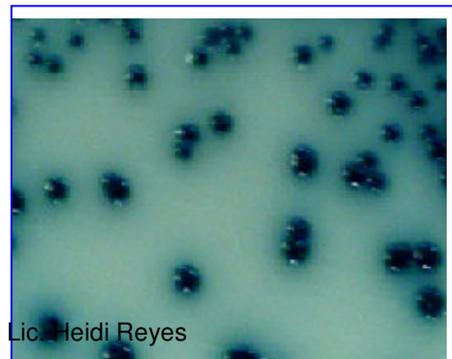
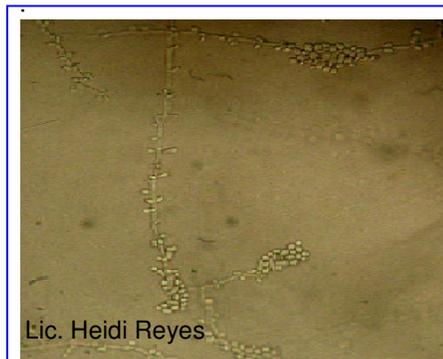
Morfología microscopica en agar
harina de maiz, CMA (Difco). (400X)

Pigmento producido en medio
cromogénico Chrom agar

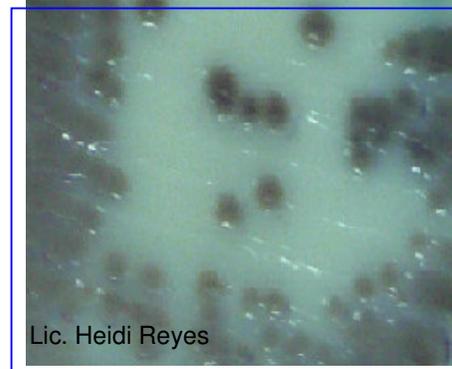
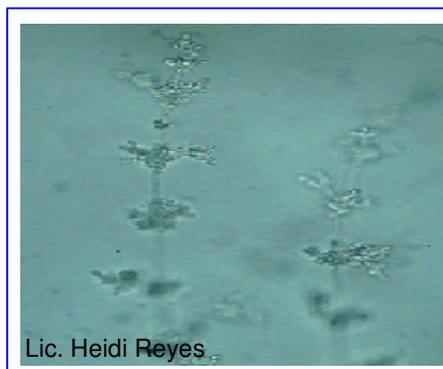
Candida albicans.



