

_____ Guía de Laboratorio

Micología

Guía de Laboratorio
Micología
Código: ASUC01692

Primera edición digital
Huancayo, 2022

De esta edición

© Universidad Continental, Oficina de Gestión Curricular
Av. San Carlos 1795, Huancayo-Perú
Teléfono: (51 64) 481-430 anexo 7361
Correo electrónico: recursosucvirtual@continental.edu.pe
<http://www.continental.edu.pe/>

Cuidado de edición
Fondo Editorial

Diseño y diagramación
Fondo Editorial

Todos los derechos reservados.

La *Guía de Trabajo*, recurso educativo editado por la Oficina de Gestión Curricular, puede ser impresa para fines de estudio.

Índice

Presentación	5
Primera unidad	6
Semana 1: Sesión 1	
Observación de colonias fúngicas y preparaciones microscópicas	7
Semana 2: Sesión 1	
Preparación de reactivos, colorantes y medios de cultivo	11
Semana 3: Sesión 1	
Observación de estructuras fúngicas	16
Semana 4: Sesión 1	
Manejo de claves de identificación de hongos, aislamiento de hongos de fuentes naturales	19
Segunda unidad	22
Semana 5: Sesión 1	
Examen de cultivos (fragmentación del talo, cinta adhesiva, microcultivos)	23
Semana 6: Sesión 1	
Identificación de levaduras (tubo germinativo, morfología, fisiología), procesamiento de microcultivos	27
Semana 7: Sesión 1	
Identificación de <i>Malassezia</i> sp.	32

Tercera unidad	37
Semana 9: Sesión 1	
Examen e identificación de cultivos de dermatofitos	38
Semana 10: Sesión 1	
Examen e identificación de cultivos de hongos demateaceos, <i>Sporothrix schenckii</i>	42
Semana 11: Sesión 1	
Examen de preparaciones microscópicas de <i>H. Capsulatum</i> y <i>P. Brasiliensis</i>	46
Semana 12: Sesión 1	
Aislamiento de hongos de fuentes naturales	49
Cuarta unidad	54
Semana 13: Sesión 1	
Examen y procesamiento de muestras clínicas	55
Semana 14: Sesión 1	
Susceptibilidad antigúngica por disco difusión (M44-A-2004)	58
Referencias	62
Anexo: Atlas micológico	63

Presentación

La guía de trabajo es importante porque tiene la misión de dirigir y orientar al estudiante durante el desarrollo de la asignatura. Las guías ayudan a los estudiantes a solucionar sus problemas que puedan presentarse durante el avance, ella nos señala cada paso que desarrollemos durante el presente semestre académico.

La Guía de Micología es un instrumento de apoyo para poder desarrollar las prácticas guiadas de los estudiantes, proporcionan los pasos que se desarrollarán en cada procedimiento. Esta guía puede tener vacíos, los cuales se resolverán en el transcurso de las sesiones, es en tanto un instrumento de importancia para nuestros estudiantes.

El estudiante será capaz de procesar e interpretar los resultados microbiológicos de hongos patógenos que causan enfermedades en el ser humano, así como de realizar la programación y el mantenimiento de los equipos correspondientes en un laboratorio clínico. Describiendo, infiriendo la estructura y característica de cada uno de ellos, siguiendo paso a paso en cada sesión y unidad con sus respectivos procedimientos de aislamiento e identificación de cada uno de ellos para poder llegar a un diagnóstico adecuado y poderle brindar al clínico los resultados más propicios colaborando con el bienestar de los pacientes.

Durante el desarrollo de las siguientes prácticas, el estudiante deberá llevar consigo siempre la guía, para poder seguir secuencialmente cada uno de los pasos, de esta manera será un soporte durante el desarrollo de su aprendizaje constante y alcanzar el propósito asignado al culminar el ciclo.

El autor

Primera unidad



Semana 1: Sesión 1

Observación de colonias fúngicas y preparaciones microscópicas

Sección: Apellidos y nombres:

Docente: Fecha: / / 2022

Duración: 60 min. Tipo de práctica: Individual () Equipo (x)

Instrucciones: Tener a la mano los materiales solicitados en forma individual y tener mucho cuidado con la manipulación de los simuladores. Usar en todo momento del guardapolvo, mascarilla, guantes y cofia.

I. Propósito

Inspeccionar la morfología y estructura de los hongos sobre láminas patrón y medios de cultivo.

II. Fundamento teórico

En el área de Microbiología los hongos son observados de dos maneras, bajo el microscopio (microscopía) y como una colonia sobre una placa de agar (macroscopía). Indicado en la PPT de la semana.

Figura 1. Características macroscópicas de las colonias

Forma	Elevación	Margen o borde	Superficie	Pigmento Anverso
Circular 	Plana y extendida 	Liso o entero 	Plegada 	Rojo 
Irregular 	Elevada y limitada 	Ondulado 	Sectorizada 	Violeta 
Filamentosa 	Convexa umbilicada 	Lobado 	Cerebriformes 	Amarillo 
Rizoidal 		Desflechado 	Con surcos radiales 	Marrón 

Fuente: Extraído de <https://m.exam-10.com/biolog/23362/index.html?page=7>

III. Equipos, materiales y reactivos

3.1. Prendas y accesorios

Ítem	Prendas	Característica	Cantidad
1	Guardapolvo	Mandil de drill	1
2	Guantes	Quirúrgicos	1
3	Mascarillas	N.95	1
4	Lentes protectores	Visores	1

3.2. Materiales

Ítem	Material	Característica	Cantidad
1	Cultivos en placas de levaduras y mohos	Placas descartables	Varios
2	Láminas montadas con microcultivo de hongos	Láminas de vidrio	Varios

IV. Indicaciones/instrucciones

- Mantener las normas básicas de bioseguridad.

V. Procedimientos

- Realizar el estudio macroscópico y microscópico con objetivos de 10x, 20x y 40x de aumento, localizando y diferenciando las principales estructuras fúngicas.

