



Universidad Autónoma Metropolitana
Unidad Xochimilco
Departamento de Sistemas Biológicos
Química Farmacéutica Biológica



Reporte de Servicio Social en el Hospital Infantil de México “Federico Gómez”

Título del proyecto específico:

Estudio de la incidencia de enfermedades micológicas en el Hospital Infantil
de México “Federico Gómez”.

Alumna: Karla Jacqueline Reyes Durán
Matricula: 2182043734

Asesor interno: Laura Estela Castrillón Rivera
No económico: 8140
Departamento de Sistemas Biológicos División
Ciencias Biológicas y de la Salud

Asesor externo: Jesús Reséndiz Sánchez
No. de cédula: 7621488
Laboratorio de Micología
Hospital Infantil de México “Federico Gómez”

Periodo de realización: Del 10 de Julio de 2023 al 10 de Enero del 2024

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN.....	2
OBJETIVOS.....	3
Objetivo general.....	3
Objetivos específicos	3
ANTECEDENTES	4
Micosis prevalentes en la infancia	4
Diagnóstico de las micosis.....	6
MATERIALES Y MÉTODOS.....	7
Toma de la muestra.....	7
Escamas dérmicas	7
Escamas de cabeza y cabellos	7
Escamas ungueales	7
Impronta	7
Procesamiento de las muestras	8
Escamas dérmicas, ungueales y cabellos	8
Improntas.....	8
Medición del índice de galactomanano	8
Biopsias	9
Orina.....	9
Recolección y análisis de los datos.....	9
RESULTADOS Y DISCUSIONES	10
CONCLUSIÓN	16
ANEXO I. Formulación de los medios de cultivo.....	17
Medio de cultivo Agar Dextrosa y Papa (PDA)	17
Medio de cultivo Agar Dextrosa Sabouraud.....	17
Medio de cultivo Agar Micosel	18
Medio de cultivo CHROMAgar™ Candida	18
ANEXO II. Fundamento de las tinciones.....	19
Tinción de azul de lactofenol	19

Tinción de Gram	19
Tinción de Giemsa	19
Tinción de Ziehl-Neelsen.....	20
ANEXO III. Injerto del Kit Platelia™ Aspergillus Ag BIO-RAD.....	21
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	23

INTRODUCCIÓN

Los patógenos fúngicos constituyen una amenaza importante para la salud pública debido a que son cada vez más comunes y resistentes al tratamiento. La Organización Mundial de la Salud indica que cerca del 20% de toda la población a nivel mundial padece de algún tipo de micosis, de las cuales más del 70% ocurre en las personas más vulnerables como niños y adolescentes (Ramos-Mancheno, A., 2020).

Diversos estudios han reportado micosis cutáneas superficiales y micosis invasivas, estas últimas asociadas a una mayor tasa de morbilidad y mortalidad. La epidemiología de las enfermedades fúngicas ha cambiado en los últimos años, aun así, las especies de los géneros *Candida*, *Aspergillus* y *Cryptococcus* continúan siendo las más frecuentes, algunas de ellas tienen baja sensibilidad o son resistentes a los principales antifúngicos (Tangarife-Castaño, V. et. al., 2015). Pese a la inquietud que las enfermedades fúngicas suscitan, estas reciben poca atención lo que lleva a un diagnóstico erróneo, mal tratamiento y, finalmente, a la escasez de datos de calidad sobre la distribución de las micosis en la población pediátrica. Considerando esto, es de vital importancia registrar, analizar y compartir los datos sobre la incidencia y prevalencia de las enfermedades fúngicas en la población pediátrica para utilizarse a favor de la salud de los pacientes.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

En las últimas décadas la incidencia de las enfermedades causadas por hongos ha aumentado y actualmente presentan un problema de salud. El incremento de infecciones fúngicas se debe a factores como el uso de antibióticos de amplio espectro, hospitalización prolongada, diabetes, pacientes inmunocomprometidos e incluso por el creciente número de pacientes que han sufrido cirugía grave, son tratados con inmunosupresores o reciben quimioterapia o radioterapia (Tangarife et. al., 2015). Se ha reportado que en pacientes pediátricos hospitalizados e inmunocomprometidos las enfermedades fúngicas invasivas son una de las principales causas de morbilidad y mortalidad (Pana et. al., 2017), por otro lado, las micosis cutáneas en la población pediátrica no son principales causas de morbimortalidad y representan entre el 8% y 10% de las dermatosis en niños (Giraldo et. al., 2014). Aunque mundialmente ha incrementado el número de casos de micosis sistémicas por hongos como *Candida ssp.*, *Cryptococcus spp.*, *Aspergillus spp* y *Pneumocystis jirovecii* en México no hay datos epidemiológicos de su incidencia o prevalencia, es por ello por lo que existe la necesidad de que todos los hospitales de especialidad que atienden a pacientes con inmunosupresión severa dispongan de laboratorios de micología, así como la creación de un centro nacional de referencia de micosis donde se puedan concentrar los datos de estas infecciones y contribuir a la elaboración de planes de educación para la salud, prevención, diagnóstico y tratamiento de las enfermedades fúngicas (Méndez et. al., 2016). Con lo anterior señalado, el estudio de la incidencia de las enfermedades causadas por hongos es fundamental para detectar los factores que ponen en riesgo la salud de los pacientes pediátricos.

OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar la incidencia de las enfermedades fúngicas durante un periodo de 6 meses en pacientes del Hospital Infantil de México “Federico Gómez”.

Objetivos específicos

- Analizar muestras provenientes de infantes con sospecha de una enfermedad micótica.
- Identificar el agente causante de la micosis en el paciente para su correcto diagnóstico clínico.
- Recabar y analizar la información de las micosis diagnosticadas en los infantes.