Candida tropicalis



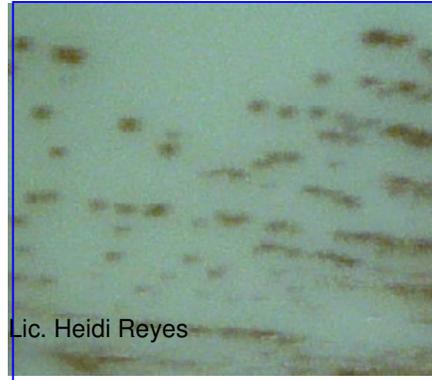
Candida krusei



Candida glabrata



Lic. Heidi Reyes



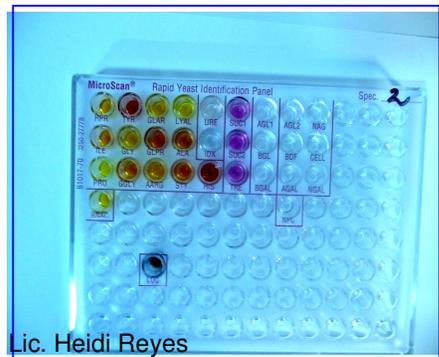
Lic. Heidi Reyes

Panel Rapid Yeast Identificación. MicroScan RYID. *C. tropicalis*



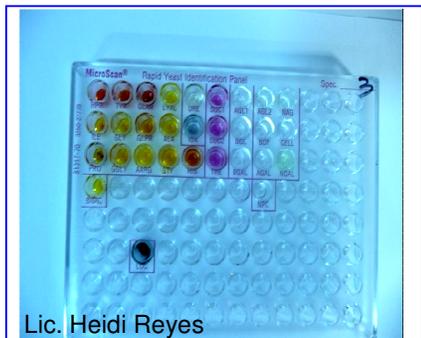
Lic. Heidi Reyes

Panel Rapid Yeast Identificación. MicroScan RYID. *C. krusei*



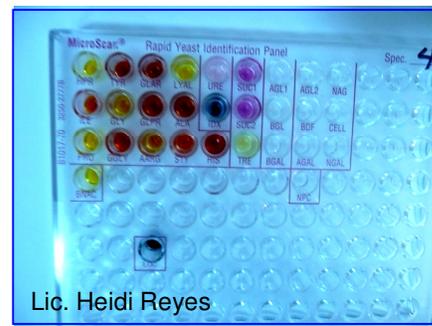
Lic. Heidi Reyes

Panel Rapid Yeast Identificación. MicroScan RYID. *C. albicans*



Lic. Heidi Reyes

Panel Rapid Yeast Identificación. MicroScan RYID. *C. glabrata*



Lic. Heidi Reyes

Panel Rapid Yeast Identificación.
MicroScan RYID. *C. tropicalis*

SIEMENS
MicroScan®
Rapid Yeast ID Panel Worksheet

Issue No.
Date
Tech

C. tropicalis

4	HPR	TYR	GLAR	LYAL	URE	SUC1	AGL1	AGL2	NAG	
+										
2	ILE	GLY	GLPR	ALA	IDX	SUC2	BGL	BDF	CELL	
+										
1	PRO	GGLY	AARG	STY	HIS	TRE	BGAL	AGAL	NGAL	

256032691

Panel Rapid Yeast Identificación.
MicroScan RYID. *C. krusei*

SIEMENS
MicroScan®
Rapid Yeast ID Panel Worksheet

Issue No.
Date
Tech

C. Krusei

4	HPR	TYR	GLAR	LYAL	URE	SUC1	AGL1	AGL2	NAG	4
+										+
2	ILE	GLY	GLPR	ALA	IDX	SUC2	BGL	BDF	CELL	2
+										+
1	PRO	GGLY	AARG	STY	HIS	TRE	BGAL	AGAL	NGAL	1

242310000

Panel Rapid Yeast Identificación.
MicroScan RYID. *C. albicans*

SIEMENS
MicroScan®
Rapid Yeast ID Panel Worksheet

Issue No.
Date
Tech

C. albicans

4	HPR	TYR	GLAR	LYAL	URE	SUC1	AGL1	AGL2	NAG	4
+										+
2	ILE	GLY	GLPR	ALA	IDX	SUC2	BGL	BDF	CELL	2
+										+
1	PRO	GGLY	AARG	STY	HIS	TRE	BGAL	AGAL	NGAL	1

544030001

Panel Rapid Yeast Identificación.
MicroScan RYID. *C. glabrata*

SIEMENS
MicroScan®
Rapid Yeast ID Panel Worksheet

Issue No.
Date
Tech

C. glabrata

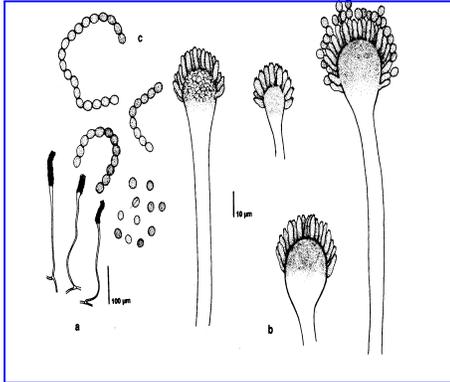
4	HPR	TYR	GLAR	LYAL	URE	SUC1	AGL1	AGL2	NAG	4
+										+
2	ILE	GLY	GLPR	ALA	IDX	SUC2	BGL	BDF	CELL	2
+										+
1	PRO	GGLY	AARG	STY	HIS	TRE	BGAL	AGAL	NGAL	1