VI. Resultados

-
.....
.....
.....
-
.....
.....
.....
-
.....
.....
.....

VII. Conclusiones

.....
.....
.....
.....



VIII. Sugerencias y /o recomendaciones

.....

.....

.....

.....



Semana 2: Sesión 1

Preparación de reactivos, colorantes y medios de cultivo

 Sección: Apellidos y nombres:

Docente: Fecha: / / 2022

 Duración: 60 min. Tipo de práctica: Individual () Equipo (x)

Instrucciones: Tener a la mano los materiales solicitados en forma individual y tener mucho cuidado con la manipulación de los simuladores. Usar en todo momento del guardapolvo, mascarilla, guantes y cofia.

I. Propósito

- Adiestrar en la preparación de los diferentes medios de cultivo utilizados en micología.
- Aprender los procedimientos de preparación de colorantes y reactivos usados en micología.

II. Fundamento Teórico

- El estudiante debe de revisar el siguiente enlace: <https://www.ugr.es/~cjl/medios%20de%20cultivo.pdf>

III. Equipos, materiales y reactivos**3.1. Prendas y Accesorios**

Ítem	Prendas	Característica	Cantidad
1	Guardapolvo	Mandil de drill	1
2	Guantes	Quirúrgicos	1
3	Mascarillas	N.95	1
4	Lentes protectores	Visores	1

3.2. Materiales

Ítem	Material	Característica	Cantidad
1	Tubos con tapa rosca	Vidrio	1
2	Probeta	Vidrio	1
3	Matraz	Vidrio	1
4	Beaker	Vidrio	1
5	Papel filtro	Circular	1
6	Rejilla de asbesto	Metal	1
7	Tripode	Metal	1

3.3. Equipos

Ítem	Equipos	Característica	Cantidad
1	Mechero de bunsen	Metal	1
2	Autoclave	Metal	1

3.4. Insumos

Ítem	Insumos	Característica	Cantidad
1	Peptona	Proteína	10g
2	Glucosa	Carbohidrato	400 ml
3	Agar micosel o agar micobiotic	Medio Selectivo	36 g
4	Avena	Proteína	40 g
5	Papa	Carbohidrato	20 g
6	Granos de arroz blanco no enriquecido	Carbohidrato	8 g
7	Harina de maíz	Carbohidrato	40 g
8	Arroz no fortificado	Carbohidrato	200g
9	Agua destilada	Diluyente	1000 ml
10	Glicerina		400 ml
11	Fenol	Antiséptico	20 g
12	Azul de metileno	Colorante	2 g
13	Azul de algodón o sol. Acuosa 1%	Colorante	2 g
14	Hidróxido de potasio	Aclarante	20 g
15	Tween 80°	Inhibidor	50 ml

IV. Indicaciones/instrucciones

- Mantener las normas básicas de bioseguridad.

V. Procedimientos

Medios de cultivo

1. Recuperar hongos que se encuentren en muestras contaminadas con bacterias u hongos ambientales.
2. Con una probeta llenar 200 ml de agua destilada en un matraz, agregarle 36 gramos del agar y completar con 800 ml de agua destilada; hervir hasta disolver el medio completamente. Ajustar el pH a 6.5 ± 0.2 y dispensar porciones en placas Petri de 20 ml o en tubos tapa rosca, esterilizar en una autoclave durante 15 minutos a 121 °C. o 1.5 atmósferas, después inclinar los tubos hasta que el agar se solidifique.

Agar papa dextrosa

3. Medio que estimula la formación de conidios como *T. rubrum*, *M. audouinii*, *M. canis*. También utilizado en la realización de microcultivos o cepario.
4. Lavar, pelar y cortar la papa en trozos pequeños, agregar agua y autoclavar. Colar con gasa estéril, agregar el agar y la glucosa, hervir hasta disolver. Llevar el volumen a 1000 ml con agua destilada si fuera necesario. Dispensar en tubos tapa rosca limpios. Esterilizar en autoclave e inclinar los tubos hasta que el agar se solidifique.

Agar harina de maíz - Tween 80 (agar morfología)

5. Para la identificación de la morfológica de levaduras.

6. Mezclar la harina de maíz con el agua y calentar por 1 h a 65 °C, filtrar a través de gasa estéril y luego con papel de filtro Whatman n.º 2. Adicionar el agar, hervir. Enrazar a 1000 ml con agua destilada, adicionar el tween 80 y homogenizar. Esterilizar en autoclave. Dispensar en placas petri estériles.
7. Deshacer el fenol previamente a 60 °C en baño maría y mezclar con el ácido láctico, glicerina y el agua, luego agregar el azul de algodón (azul de Poirrier y azul de anilina son análogos al azul de algodón).

Hidróxido de potasio 20 %

8. Aclarante utilizado en la detección de estructuras fúngicas en muestras por examen microscópico. Su concentración varía entre el 10 y 40 %.
9. Los cristales de KOH se añaden lentamente en agitación hasta su completa disolución.

VI. Resultados

-
.....
.....
.....
-
.....
.....
.....



-
.....
.....
.....

VII. Conclusiones

.....
.....
.....
.....

VIII. Sugerencias y /o recomendaciones

.....
.....
.....
.....
.....



Observación de estructuras fúngicas

 Sección: Apellidos y nombres:

Docente: Fecha: / / 2022

 Duración: 60 min. Tipo de práctica: Individual () Equipo (x)

Instrucciones: Tener a la mano los materiales solicitados en forma individual y tener mucho cuidado con la manipulación de los simuladores. Usar en todo momento del guardapolvo, mascarilla, guantes y cofia.

I. Propósito

Identificar la morfología microscópica de algunos hongos y tipo de conidiogénesis estudiados en micología médica.

II. Fundamento teórico

Repasar las PPT y la grabación de la clase.