ANTECEDENTES

Micosis prevalentes en la infancia

Las enfermedades fúngicas que afectan a la población pediátrica son diversas, se pueden presentar micosis invasivas y micosis cutáneas. Las micosis cutáneas son enfermedades en la piel que se presentan por la disminución de las defensas del huésped o por la capacidad del agente para infectar; aunque las micosis cutáneas no son una de las principales causas de morbilidad y mortalidad es importante reconocerlas a tiempo para llevar un tratamiento adecuado, evitar la complicación y su transmisión (Giraldo et. al., 2014). Estas micosis son causadas principalmente por *Malassezia* y el grupo de los dermatofitos (Tangarife et. al., 2015), en Latino América y México los cinco dermatofitos más frecuentes en la población general son *T. rubrum* (70%), *M. canis* (13%), *T. mentagrophytes* (10%), *T. tonsurans* (3%) y *E. floccosum* (1%) (**Gráfico I**). Las dermatofitosis también se clasifican según su ubicación corporal, la más frecuente en la población pediátrica es la tiña de cabeza, seguida por la del cuerpo (**Gráfico II**) y finalmente la tiña de las uñas (Giraldo et. al., 2020).

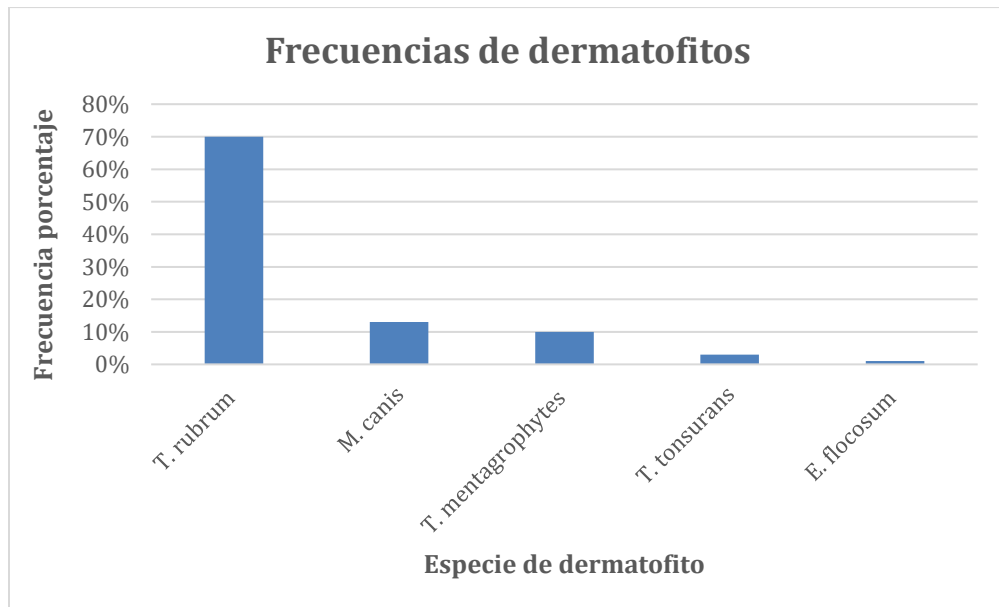


Gráfico I. Frecuencias de los dermatofitos más frecuentes en Latino América y México. Adaptado de los datos reportados en el trabajo de Giraldo et. al. (2020).

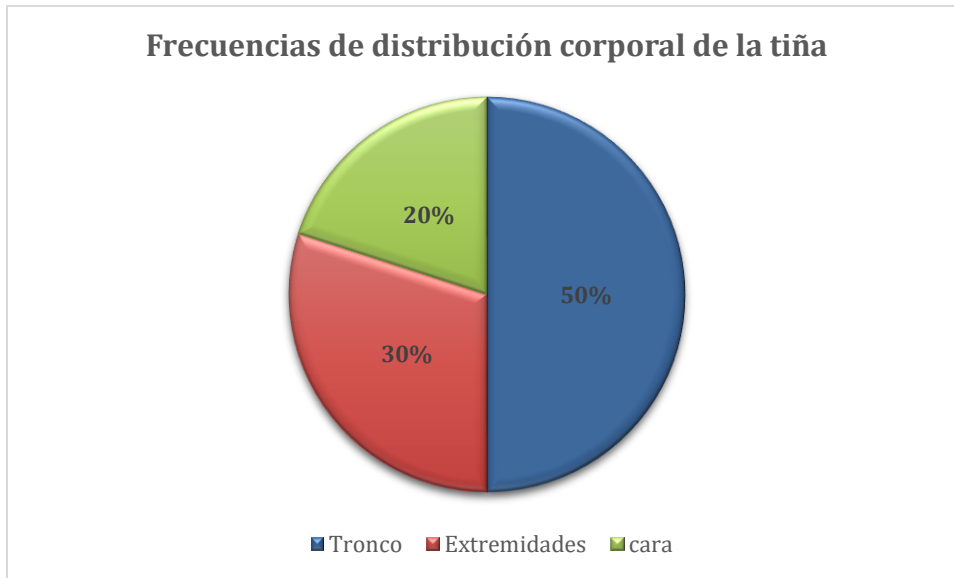


Gráfico III. Frecuencias de acuerdo con la distribución corporal de la tiña. Adaptado de los datos reportados en el trabajo de Giraldo et. al. (2020).

Por otro lado, las micosis invasivas tienen una mayor tasa de morbilidad y mortalidad, debido a eso su detección temprana es crítica (Katragkou et. al., 2017). La población pediátrica en riesgo de una micosis invasiva es amplia por lo que puede ser un gran desafío mantener las estimaciones de la epidemiología para guiar la toma de decisiones clínicas. A pesar de esto se ha reportado que *Candida spp* sigue siendo el principal agente causante de una enfermedad fúngica invasiva, seguida de *Aspergillus spp* y los organismos de la familia de los Mucorales. En los estudios realizados en niños por la Red internacional de Hongos Pediátricos se encontró un predominio de *Candida spp* no *albicans* en pacientes pediátricos (56%) y neonatales (52%), con distribuciones similares de *Candida albicans* y *Candida parapsilosis*, como se ha informado en otros estudios pediátricos realizados en América Latina, Estados Unidos y Europa (Pana et. al., 2017).

Diagnóstico de las micosis

El diagnóstico adecuado de las infecciones fúngicas inicia por las sospechas clínicas, los síntomas y signos de las enfermedades son variados y dependen de los agentes etiológicos, su localización y el estado inmunológico del hospedero. Posterior a la sospecha clínica se deben realizar exámenes de laboratorio que ayuden a establecer el diagnóstico (Tangarife et. al., 2015). De acuerdo con el Grupo Cooperativo de la Organización Europea para la Investigación y el Tratamiento del Cáncer/Infecciones Fúngicas Invasivas y el Grupo de Estudio de Micosis del Instituto Nacional de Alergias y Enfermedades Infecciosas (EORTC/MSG) la necesidad actual para el diagnóstico de infecciones fúngicas requiere de un método microbiológico y/o histopatológico (Terrero et. al., 2020).