256331000

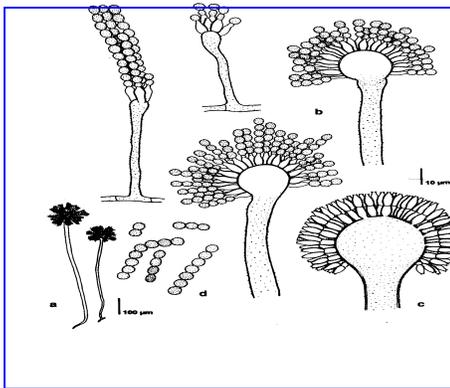
Morphology/Other Characteristics

ESPECIES DE ASPERGILLUS

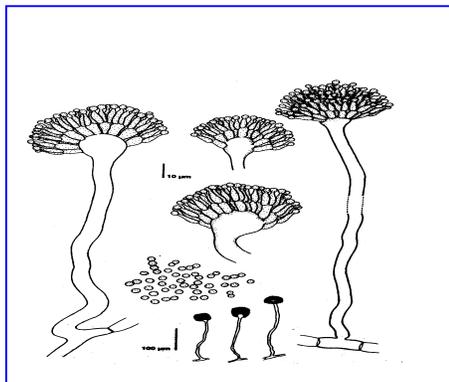
Aspergillus fumigatus



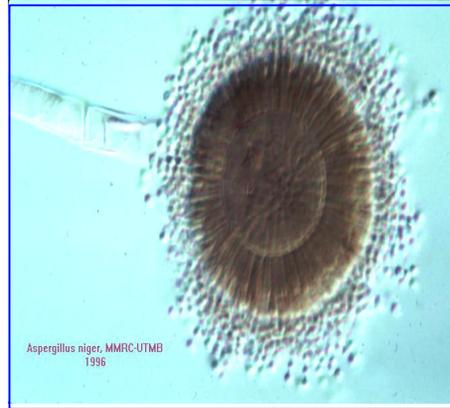
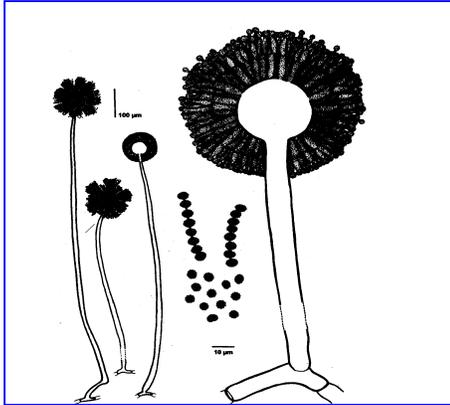
Aspergillus flavus



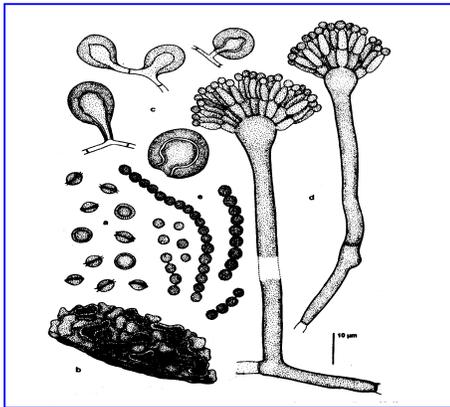
Aspergillus terreus



Aspergillus niger



Aspergillus nidulans



COLONIAS DE ASPERGILLUS

Aspergillus fumigatus



Aspergillus flavus



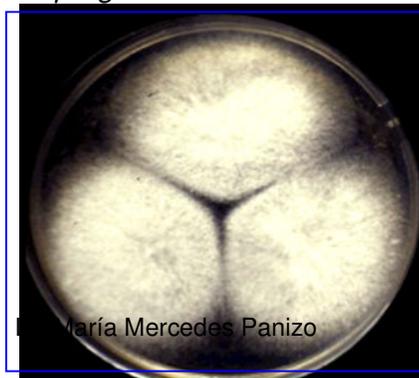
Aspergillus terreus



Aspergillus niger



Aspergillus nidulans



ZIGOMICETOS

Absidia sp



Mucor sp



Rhizopus sp



Rhizomucor sp