III. Equipos, materiales y reactivos**3.1. Prendas y accesorios**

Ítem	Prendas	Característica	Cantidad
1	Guardapolvo	Mandil de drill	1
2	Guantes	Quirúrgicos	1
3	Mascarillas	N.95	1
4	Lentes protectores	Visores	1

3.2. Materiales

Ítem	Material	Característica	Cantidad
1	Láminas con microcultivos de diferentes mohos	Láminas de vidrio	Varios
2	Láminas con levaduras de diferentes géneros	Láminas de vidrio	Varios

3.3. Equipo

Ítem	Equipo	Característica	Cantidad
1	Microscopios	electrónico	1

IV. Indicaciones

- Mantener las normas básicas de bioseguridad.

V. Procedimientos

- Realizar el estudio macroscópico y microscópico con objetivos de 10x, 20x y 40x de aumento, localizando y diferenciando las principales estructuras fúngicas.

VI. Resultados

-

-



VII. Conclusiones

.....
.....
.....
.....

VIII. Sugerencias y /o recomendaciones

.....
.....
.....
.....
.....

Semana 4: Sesión 1

Manejo de claves de identificación de hongos, aislamiento de hongos de fuentes naturales

Sección: Apellidos y nombres:

Docente: Fecha: / / 2022

Duración: 60 min. Tipo de práctica: Individual () Equipo (x)

Instrucciones: Tener a la mano los materiales solicitados en forma individual y tener mucho cuidado con la manipulación de los simuladores. Usar en todo momento del guardapolvo, mascarilla, guantes y cofia.

I. Propósito

Conocimiento y práctica del manejo de claves o llaves de identificación de hongos de importancia médica.

II. Fundamento teórico

Luego de identificar estructuras somáticas y reproductivas de los hongos, así como también la morfología macroscópica de sus colonias, se debe recurrir al manejo de claves o llaves de identificación de hongos.

III. Equipos, materiales y reactivos

3.1. Prendas y accesorios

Ítem	Prendas	Característica	Cantidad
1	Guardapolvo	Mandil de drill	1
2	Guantes	Quirúrgicos	1
3	Mascarillas	N.95	1
4	Lentes protectores	Visores	1

3.2. Materiales

Ítem	Material	Característica	Cantidad
1	Láminas con microcultivos de diferentes mohos	Láminas de vidrio	Varios
2	Láminas con levaduras de diferentes géneros	Láminas de vidrio	Varios

3.3. Equipo

Ítem	Equipo	Característica	Cantidad
1	Microscopios	metal	Uno

IV. Indicaciones

- Mantener las normas básicas de bioseguridad.
- Uso de claves o llaves de identificación de hongos de importancia médica.

V. Procedimientos

- Examinar macroscópicamente una colonia fúngica problema.
- Examinar microscópicamente una preparación con azul de lactofenol de la misma colonia.
- De acuerdo con sus observaciones anteriores, proceder a emplear la llave de identificación de géneros de hongos anexa.

VI. Resultados

-
.....
.....
.....
-
.....
.....
.....
-
.....
.....
.....

VII. Conclusiones

.....
.....
.....
.....
.....

VIII. Sugerencias y/o recomendaciones

.....
.....
.....
.....
.....



Segunda unidad



Semana 5: Sesión 1

Examen de cultivos (fragmentación del talo, cinta adhesiva, microcultivos)

 Sección: Apellidos y nombres:

Docente: Fecha: / / 2022

 Duración: 60 min. Tipo de práctica: Individual () Equipo (x)

Instrucciones: Tener a la mano los materiales solicitados en forma individual y tener mucho cuidado con la manipulación de los simuladores. Usar en todo momento del guardapolvo, mascarilla, guantes y cofia.

I. Propósito

Conocer y comparar las ventajas y desventajas del montaje por fragmentación del talo, con cinta scotch y microcultivos para el examen de los crecimientos fúngicos.

II. Fundamento teórico

El estudiante deberá venir a las prácticas habiendo repasado la clase de la semana.

III. Equipos, materiales y reactivos

3.1. Prendas y accesorios

Ítem	Prendas	Característica	Cantidad
1	Guardapolvo	Mandil de drill	1
2	Guantes	Quirúrgicos	1
3	Mascarillas	KN 95	1
4	Lentes protectores	Visores	1

3.2. Materiales

Ítem	Material	Característica	Cantidad
1	Asas micológicas	Metal	Dos
2	Láminas portaobjetos	Láminas de vidrio	Varios
3	Láminas cubreobjetos	Vidrio	Cinco
4	Pinzas	Metal	Dos
5	Cinta scotch	Grueso	Uno
6	Placa	Vidrio	Cinco
7	Papel filtro	Papel	Uno
8	Papel	Hoja	Uno
9	Varillas de vidrio	Vidrio	Dos

3.3. Equipo

Ítem	Equipo	Característica	Cantidad
1	Microscopios	Metal	1
2	Mechero	Metal	1

3.4. Insumos

Ítem	Insumos	Característica	Cantidad
1	Azul de lactofenol	Líquido	200 ml
2	Lactofenol de Aman	Líquido	200 ml

IV. Indicaciones

- Mantener las normas básicas de bioseguridad.
- Seguir en orden los procedimientos.

V. Procedimientos

5.1. Montaje por fragmentación del talo

- a) Colocar una gota de azul de lactofenol al centro de la lámina portaobjetos limpia.

- b) Con el asa de siembra, inocular este después de haber tomado del medio de cultivo una colonia específica entre la mitad del centro y borde de la colonia. Colocar el material en el lactofenol.
- c) Con el asa, homogenizar suavemente la porción de colonia hasta diseminarla finamente en el azul de lactofenol.
- d) Colocar el cubreobjetos en un ángulo de 45° por el borde del azul de lactofenol, y presionar suavemente.
- e) Sellar los bordes del cubreobjetos con esmalte de uñas para preservar el montaje.

5.2. Microcultivos

Recordar la clase de la semana y poner en práctica.

VI. Resultados

-
.....
.....
.....
-
.....
.....
.....
-
.....
.....
.....



VII. Conclusiones

.....

.....

.....

.....

.....