El aislamiento adecuado de los agentes causantes de las micosis puede depender de la recolección, el transporte, el procesamiento rápido y correcto de las muestras, de la inoculación en el medio de cultivo y de la temperatura de incubación adecuados. El tipo de muestra para el diagnóstico se elige acuerdo a la sintomatología, el tipo de lesión y la sospecha clínica (Tangarife et. al., 2015). Finalmente, la muestra es sometida a un método convencional o molecular para el diagnóstico de las enfermedades fúngicas.

Los métodos convencionales utilizados son la evaluación microscópica directa de muestras biológicas, pruebas inmunológicas para la identificación de anticuerpos o antígenos, identificación del agente causal mediante cultivo de muestras biológicas; mientras que en los métodos moleculares se encuentra la detección de DNA fúngico por reacción en cadena de la polimerasa, secuenciación de ácidos nucleicos fúngicos y detección de proteínas fúngicas por MALDI-TOF (Terrero et. al., 2020).

MATERIALES Y MÉTODOS

Los materiales fueron proporcionados por el hospital y los métodos para el diagnóstico se llevaron de acuerdo con los protocolos del laboratorio de micología del hospital infantil de México “Federico Gómez”

Toma de la muestra

Escamas dérmicas

Se identificaron las lesiones y posteriormente se llevó a cabo un raspado en la zona dañada con ayuda de un abatelenguas. Las escamas dérmicas obtenidas se recolectaron en una caja Petri estéril.

Escamas de cabeza y cabellos

En el área de la lesión se realizó un raspado dérmico utilizando un abatelenguas, las escamas se recolectaron en una caja Petri estéril. Utilizando unas pinzas estériles se procedió a desprender los cabellos blanquecinos y quebrados que se encontraron en la misma zona y se recolectaron junto con las escamas dérmicas ya tomadas.

Escamas ungueales

Se examinaron las uñas del paciente para identificar las dañadas, con un cubreobjetos se procedió a realizar dos raspados de cada uña dañada. Las escamas obtenidas en el primer raspado fueron recolectadas en una caja Petri y desechadas, las obtenidas en el segundo raspado se colectaron en otra caja Petri y se guardaron para su posterior análisis.

Impronta

Con un abatelenguas se tomó la muestra de la lesión y se traspasó a un portaobjetos, este se guardó para su transporte al laboratorio. Se tomó una segunda muestra mediante un frotis en la lesión con ayuda de una torunda citológica estéril la cual se guardó en tubo con medio de transporte y se trasladó al laboratorio.

Procesamiento de las muestras

Escamas dérmicas, ungueales y cabellos

Inicialmente se le realizó un examen directo, para ello se colocó una gota de KOH 20% en el portaobjetos (bajo condiciones de esterilidad), con ayuda de un asa bacteriológica esterilizada se tomaron las escamas y se suspendieron en la gota de KOH 20%, se le colocó un cubreobjetos, se pasó sobre la flama de, mechero hasta ebullición y se analizó en el microscopio óptico a 40x.

Se procedió a realizar un cultivo en medio Sabouraud y PDA (**Anexo I**) a aquellas muestras donde se observaron estructuras micóticas. Para el cultivo se realizaron 5 picaduras separadas inoculando las escamas o los cabellos, con el objetivo de aislar el microorganismo. Finalmente se hizo una tinción con azul de lactofenol 0.05% (**Anexo II**) para la identificación del hongo.

Improntas

En área de esterilidad se procedió a sacar el portaobjetos donde se encuentra la muestra, se le colocó KOH 20% y un cubreobjetos, se pasó sobre la flama del mechero y se observó en el microscopio óptico a 40X. A las muestras que se le observaron estructuras micóticas se les realizó un cultivo en los medios PDA, Sabouraud, Micosel y/o CHOMAgar Candida (**Anexo I**) mediante la técnica de estría cruzada, a los cultivos que presentaron crecimiento después de una incubación de 24 hrs a 35 °C se les realizó una evaluación macroscópica y microscópica de las colonias.

Medición del índice de galactomanano

Las muestras fueron proporcionadas por el médico, quien previamente en su diagnóstico sospechó de aspergilosis invasiva. Las muestras se procesaron siguiendo las instrucciones del fabricante (**Anexo III**); para ello se preparó un control negativo, uno positivo y dos calibradores; para analizar la muestra se colocaron 300 µl de suero en un microtubo y se le añadieron 100 µl de EDTA, posteriormente se colocaron a baño maría a 100 °C durante 5 min, transcurrido ese tiempo se centrifugó a 12,000 rpm durante 5 min. En el pocillo de la placa se colocaron 50 µl del sobrenadante y 50 µl de conjugado y se incubó a 37 °C durante 90 min. Una vez transcurrido el tiempo se lavaron los pocillos 5 veces y se le colocó 200 µl

de TMB, se incubó otros 30 min en oscuridad a temperatura ambiente. Finalmente se colocaron 100 µl de solución de paro y se leyó en el espectrofotómetro a longitudes de ondas de 450 a 630 nm.

Biopsias

Las muestras del tejido fueron llevadas al laboratorio por un médico, para iniciar su procesamiento se colocó el trozo de tejido en un mortero estéril y se trituró. Se tomaron pedazos del tejido que fueron colocados sobre distintos portaobjetos; posteriormente a uno se le realizó una tinción de Gram, el segundo una tinción de Giemsa, al tercero una tinción de Ziehl-Neelsen (**Anexo II**) y al último un examen directo con KOH. A los que se le observaron estructuras micóticas se les realizó cultivo en medio Sabouraud, Micosel y PDA. Por último, se realizó la identificación del agente fúngico mediante el análisis de la morfología colonial y microscópica.

Orina

La muestra fue proporcionada por los médicos, se tomó 1 ml de muestra y se colocó en un tubo Eppendorf. Se centrifugó la muestra durante 1 min a 12,000 rpm, se desechó el sobrenadante y del precipitado se tomó la muestra y se colocó en el portaobjetos. Se observó la muestra a 40x, a las muestras que se le observaron blastoconidios y/o pseudohifas se les realizó un cultivo en medio Sabouraud o CHROMagar™ Candida para identificar el microorganismo fúngico.