VIII. Sugerencias y /o recomendaciones

.....

.....

.....

.....

.....

Semana 6: Sesión 1

Identificación de levaduras (tubo germinativo, morfología, fisiología), procesamiento de microcultivos

 Sección: Apellidos y nombres:

Docente: Fecha: / / 2022

 Duración: 60 min. Tipo de práctica: Individual () Equipo (x)

Instrucciones: Tener a la mano los materiales solicitados en forma individual y tener mucho cuidado con la manipulación de los simuladores. Usar en todo momento del guardapolvo, mascarilla, guantes y cofia.

I. Propósito

Conocer, manejar e identificar las levaduras de importancia médica.

II. Fundamento teórico

La identificación de levaduras de importancia médica cada vez se hace más necesaria, por ello recurrimos a pruebas que nos garanticen su correcta identificación. Entre estas pruebas tenemos la prueba del tubo germinativo, estudio de la morfología y pruebas fisiológicas, entre otras.

III. Equipos, materiales y reactivos

3.1. Prendas y accesorios

Ítem	Prendas	Característica	Cantidad
1	Guardapolvo	Mandil de drill	1
2	Guantes	Quirúrgicos	1
3	Mascarillas	N.95	1
4	Lentes protectores	Visores	1

3.2. Materiales

Ítem	Material	Característica	Cantidad
1	Plasma o suero estéril (alícuotas de 0.5 ml almacenados a -20°C)	Nutriente	cinco
2	Asas Khole	Nitron	cinco
3	Láminas cubreobjetos	Vidrio	Diez
4	Láminas portaobjetos	Vidrio	Diez
5	Tubos de 16 x 150 mm	Vidrio	cinco
6	Agua estéril	Líquido	200ml
7	Pipetas de rango múltiple de 50-200 ul	Equipo	cinco
8	Punteras	Material	Diez

3.3. Equipo

Ítem	Equipo	Característica	Cantidad
1	Baño maría a 35 °C	Equipo	Uno
2	Cámara de incubación	Equipo	Uno

3.4. Insumos

Ítem	Insumos	Característica	Cantidad
1	Organismos control (C. albicans, C. tropicalis)	Cepa	Uno
2	Harina de maíz con Tween 80 (AHM-T80)	Medio de cultivo	Cinco
3	Ampolla de API C Medium	Insumo	Cinco
4	Galería API 20 C AUX	Insumo	Cinco

IV. Indicaciones

- Mantener las normas básicas de bioseguridad.

V. Procedimientos

5.1. Tubo germinativo

- a) Tocar ligeramente una colonia con el asa de Khole.
- b) Suspender las levaduras en el plasma o suero.
- c) Incubar en baño maría a 35 °C por 2.5 h.
- d) Colocar 2 a 3 asadas de la suspensión sobre un portaobjetos rotulado con el número de muestra.
- e) Cubrir la suspensión con laminilla cubreobjetos.
- f) Examinar a 40x y 100x para la detección o ausencia de tubos germinativos.

5.2. Morfología

- a) Preparar placas con agar harina de maíz con Tween 80 (AHM-T80).
- b) Con un lápiz para vidrio dividir la placa en 4 sectores y utilizar cada sector rotulando con el número de muestra de cada levadura aislada.
- c) Con una aguja de inoculación tocar ligeramente la colonia a probar, practicar dos estrías de aproximadamente 1.5 cm de longitud separadas por 1 cm, sin excavar el medio.

- d) Después de flamear y enfriar la aguja de inoculación, practicar una estría en forma de "S" cruzando las dos estrías realizadas anteriormente. El aspecto final del preparado es similar al signo de dólares "\$".
- e) Finalmente cubrir el preparado con una laminilla cubreobjetos previamente flameada y enfriada.
- f) Incubar la placa a 28 °C y examinar a 24, 48 y 72 horas bajo el microscopio retirando la tapa, emplear objetivo de bajo (10x) y alto (40x) poder.

5.3. Fisiología

- a) Preparar una suspensión de la levadura problema correspondiente al tubo 2 de la escala de Mc. Farland.
- b) Verter 5 ml de agua destilada estéril en la cámara de incubación.
- c) Tomar 100 ul de la suspensión e inocular la ampolla de API C médium, agitar y dispensar aproximadamente 197 ul en cada cúpula de la galería API 20 C AUX, hasta su llenado horizontal no exceder.
- d) Colocar la galería dentro de la cámara de incubación y tapar.
- e) Incubar a temperatura ambiente 48-72 horas.
- f) Registrar las lecturas de las 48 y 72 horas. Respectivamente en la hoja de resultados.

Continuar con el procesamiento de los mohos que han fructificado de la práctica anterior.

VI. Resultados

-
.....
.....
.....
-
.....
.....
.....
-
.....
.....
.....

VII. Conclusiones

.....
.....
.....
.....
.....

VIII. Sugerencias y /o recomendaciones

.....
.....
.....
.....
.....



Semana 7: Sesión 1
Identificación de Malassezia sp.

Sección: Apellidos y nombres:

Docente: Fecha: / / 2022

Duración: 60 min. Tipo de práctica: Individual () Equipo (x)

Instrucciones: Tener a la mano los materiales solicitados en forma individual y tener mucho cuidado con la manipulación de los simuladores. Usar en todo momento del guardapolvo, mascarilla, guantes y cofia.

I. Propósito

Identificar y conocer las especies del género *Malassezia*.

II. Fundamento teórico

Las levaduras del género *Malassezia* son capaces de producir diferentes patologías que van desde su ubicación en la parte más superficial de la piel hasta sistémicas, por ello su identificación es importante para los clínicos. Son levaduras lipofílicas y la mayoría lipodependientes.