Recolección y análisis de los datos

Durante los 6 meses de estancia se realizó una base de datos donde se recolectaron datos de cada paciente así como el diagnóstico de base y el servicio proveniente, así como el nombre de la probable micosis y el resultado del diagnóstico por laboratorio. Con los datos recolectados se llevó a cabo un análisis estadístico descriptivo y de distribución de frecuencias.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

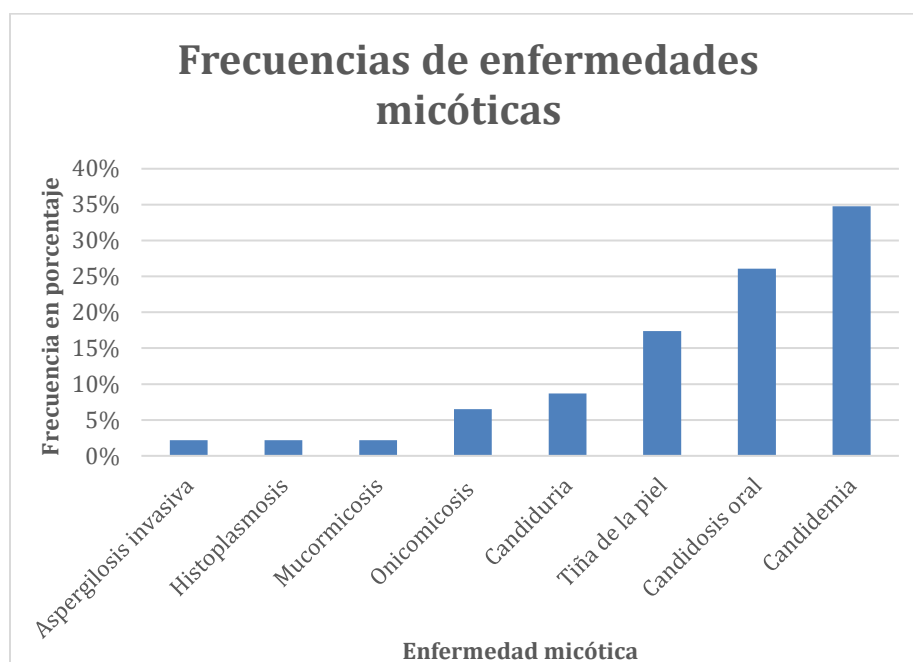
Durante el período de estancia, el número total de pacientes (con sospecha de tener una enfermedad micótica) a los que se les tomaron muestra para su análisis y diagnóstico fue de 142, de estos 46 pacientes presentaron alguna enfermedad fúngica (**Cuadro I**). La incidencia de las enfermedades micóticas que se presentaron en niños y adolescentes del Hospital infantil de México “Federico Gómez” durante el periodo de estancia fue del 32%. Entre las micosis que se diagnosticaron se encontró aspergilosis invasiva, histoplasmosis, mucormicosis, onicomycosis, candiduria, tiña de la piel, candidosis oral y candidemia.

Cuadro III. Total de casos analizados por cada técnica de acuerdo con el tipo de muestra. Nota: las muestras de médula ósea fueron procesadas por el laboratorio de bacteriología y los resultados fueron enviados al laboratorio de micología.

Casos analizados			
Muestra	Casos positivos	Casos negativos	Total, de casos analizados
Escamas dérmicas, ungueales y de cabello	11	27	38
Improntas	12	14	26
Medición del índice de galactomanano	1	15	16
Biopsias	2	10	12
Orina	4	24	28
Médula ósea	16	6	221
Total de casos	46	96	142

Las micosis más presentes en la población estudiada fueron las causada por *Candida sp* (**Gráfica III**), siendo la candidemia la más frecuente (35%, IC 95: 54%-91%), seguida de candidosis oral (26%, IC 95%: 27%-65%) y con menos frecuencia se presentó candiduria (9%, IC 95%: 1.3%-27%). Estos datos son congruentes con estudios epidemiológicos que se han realizado, de acuerdo con Pana et. al (2017) se ha observado que la candidemia está asociada con aumentos en la duración de estancia hospitalaria del paciente siendo así una causa de mortalidad. Dentro de los factores de riesgo para desarrollar candidemia se encuentran trasplantes de órganos, trasplantes de células madre hematopoyéticas, recepción de terapia inmunosupresora, neutropenia, insuficiencia renal, diálisis peritoneal y uso de

nutrición parenteral total (Yılmaz et. al., 2021); los pacientes de este estudio diagnosticados con candidemia presentaban al menos uno de los factores de riesgo.



Gráfica III. Porcentaje de la frecuencia de las micosis diagnosticadas.

Es importante mencionar que, aunque se hicieron cultivos de las muestras, el crecimiento de los agentes micóticos no se produjo en todos los cultivos. De las 22 muestras cultivadas, solo se observó crecimiento en 16 cultivos, en este estudio el agente causal más frecuente fue *C. tropicalis* con un 56% (**Figura I**), posteriormente *C. albicans* con el 31% (**Figura II**) y *C. glabrata* (6%) junto con *C. parapsilosis* (6%).

Diferentes especies de *Candida* se han asociado con varios grados de tropismo tisular, virulencia y susceptibilidad antifúngica (Yılmaz et. al., 2021), es por ello por lo que se debe llevar a cabo un diagnóstico eficaz de la enfermedad, así como la identificación de las especies para un tratamiento adecuado al paciente.



Figura I. Morfología colonial de *C. tropicalis* en CHORMA[®]Agar *Candida*.



Figura II. Morfología colonial de *C. albicans* en CHROMA[®]Agar *Candida*.

Se ha observado un incremento en la incidencia de candidosis debido al uso de antibióticos de amplio espectro, agentes inmunosupresores, dispositivos médicos, cateteres permanentes, aumento del trasplante de órganos sólidos y células hematopoyéticas (Vila et. al., 2020). Estos factores deben ser considerados para poder ofrecer un tratamiento adecuado en el que se disminuyan los factores que ponen en riesgo al paciente y el uso de antimicóticos sea adecuado.