III. Equipos, materiales y reactivos

3.1. Prendas y accesorios

Ítem	Prendas	Característica	Cantidad
1	Guardapolvo	Mandil de drill	1
2	Guantes	Quirúrgicos	1
3	Mascarillas	N.95	1
4	Lentes protectores	Visores	1

3.2. Materiales

Ítem	Material	Característica	Cantidad
1	Asas Khole	Nitron	Cinco
2	Placa petri estéril de 15 x 90 mm	Plástico	Cinco
3	Láminas cubreobjetos	Vidrio	Diez
4	Láminas portaobjetos	Vidrio	Diez
5	Tubos de 16 x 150 mm	Vidrio	Diez
6	Agua estéril	Líquido	Diez
7	Pipeta automática de 5 ul	Material	Cinco
8	Punteras	Material	Diez
9	Pipetas de 5 ml estériles	Material	Cinco

3.3. Equipo

Ítem	Equipo	Característica	Cantidad
1	Baño maría a 35 °C	Equipo	Uno
2	Cámara de incubación	Equipo	Uno

3.4. Insumos

Ítem	Insumos	Característica	Cantidad
1	Organismos control (Malassezia furfur)	cepa	Uno
2	Frasco con 60 ml de agar Saboraud dextrosa 2 % con Cloranfenicol - cicloheximida (ASDCC)	Medio de cultivo	Cinco
3	Tween 20, 40, 60 y 80	Inhibidores	Uno
4	Peróxido de hidrógeno 10 vol.	Antiséptico	10ml
5	Agar esculina en tubo	Agar - inhibidor	Cinco

IV. Indicaciones

- Mantener las normas básicas de bioseguridad.

V. Procedimientos

5.1. Prueba de utilización de Tween

- a) Derretir el frasco con los 60 ml de agar y enfriarlo a 50 °C.
- b) Hacer una suspensión del cultivo problema en 5 ml de agua destilada estéril, ajustar a una concentración de aproximadamente 10⁵ células / ml.
- c) Coger 2 ml de la suspensión indicada anteriormente y agregar al agar derretido.
- d) Mezclar vigorosamente y verter en una placa petri de 90 mm de diámetro y dejar que solidifique.
- e) Practicar sobre el agar cuatro hoyos equidistantes con la ayuda de un sacabocado de 2 mm de diámetro y luego llenarlos con 5 ul de los Tween 20, 40, 60 y 80.
- f) Incubar por siete días a 32 °C.
- g) Anotar el “patrón de tween específico” del cultivo problema, muchos aislamientos pueden darlo dentro de 2 o 3 días de incubación.
- h) Confrontar los resultados obtenidos con la tabla adjunta para la identificación del cultivo problema.

Tabla. Physiological characteristics of *M. japonica* sp. nov. and other *Malassezia* species^a

Species	Growth on SA ^b at 32°C	Growth on mDixon ^c at			Catalase reaction	Utilization of:			
		32°C	37°C	40°C		10% Tween 20	0.5% Tween 40	0.5% Tween 60	0.1% Tween 80
<i>M. japonica</i> sp. nov.	-	+	+	-	+	-	±	+	-
<i>M. slooffiae</i> ^d	-	+	+	+	+	± or +	+	+	-
<i>M. sympodialis</i> ^d	-	+	+	+	+	-	+	+	+
<i>M. furfur</i> ^d	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>M. dermatis</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>M. globosa</i> ^d	-	+	± or -	-	+	-	-	-	-
<i>M. obtusa</i> ^d	-	+	± or +	-	+	-	-	-	-
<i>M. restricta</i> ^d	-	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>M. pachydermatis</i> ^d	+	+	+	+	± or +	-	+	+	+

^a +, positive; -, negative; ±, weakly positive.
^b SA, Sabouraud dextrose agar.
^c mDixon, modified Dixon agar.
^d Data are from Guého et al. (7).

Fuente: Tomado de Sugita et al (2003). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC254348/>

5.2. Prueba de la catalasa

- a) Con el asa de Khole, hacer un frotis del cultivo sobre una lámina portaobjetos
- b) Adicionar una gota de peróxido de hidrógeno 10 vol.
- c) Prueba de hidrolisis de esculina
- d) Con el asa de Khole, inocular el agar esculina por puntura profunda con un cultivo fresco.
- e) Incubar por 5 días a 32 °C.
- f) Enfocar y esquematizar láminas patrones de lesiones provenientes de pitiriasis versicolor.

VI. Resultados

-
-
-
-

-
.....
.....
.....

VII. Conclusiones

.....
.....
.....
.....
.....

VIII. Sugerencias y/o recomendaciones

.....
.....
.....
.....
.....

Tercera unidad



Examen e identificación de cultivos de dermatofitos

Sección: Apellidos y nombres:

Docente: Fecha: / / 2022

Duración: 60 min. Tipo de práctica: Individual () Equipo (x)

Instrucciones: Tener a la mano los materiales solicitados en forma individual y tener mucho cuidado con la manipulación de los simuladores. Usar en todo momento del guardapolvo, mascarilla, guantes y cofia.

I. Propósito

Reconocer e identificar dermatofitos causantes de tiñas en nuestro país.

II. Fundamento teórico

Los dermatofitos son un grupo de hongos causantes de la dermatofitosis, se les agrupa en tres géneros (trichophyton, epidermophyton y microsporum).

III. Equipos, materiales y reactivos

3.1. Prendas y accesorios

Ítem	Prendas	Característica	Cantidad
1	Guardapolvo	Mandil de drill	1
2	Guantes	Quirúrgicos	1
3	Mascarillas	N.95	1
4	Lentes protectores	Visores	1

3.2. Materiales

Ítem	Material	Característica	Cantidad
1	Asas Khole	Nitron	
2	Placa petri estéril de 15 x 90 mm	Vidrio	Cinco
3	Láminas cubreobjetos	Vidrio	Diez
4	Láminas portaobjetos	Vidrio	Diez
5	Tubos de 16 x 150 mm	Vidrio	Diez
6	Agua estéril	Líquido	100 ml
7	Pipeta automática de 5 ul	Equipo	Cinco
8	Punteras	Plástico	Diez
9	Pipetas de 5 ml estériles	Vidrio	Cinco

3.3. Equipo

Ítem	Equipo	Característica	Cantidad
1	Autoclave	Olla	Uno

3.4. Insumos

Ítem	Insumos	Característica	Cantidad
1	Cepa de <i>Microsporum canis</i>	Cepa	Uno
2	Cepa de <i>Microsporum gypseum</i>	Cepa	Uno
3	Cepa de <i>Trichophyton rubrum</i>	Cepa	Uno
4	Cepa de <i>Trichophyton mentagrophytes</i>	Cepa	Uno
5	Cepa de <i>trichophyton tonsurans</i>	Cepa	Uno
6	Azul de lactofenol	Colorante	10ml
7	Agar úrea de Christensen	Medio de cultivo	Cinco
8	Medio arroz	Medio de cultivo	Cinco
9	Agar papa dextrosa	Medio de cultivo	Cinco

IV. Indicaciones

- Mantener las normas básicas de bioseguridad.