Respecto a la candidosis oral, de los x cultivos de las muestras de los pacientes con sospecha a tener esta enfermedad solamente x cultivos mostraron crecimiento de los cuales los x mostraron el crecimiento de la especie *C. albicans*, siendo así la especie causante del 100% de los casos. Se ha visto que *C. albicans* es el principal agente causal de candidosis oral, presentando hasta el 95% de los casos (Vila et. al. 2020) lo cual concuerda con los datos obtenidos en este trabajo. Aunque *C. albicans* forma parte de la microbiota de la mucosa oral es considerado un agente patógeno con una prioridad crítica por la Organización Mundial de Salud, en la cavidad oral es capaz de causar lesiones en paladar duro y blando, lengua y labios (**Figura III**). A pesar de que *C. albicans* es el principal causante de la candidosis oral, esta también puede ser causada por *C. glabrata*, *C. tropicalis* y *C. krusei* (Rauwnuck et. al. 2022).



Figura III. Caso de candidosis oral. El color verde se debe a la ingesta de alimentos.

Las micosis superficiales ocuparon el segundo lugar, donde la tiña de la piel fue más frecuente (17%, IC 95%: 17.3%-59%) y solamente se presentó el 7% (IC 95%: 0.17%-46%) de casos de onicomicosis. Respecto a las muestras aisladas de tiñas de la piel solo se logró identificar el agente causante de la micosis en un caso (5%) y para los casos de onicomicosis no se logró aislar ni un agente causante. Esto puede deberse a que la toma de la muestra no fue adecuada, las escamas inoculadas no estaban parasitadas o a que el paciente haya comenzado un tratamiento previo a la toma de muestra.

Acorde a Giraldo et. al. (2014) la tiña de la piel es causada frecuentemente por *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *M. canis* y *M. audouinii*. El único hongo que se pudo aislar de una tiña de piel fue *M. gypseum*, el cual, aunque no se encuentra entre los primeros agentes causados de este tipo de micosis es capaz de desarrollar la tiña. Estos microorganismos son capaces de producir lesiones eritematosas, descamativas y pruriginosas (**Figura IV**) lo cual puede ser incómodo para el paciente (Prabakaran et. al., 2021).

Esta micosis puede presentarse a cualquier edad, en la población pediátrica ocupa el segundo lugar de las micosis cutáneas (Giraldo et. al., 2014). Entre los factores de riesgo encontrados en la literatura y que presentaron los pacientes se encuentran la higiene inapropiada, convivencia con animales que portan el microorganismo patógeno y el uso compartido de

ropa y sábanas. Identificar estos factores es importante para que además del tratamiento médico se pueda evitar la exposición del paciente a su fuente de infección.



Figura IV. Tiña de la piel en paciente pediátrico.

Finalmente, las micosis oportunistas que se diagnosticaron en menor frecuencia fueron aspergilosis invasiva y mucormicosis, ambas con solo 1 caso. De igual manera histoplasmosis se diagnosticó solo en un paciente. Como se observa estas micosis son poco frecuentes en los pacientes del Hospital Infantil de México “Federico Gómez”, sin embargo, no se debe descuidar su diagnóstico y tratamiento debido a que *A. fumigatis* se considera un agente de prioridad crítica según la OMS puesto a que puede producir una infección invasiva en el sistema respiratorio y diseminarse a otros órganos, particularmente el sistema nervioso central.

Los mucorales e *Histoplasma spp.* son clasificados por la OMS como agentes de prioridad alta. Los mucorales son un grupo de agentes fúngicos dentro del cual se encuentra *Rhizopus spp.*, *Mucor spp.*, *Lischthemia spp.*, entre otros. En este estudio se logró aislar al agente causante del caso reportado, este fue *Rhizopus orizae* (**Figura V**). La frecuencia de mucormicosis en este hospital es baja, no obstante, se debe tener un diagnóstico rápido y conciso para su pronto tratamiento y/o cirugía debido a que tiene un rango de mortalidad del 72.7% en pacientes pediátricos (OMS) y se ha observado una afección rápida al paciente.

Infectan principalmente a pacientes inmunocomprometidos, pero también a aquellos con diabetes mellitus no controlada, trauma en piel o tejidos; el paciente que presentó mucormicosis contaba con el primer factor de riesgo.

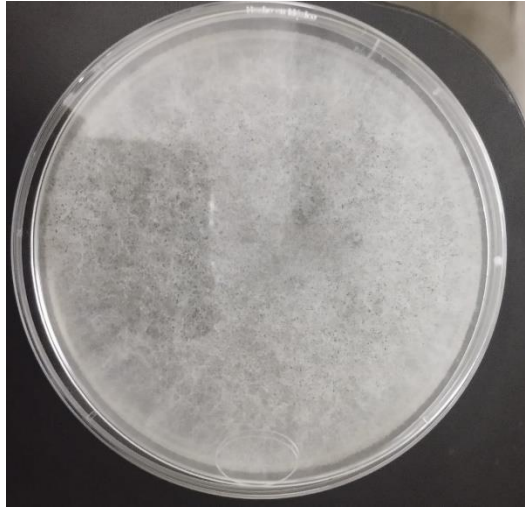


Figura V. Colonias de Rizhopus Orizae en medio de cultivo Sabouraud.

CONCLUSIÓN

En este trabajo se observó que las candidemias fueron la más frecuentes, aunque en la literatura se reportan a las micosis superficiales como las más comunes, esto se debe a los factores de riesgo que presentan los pacientes en este Hospital. Por otro lado, se resalta la importancia de contar con un laboratorio de micología en cada Hospital para que en conjunto con los médicos el diagnóstico de las enfermedades causadas por hongos sea adecuado. Finalmente, se observó que los estudios epidemiológicos de estas enfermedades en el país son escasos y debería trabajarse en ello para determinar de manera concreta la incidencia, prevalencia y frecuencia de las micosis con el objetivo de compartir información y prevenirlas.

ANEXO I. Formulación de los medios de cultivo

Medio de cultivo Agar Dextrosa y Papa (PDA)

Medio de cultivo es utilizado para el cultivo de hongos filamentosos y levaduriformes (MCD Lab), su formulación por litro es la siguiente:

Infusión de papa	200.0 g
Dextrosa	20.0 g
Agar bacteriológico	15.0 g

Para prepararlo se deben pesar y suspender 39 g del medio deshidratado en 1L de agua destilada, posteriormente llevarlo a fuego lento y mantenerlo en constante agitación hasta hervir. Esterilizar el medio en autoclave a 121 °C durante 15 min. Finalmente, se deja enfriar a una temperatura entre 45 a 50 °C, en una zona de trabajo que se mantenga en esterilidad se vierte en placas Petri estériles y cuando solidifique almacenar a una temperatura de 2 a 8 °C.

Medio de cultivo Agar Dextrosa Sabouraud

Medio de cultivo utilizado para cultivar hongos filamentosos y levaduriformes, la presentación de este medio de cultivo deshidratado del laboratorio MCD LAB cuenta con la siguiente formulación por litro:

Dextrosa	40.0 g
Digerido pancreático de caseína	5.0 g
Digerido péptico de tejido de animal	5.0 g
Agar bacteriológico	15.0 g

Su preparación se lleva a cabo pesando 65 g del medio de cultivo y suspenderlo en 1 litro de agua purificada, mezclar y calentar en agitación suave hasta hervir. Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 min y dejar enfriar sin que se solidifique. Vaciar el medio en cajas Petri estériles, dejar solidificar y almacenar.

Medio de cultivo Agar Micosel

Es un medio de cultivo selectivo utilizado para aislar hongos patógenos, el medio de cultivo Agar Micosel Becton Dickinson contiene en su formulación por litro:

Digerido papaico de harina de soja	10.0 g
Dextrosa	10.0 g
Agar bacteriológico	15.5 g
Cicloheximida	0.4 g
Cloranfenicol	0.05 g

Para prepararlo se pesan 36 g del medio de cultivo deshidratado y suspender en 1 litro de agua destilada, mezclar y calentar a fuego. Mantenerlo en constante agitación hasta que llegue a hervir. Esterilizar en la autoclave a 118 °C durante 15 min, dejar enfriar sin que solidifique y vaciar en caja Petri estériles. Almacenar a una temperatura de 2 a 8 °C.

Medio de cultivo CHOMAgar™ Candida

CHOMAgar™ Candida es un medio de cultivo que sirve para el aislamiento y diferenciación de las especies de *Candida* clínicamente significativas, se encuentra formulado de la siguiente manera:

Agar	15.0 g
Peptona	10.2 g
Mezcla cromogénica	22.0 g
Cloranfenicol	0.5 g

Este medio de cultivo es adquirido ya preparado, debe de almacenarse en una temperatura de 15 a 30 °C y tiene una vida útil de 18 meses.

ANEXO II. Fundamento de las tinciones

Tinción de azul de lactofenol

La tinción de azul de lactofenol se utiliza en el área en micología para determinar las estructuras fúngicas con mejor claridad al observarlas al microscopio.

El azul de lactofenol es utilizado debido a que tiene tres funciones: el fenol es capaz de inactivar a las enzimas líticas de las células impidiendo así que se rompan e inactiva a la célula quitándole así el grado de patogenicidad, el ácido láctico preserva las estructuras fúngicas generando una película protectora, el azul de algodón (que es un colorante ácido) tiñe el citoplasma y la quitina presente en las células fúngicas, mientras que el glicerol ayuda a mantener la preparación húmeda (González, R. et. al., 2020).

Tinción de Gram

Esta tinción se basa en las reacciones químicas de los colorantes utilizados con las diferentes composiciones de la pared celular de algunas bacterias. Por medio de esta tinción se pueden dividir a los microorganismos en dos grupos: Gram positivas, las cuales contienen una capa gruesa de peptidoglucano con una gran cantidad de enlaces cruzados de ácido teicoico, y Gram negativas, las cuales cuentan con una capa de peptidoglucano más delgada (González, R. et. al., 2020).

El colorante primario utilizado en esta tinción es el cristal violeta, este penetra y se une a la pared celular bacteriana debido a que tiene afinidad con el peptidoglucano; como mordente se coloca lugol, este reactivo fija el colorante saturando los espacios del peptidoglucano con el complejo cristal-violeta formado. Posteriormente, se utiliza una mezcla de alcohol-cetona que ayuda a deshidratar la pared bacteriana y a solubilizar la membrana externa de aquellas bacterias Gram negativas. Finalmente, como colorante secundario se utiliza safranina que sirve para teñir las bacterias que no fueron capaces de retener el complejo cristal violeta-lugol (González, R. et. al., 2020). Al final de la tinción las bacterias Gram positivas se observan violetas y las bacterias gram negativas se observan color rojo-rosa.

Tinción de Giemsa

La tinción de Giemsa es utilizada principalmente en hematología para teñir muestras de sangre y médula ósea y en histología para teñir biopsias, se basa en la mezcla de colorantes ácidos y básicos para teñir estructuras celulares básicas y ácidas. Esta tinción incluye una combinación de colorantes: el azul y la eosina que son colorantes ácidos y el azul de metileno como colorante básico. El azul de metileno es capaz de teñir las estructuras ácidas como lo son los ácidos nucleicos, mientras que la eosina y el azul tiñen el citoplasma y los gránulos (MACSENLABS, s.f.).

En micología se ocupa esta tinción principalmente para el diagnóstico de histoplasmosis, las muestras utilizadas son lavado broncoalveolar, esputo, biopsia de tejidos, raspados de lesiones en piel y extendidos de médula ósea. Esta tinción permite visualizar blastoconidios

intracelulares en el citoplasma de macrófagos y células fagocíticas del sistema inmunes, los blastoconidios intracelulares se tiñen de manera parcial y aparecen rodeadas de un halo claro (Muñoz, O., 2010).

Tinción de Ziehl-Neelsen

Es una tinción diferencial utilizada para poder identificar aquellas bacterias que son ácido alcohol resistentes (BAAR). La pared de las BAAR se encuentra constituida por peptidoglucano unido a un polímero de ácidos micólicos a través de enlaces covalentes que a su vez se asocian con unidades de galactosa-arabinosa, los ácidos micólicos junto con las arabinosas forman una envoltura hidrófoba que se une a la parte más externa de los lípidos. Además, algunas micobacterias poseen sobre los lípidos glucanos, porinas y lipoarabinomananos lo cual les confiere mayor capacidad hidrofóbica. Es justo la resistencia polar que tienen estas bacterias lo que explica la resistencia ácido alcohol (Corrales, L. et. al., 2019).