V. Procedimientos

- a) De las cepas suministradas, realizar exámenes directos con ALF.
- b) Visualizar y esquematizar estructuras propias de las diferentes especies de dermatofitos.
- c) Inocular los dermatofitos sobre agar urea de Christensen, medio de arroz y agar papa dextrosa. Registrar los resultados desde los tres días hasta las dos semanas.

VI. Resultados

-
.....
.....
.....
-
.....
.....
.....
.....
-
.....
.....
.....
.....

VII. Conclusiones

.....

.....

.....

.....

.....

VIII. Sugerencias y/o recomendaciones

.....

.....

.....

.....

.....



Examen e identificación de cultivos de hongos demateaceos, *Sporothrix schenckii*

Sección: Apellidos y nombres:

Docente: Fecha: / / 2022

Duración: 60 min. Tipo de práctica: Individual () Equipo (x)

Instrucciones: Tener a la mano los materiales solicitados en forma individual y tener mucho cuidado con la manipulación de los simuladores. Usar en todo momento del guardapolvo, mascarilla, guantes y cofia.

I. Propósito

Reconocer e identificar a mohos demateaceos de importancia médica y a *Sporothrix schenckii*.

II. Fundamento teórico

Revisar las PPT de la clase teórica que se ubica en el aula virtual.

III. Equipos, materiales y reactivos

3.1. Prendas y accesorios

Ítem	Prendas	Característica	Cantidad
1	Guardapolvo	Mandil de drill	1
2	Guantes	Quirúrgicos	1
3	Mascarillas	N.95	1
4	Lentes protectores	Visores	1

3.2. Materiales

Ítem	Material	Característica	Cantidad
1	Asas Khole	Nitron	Cinco
2	Placa petri estéril de 15 x 90 mm	Vidrio	Cinco
3	Láminas cubreobjetos	Vidrio	Diez
4	Láminas portaobjetos	Vidrio	Diez
5	Tubos de 16 x 150 mm	Vidrio	Diez
6	Agua estéril	Líquido	100ml
7	Pipeta automática de 5 ul	Equipo	Cinco
8	Punteras	Plástico	Diez
9	Pipetas de 5 ml estériles	Vidrio	Cinco

3.3. Insumos

Ítem	Insumos	Característica	Cantidad
1	Cepa de demateaceos	Cepa	Uno
2	Cepa de <i>Sporothrix schenckii</i>	Cepa	Uno
3	Azul de lactofenol	Colorante	10 ml
4	Agar úrea de Christensen	Medio de cultivo	Cinco
5	Medio arroz	Medio de cultivo	Cinco

IV. Indicaciones

- Mantener las normas básicas de bioseguridad.

V. Procedimientos:

- De las cepas suministradas, realizar exámenes directos con ALF.

- Visualizar y esquematizar estructuras propias de las diferentes especies de demateaceos y *Sporothrix schenckii*.
- Enfocar y esquematizar láminas patrones de microcultivos y cortes histológicos.

VI. Resultados

-
.....
.....
.....
-
.....
.....
.....
-
.....
.....
.....

VII. Conclusiones

.....
.....
.....
.....
.....

VIII. Sugerencias y/o recomendaciones

.....

.....

.....

.....

.....



Examen de preparaciones microscópicas de *H. Capsulatum* y *P. Brasiliensis*

Sección: Apellidos y nombres:

Docente: Fecha: / / 2022

Duración: 60 min. Tipo de práctica: Individual () Equipo (x)

Instrucciones: Tener a la mano los materiales solicitados en forma individual y tener mucho cuidado con la manipulación de los simuladores. Usar en todo momento del guardapolvo, mascarilla, guantes y cofia.

I. Propósito

Reconocer e identificar a *H. capsulatum* y *P. brasiliensis*

II. Fundamento teórico

La histoplasmosis es una infección aguda, subaguda o crónica producida por especies del género *Histoplasma*. Revisar clase de la semana.

III. Equipos, Materiales y Reactivos

3.1. Prendas y accesorios

Ítem	Prendas	Característica	Cantidad
1	Guardapolvo	Mandil de drill	1
2	Guantes	Quirúrgicos	1
3	Mascarillas	N.95	1
4	Lentes protectores	Visores	1

3.2. Materiales

Ítem	Material	Característica	Cantidad
1	Montaje permanente de cultivos de <i>H. capsulatum</i>	Lámina preparada	Cinco
2	Cortes histológicos de <i>H. capsulatum</i>	Lámina preparada	Cinco
3	Montaje permanente de cultivos de <i>P. brasiliensis</i>	Lámina preparada	Cinco
4	Cortes histológicos de <i>P. brasiliensis</i>	Lámina preparada	Cinco

III. Indicaciones

- Mantener las normas básicas de bioseguridad.

IV. Procedimientos

- Enfocar y esquematizar láminas patrones de microcultivos y cortes histológicos.

V. Resultados

-
-
-
-
-
-
-
-
-
-



VI. Conclusiones

.....

.....

.....

.....

.....

VII. Sugerencias y/o recomendaciones

.....

.....

.....

.....

.....

Semana 12: Sesión 1

Aislamiento de hongos de fuentes naturales

Sección: Apellidos y nombres:

Docente: Fecha: / / 2022

Duración: 60 min. Tipo de práctica: Individual () Equipo (x)

Instrucciones: Tener a la mano los materiales solicitados en forma individual y tener mucho cuidado con la manipulación de los simuladores. Usar en todo momento del guardapolvo, mascarilla, guantes y cofia.

I. Propósito

Conocer y utilizar las diferentes técnicas empleadas en la recuperación de hongos a partir de fuentes naturales.

II. Fundamento teórico

Los hongos son organismos cosmopolitas, se encuentran sobre una gran diversidad de hábitat (suelo, aire, agua, plantas, animales, etc.).

Los hongos por su hábitat natural específico se clasifican como geofílicos, acuáticos, zoofílicos, fitofílicos o antropofílicos. Se les puede aislar de fuentes no naturales como superficies de mesas, catéteres, estufas, aire acondicionado, microscopios, entre otros.

Existen diversidad de técnicas que nos permiten aislar diferentes especies de hongos a partir de variados sustratos. En determinados casos, es necesario utilizar medios especiales que faciliten el aislamiento de dichos hongos.

III. Equipos, materiales y reactivos

3.1. Prendas y accesorios

Ítem	Prendas	Característica	Cantidad
1	Guardapolvo	Mandil de drill	1
2	Guantes	Quirúrgicos	1
3	Mascarillas	N.95	1
4	Lentes protectores	Visores	1

3.2. Materiales

Ítem	Material	Característica	Cantidad
1	Tubérculos y frutas contaminadas	Colonias naturales	Cinco
2	Tierra de jardín	Tierra natural	200 g
3	Solución salina fisiológica	Líquido con electrolitos	200 ml
4	Agua destilada	Líquido	200 ml
5	Tubos de 13 x 100 mm	Vidrio	Cinco
6	Pipetas	Vidrio	Cinco
7	Asas de Khole	Nitron	Cinco
8	Gradilla	Plástico	Cinco
9	Placas petri	Vidrio	Cinco

3.3. Equipo

Ítem	Equipo	Característica	Cantidad
1	Microscopios	metal	Uno

3.4. Insumos

Ítem	Insumos	Característica	Cantidad
1	A. Micobiotic	Medio de cultivo	Cinco
2	A. Papa dextrosa	Medio de cultivo	Cinco
3	A. Extracto de malta-cloranfenicol	Caldo de cultivo	Cinco

IV. Indicaciones

- Mantener las normas básicas de bioseguridad.

V. Procedimientos

5.1. Inoculación directa

- Con el asa micológica, coger una pequeña porción de la muestra, proveniente de fruta o tubérculo infectado por hongos.
- Inocular por puntura con el asa micológica sobre el agar papa dextrosa.
- Incubar a temperatura ambiente por una semana.

5.2. Exposición de placas al medio ambiente

- Las placas de A. Sabouraud y micobiotic exponerlas al medio ambiente elegido, por 15 minutos.
- Incubar a temperatura ambiente por una semana.

5.3. Técnica de dilución en placa

- Se usa 1 ml de suspensión como inóculo sobre agar extracto de malta-cloranfenicol en placa.

- b) 1 ml de dil. 2 en 9 ml de agua estéril = $1/1000 \times 1/10$, dilución 1: 10,000.
- c) Cuando las placas y el agua destilada estéril estén preparadas, hacer las diluciones prescritas. Agitar cada una de las suspensiones vigorosamente para romper agregados de suelo y extraer la muestra rápidamente cuando la suspensión esté en movimiento.
- d) Dispensar la dilución final, 1 ml por placa, de 4-6 placas.
- e) Después de 3-6 días de periodo de incubación a temperatura ambiente, contar las colonias por placa que tengan entre 10 y 100 colonias y promediar (para el cálculo de propágulos en 1 gramo de suelo); entonces aislar una colonia por picado de la punta de una hifa a tubos inclinados con agar extracto de malta.
- f) Vigilar los cultivos hasta dos semanas.
- g) Cálculo de número por gramo de suelo: número promedio de propágulos por placa X factor de dilución.

VI. Resultados

-
.....
.....
.....
-
.....
.....
.....

-
.....
.....
.....

VII. Conclusiones

.....
.....
.....
.....
.....

VIII. Sugerencias y/o recomendaciones

.....
.....
.....
.....
.....



Cuarta unidad



Semana 13: Sesión 1

Examen y procesamiento de muestras clínicas

Sección: Apellidos y nombres:

Docente: Fecha: / / 2022

Duración: 60 min. Tipo de práctica: Individual () Equipo (x)

Instrucciones: Tener a la mano los materiales solicitados en forma individual y tener mucho cuidado con la manipulación de los simuladores. Usar en todo momento del guardapolvo, mascarilla, guantes y cofia.

I. Propósito

Aislar e identificar agentes productores de micosis superficial y cutánea.

II. Fundamento teórico

Las micosis tienen como agentes a mohos y levaduras. Las más frecuentes en el laboratorio de micología son las micosis superficiales y cutáneas; se pone énfasis especial en el aislamiento e identificación de estos agentes. Para lograr este objetivo, complementamos el diagnóstico clínico con los hallazgos en el laboratorio de micología.

III. Equipos, materiales y reactivos**3.1. Prendas y accesorios**

Ítem	Prendas	Característica	Cantidad
1	Guardapolvo	Mandil de drill	1
2	Guantes	Quirúrgicos	1
3	Mascarillas	N.95	1
4	Lentes protectores	Visores	1

3.2. Materiales

Ítem	Material	Característica	Cantidad
1	Aceite de oliva	Aclarante	Cinco
2	Láminas portaobjetos	Vidrio	Diez
3	Láminas cubreobjetos	vidrio	Diez

3.3. Equipo

Ítem	Equipo	Característica	Cantidad
1	Microscopios	metal	Uno
2	Estufa 35 °C	metal	Uno

3.4. Insumos

Ítem	Insumos	Característica	Cantidad
1	A. Saboraud	Medio de cultivo	Cinco
2	A. Micobiotic	Medio de cultivo	Cinco
3	Tinta china	Colorante	20 ml
4	KOH 20 %	Aclarante	20 ml
5	Azul de lactofenol	Colorante	20 ml

IV. Indicaciones

Mantener las normas básicas de bioseguridad.