El primer colorante utilizado en la tinción de Ziehl-Neelsen es la fucsina fenicada, la cual debe someterse a calentamiento por emisiones de vapor para aumentar la energía cinética de las moléculas del colorante y romper las estructuras cristalinas de las ceras favoreciendo así el ingreso del colorante. Al terminar este proceso, el enfriamiento con agua provoca que se vuelva a solidificar las ceras por lo cual la fucsina fenicada queda dentro de las bacterias. Al agregar el alcohol ácido, aquellas bacterias que son BAAR retendrán el primer colorante observándose de color rosa-rojo; finalmente se agrega el colorante contraste, azul de metileno, el cual teñirá aquellas bacterias que no BAAR y se observan color azul (Corrales, L. et. al., 2019).

ANEXO III. Injerto del Kit Platelia™ Aspergillus Ag BIO-RAD

10- PROCEDIMIENTO

Materiales proporcionados

Ver la sección REACTIVOS

Materiales necesarios pero no suministrados

1. Agua estéril destilada o desionizada, para diluir la solución de lavado.
2. Agua purificada para la reconstitución de los sueros de control.
3. Papel absorbente.
4. Guantes desechables.
5. Gafas protectoras.
6. Hipoclorito sódico (lejía) y bicarbonato sódico.
7. Pipetas o multipipetas ajustables o fijas para medir y aplicar 50 µL, 100 µL, 300 µL y 1000 µL.
8. Tubos de polipropileno para microcentrífuga de 1,5 mL con tapones herméticos que puedan soportar el calentamiento a 120°C (bloques de calor) o 100°C (baño de agua hirviendo).
 - a. Tubos con tapón de rosca: Tubos cónicos de 1,5 mL, N° de catálogo de Bio-Rad 224-0100 o equivalentes.
 - b. Tubos con tapón a presión: Tubos EZ Micro de 1,5 mL, N° de catálogo Bio-Rad 223-9480 o equivalente.
9. Tapones para tubos micro (N° de catálogo VWR 6054001 o equivalentes). Estos cierres sellan a presión los tubos, impidiendo que se abran durante los cambios de temperatura y presión y también permiten sacar más fácilmente los tubos del calentador de bloque o del baño de agua hirviendo.
10. Centrífuga de sobremesa de laboratorio para tubos de polipropileno 1,5mL, capaz de alcanzar 10.000 g.
11. Gradilla flotante para microcentrífuga.
12. Agitador vortex.
13. Bloque de calor. Se recomienda utilizar los siguientes bloques de calor:
 - a. Modelo de 1 bloque: N° de catálogo Grant QBD1 (N° de catálogo VWR # 460-0074)
 - b. Modelo de 2 bloques: N° de catálogo Grant QBD2 (N° de catálogo VWR # 460-0076)
14. Bloque para el bloque de calor: Ambos bloques de calor deben usarse con un bloque de Grant, N° de catálogo QB-E1 (N° de catálogo VWR 460-8517)
15. Baño de agua hirviendo ajustado a 100°C.
16. Incubadora para microplacas a 37 ± 1°C.
17. Sistema de lavado semiautomático o automático para microplacas.
18. Lector de microplacas con filtros de 450 nm y 620 nm.

Observaciones sobre el procedimiento

Para validar los resultados de la prueba se deben analizar en cada tanda un control negativo, un control positivo y los controles del valor umbral.

Tratamiento de los sueros

Todos los sueros de control: negativo (R3), del valor umbral (R4) y positivo (R5) deben procesarse al mismo tiempo que las muestras en estudio:

1. Pipetear 300 µL de cada muestra de suero y cada control en tubos de polipropileno de 1,5 mL.
2. Añadir 100 µL de solución de tratamiento del suero (R7) a cada tubo.
3. Mezclar bien los tubos agitando enérgicamente o usando el vortex. Cerrar bien el tubo para impedir que se abra durante el calentamiento; en caso de los tubos herméticos: usar un cierre para la tapa. No perforar el tapón.

4. Opción de bloque térmico:

Calentar los tubos durante 6 minutos en un bloque de calor a 120°C. Los tubos se deben introducir en el bloque sólo cuando se alcance la temperatura prescrita (*).

O BIEN

Opción de baño maría:

Si se usa el baño de agua hirviendo: calentar los tubos durante 3 minutos a 100°C. (*)

45

5. Extraer con cuidado los tubos calientes del bloque de calor o del agua hirviendo e introducirlos en una centrífuga. Centrifugar los tubos a 10.000 x g durante 10 minutos.
6. El sobrenadante se usa para la detección del antígeno galactomanano.
7. Estudiar los sobrenadantes con el siguiente procedimiento. Después de su preparación, el sobrenadante se puede extraer y almacenar a 2-8°C hasta 48 horas antes del estudio. Si los resultados indican que se debe repetir el análisis, se debe tratar otra alícuota de suero para su estudio.

(*) El cumplimiento estricto con la temperatura y el tiempo de espera prescritos y el uso del material recomendado son esenciales para el éxito del análisis. No se puede confiar en la temperatura que muestran los aparatos, hay que comprobar que cumple con las especificaciones usando un termómetro calibrado que se encajará en un tubo con aceite mineral: dentro del tubo se deben alcanzar los 120°C en el bloque de calor y los 100°C en un baño de agua hirviendo.

Procedimiento de EIA

Cumplir estrictamente con el protocolo propuesto.

Cumplir con las Buenas Prácticas de Laboratorio.