V. Procedimientos

De acuerdo con los conocimientos y destrezas adquiridos, aislar e identificar los agentes productores de micosis en las muestras clínicas asignadas.

VI. Resultados

-
.....
.....
.....
-
.....
.....
.....
-
.....
.....
.....

VII. Conclusiones

.....
.....
.....
.....
.....

VIII. Sugerencias y/o recomendaciones

.....
.....
.....
.....
.....



Susceptibilidad antifúngica por disco difusión (M44-A-2004)

Sección: Apellidos y nombres:

Docente: Fecha: / / 2022

Duración: 60 min. Tipo de práctica: Individual () Equipo (x)

Instrucciones: Tener a la mano los materiales solicitados en forma individual y tener mucho cuidado con la manipulación de los simuladores. Usar en todo momento del guardapolvo, mascarilla, guantes y cofia.

I. Propósito

Describir los procedimientos de laboratorio para la determinación de susceptibilidad antifúngica para especies de *Candida* mediante el método de disco difusión.

II. Fundamento teórico

En los últimos años se ha vuelto una necesidad realizar pruebas de susceptibilidad antifúngica de más fácil disponibilidad. La prueba de susceptibilidad antifúngica por disco difusión (M44-A-2004) provee y establece la metodología por disco difusión para especies de *Candida*, interpretación de resultados para fluconazol y rangos de control de calidad para fluconazol y voriconazol.

III. Equipos, materiales y reactivos

3.1. Prendas y accesorios

Ítem	Prendas	Característica	Cantidad
1	Guardapolvo	Mandil de drill	1
2	Guantes	Quirúrgicos	1
3	Mascarillas	N.95	1
4	Lentes protectores	Visores	1

3.2. Materiales

Ítem	Material	Característica	Cantidad
1	Estándar de turbidez Mc Farland 0.5	Medio estándar de turbidez	Cinco
2	Hisopos de algodón	Estéril	Cinco
3	Solución salina fisiológica	Líquido con electrolitos	200 ml
4	Regla	Plástico de 20 cm	Cinco

3.3. Equipo

Ítem	Equipo	Característica	Cantidad
1	Estufa de 35 °C	Metal	Uno
2	Turbidímetro de Mc Farland	Fotómetro	Uno

3.4. Insumos

Ítem	Insumos	Característica	Cantidad
1	A. Mueller - Hinton con glucosa 2 % y 0.5 ug/ml de azul de metileno (AMH+GMB)	Medio de cultivo	Cinco
2	Fluconazol	Fármaco de 25 mg	Cinco
3	Variconazol	Fármaco de 25 mg	Cinco

IV. Indicaciones

Mantener las normas básicas de bioseguridad.

VII. Conclusiones

.....

.....

.....

.....

.....

VIII. Sugerencias y/o recomendaciones

.....

.....

.....

.....

.....



- Hoog, S., Guarro, J., Gené, J., y Figueras, M. (2005). The atlas of clinical fungi. *Journal of Organic Chemistry - J ORG CHEM*, 2000.
- Kern, M. E., & Blevins, K. S. (1997). *Medical mycology: a self-instructional text* (2nd ed.). F.A. Davis.
- Koneman, E y Roberts, G. (1987). *Micología: práctica de laboratorio*. (3.^a ed.) Editorial Médica Panamericana
- Sugita, T., Takashima, M., Kodama, M., Tsuboi, R., & Nishikawa, A. (2003). Description of a new yeast species, *Malassezia japonica*, and its detection in patients with atopic dermatitis and healthy subjects. *Journal of clinical microbiology*, 41(10), 4695-4699. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.10.4695-4699.2003>

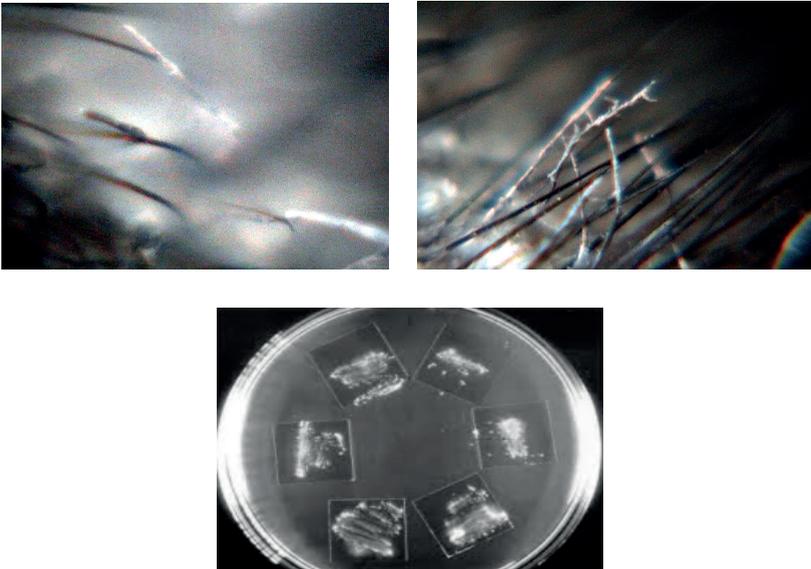
Anexo: Atlas micológico

Figura 2. Lesión del cuero cabelludo producido por un dermatofito



Nota: Lesión del cuero cabelludo producido por un dermatofito, tiña capitis, agente *Trichophyton tonsurans*. Tomado de <https://bit.ly/37T4ENe>

Figura 3. Técnica de Dalmau



<http://www.higiene.edu.uy/parasito/trabajos/identlev.pdf>