1. Estabilizar los reactivos a temperatura ambiente (18–25°C) al menos durante 15 minutos antes de su uso.
2. Preparar la solución de lavado, la solución de sustrato-cromógeno y los controles negativo, positivo y del punto de corte.
3. Preparar un diagrama para identificar los sueros y controles en estudio en cada microplaca. Usar un pocillo para el suero de control negativo (R3), dos pocillos para el suero de control del valor umbral (R4) y otro para el suero de control positivo (R5).
4. Extraer el soporte de la placa y las tiras de micropocillos (R1) de la bolsa de placas. Las tirillas no usadas deberán volver a la bolsa, con el secante, y se sellará inmediatamente.
5. Mezclar el contenido del frasco de conjugado (R6) invirtiéndolo antes de su uso. Añadir 50 µL de conjugado (R6) a cada pocillo. A continuación, añadir 50 µL del sobrenadante tratado del suero a cada pocillo, como se ha indicado anteriormente. No añadir las muestras de suero a los pocillos antes que el conjugado.
6. Cubrir la placa con su sellador, u otros medios que impidan la evaporación, y comprobar que toda la superficie está cubierta y hermética al agua.
7. Incubar la microplaca en un incubador seco de microplacas durante 90 ± 5 minutos a 37°C (± 1°C).
8. Retirar el sellador de la placa. Aspirar el contenido del pocillo hacia una botella de residuos (que contenga hipoclorito sódico). Lavar la placa 5 veces usando como mínimo 370 µL de la solución de lavado. Después del último lavado, invertir la placa y golpear suavemente sobre papel secante para garantizar que se elimina todo el líquido.
9. Añadir rápidamente 200 µL de la solución de sustrato-cromógeno (R8 + R9) a cada pocillo, evitando la exposición a la luz brillante.
10. Incubar la microplaca en la oscuridad a temperatura ambiente (18 a 25°C) durante 30 ± 5 minutos. **Durante este paso de incubación, no utilizar película adhesiva.**
11. Agregar 100 µl de la solución de parada (R10) a cada pocillo en el mismo orden en que se agregó la solución de sustrato. Mezclar bien.
12. Secar bien la base de la placa.
13. Leer la densidad óptica del cada pocillo a 450 nm (filtro de referencia de 620 nm). Las microplacas deberán leerse en los 30 minutos posteriores a la adición de la solución de parada.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BD. (2015, Octubre). BBL Mycosel Agar. Recuperado el 30 de enero, 2023, de <https://www.bd.com/resource.aspx?idx=22875#:~:text=Mycosel%20Agar%20es%20un%20medio,otros%20hongos%20y%20bacterias1%2C2>.
- CHROMagar (s.f). CHROMAgar™ Candida. Recuperado el 30 de enero, 2024, de <https://www.chromagar.com/es/product/chromagar-candida/>
- Corrales, L. y Caycedo, L. (2019). Principios físicoquímicos de los colorantes utilizados en microbiología. NOVA, 18(33), doi: <https://doi.org/10.22490/24629448.3701>
- Giraldo, A., y Cardona, N. (2014). Micosis cutáneas prevalentes en la infancia. Rev Asoc Colomb Dermatol, 22(3), 211-221.
- González, R., Cuevas, B., Cortes, M. y Sánchez, M. (2020) Las tinciones básicas en el Laboratorio de Microbiología: Un enfoque gráfico. UNAM, FES Zaragoza.
- Katragkou, A., Fisher, B., Groll, A., Roilides, E., y Walsh, T. (2017). Diagnostic Imaging and Invasive Fungal Diseases in Children. Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society, 6, S22-S31, doi: <https://doi.org/10.1093/jpids/pix055>
- MACSENLABS. (s.f). Giemsa Stain Composition Principle, Procedure & Uses. Recuperado el 31 de enero, 2024, de <https://www.macsenlab.com/blog/giemsa-stain-overview/>
- MCD Lab. (s.f). Agar Dextrosa Sabouraud. Recuperado el 30 de enero, 2024, de <https://mcd.com.mx/medios-de-cultivo/19-42-agar-dextrosa-sabouraud.html>
- MCD Lab. (s.f). Agar Dextrosa y Papa. Recuperado el 30 de enero, 2024, de <https://mcd.com.mx/medios-de-cultivo/21-58-agar-dextrosa-y-papa.html>
- Méndez, L., Mejía, J., Manzano, P., Hernández, F., López, R. y González, I. (2016). Frecuencia de micosis invasivas en un hospital mexicano de alta especialidad. Experiencia de 21 años. Rev Med Inst Mex Seguro Soc, 54(5), 581-587.

- Muñoz, C., Cano, L. y González, A. (2010). Detección e identificación de *Histoplasma capsulatum* por el laboratorio: de los métodos convencionales a las pruebas moleculares. *Infectio*, 14(S2), S145-S158.
- Pana, Zoi., Roilides, E., Warris, A., Groll, A. y Zaoutis, T. (2017). Epidemiology of invasive fungal disease in children. *Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society*, 6, S3-S11, doi: <https://doi.org/10.1093/jpids/pix046>
- Prabakaran, K., Kesete, Y., Yohannes, E., Tsehaye, E., Teklezghi, N., Araya, E., y Arefaine, W. 2021. Prevalence and associated risk factors of superficial and cutaneous mycoses among children attending Halibet referral hospital in Asmara, Eritrea. *International Journal of Research in Dermatology*, 7 (2), doi: <https://dx.doi.org/10.18293/issn.2455-4529.IntJResDermatol20210564>
- Ramos, A. (2020). Efectividad de los tratamientos para dermatofitosis en niños. *Dominio de las ciencias*, 6(5), 87-101.
- Rauwnuck, T., Reza, Md., Ahmed, R., Fatteh-UI-Islam, M., Honassain, I., Sultana, N. y Monwar, S. 2021. Prevalence of Oral Candidiasis among Children Caused by Different Candida Species. *Medicine Today*, 34 (01), doi: <https://doi.org/10.3329/medtoday.v34i1.58678>
- Tangarife, V., Flórez, S. y Mesa, A. (2015). Diagnóstico micológico: de los métodos convencionales a los moleculares. *Editora Médica Colombiana*, 21, 211-242.
- Terrero, D. y Powers, F. 2020. Updates in laboratory Diagnostics for Invasive Fungal Infections. *Journal of clinical Microbiology*, 58, doi: <https://doi.org/10.1128/jcm.01487-19>.
- WHO. 2022. WHO fungal priority pathogens list guide research, development and public health action.
- Yılmaz, D., Kara, A., Erbaş, G., Başak, Ü., Karadağ, E., Berna, A., Baran, M., Er, H. y Yılmaz, N. 2021. Epidemiology of Candidemia in Children over 7 Years in a Medical Center in Turkey. *ASM Journals*, 9 (2), doi: <https://doi.org/10.1128/Spectrum.00453-21>

Vila, T., Sultan, A., Montelongo, D., Jabra, M. 2020. Oral Candidiasis: A Disease of Opportunity. *Journal of Fungi*, 6 (1), doi: <https://doi.org/10.3390/jof6010015>