

MANUAL DE TÉCNICAS CONVENCIONALES PARA EL ESTUDIO DE LA ECOLOGÍA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DE HONGOS DE IMPORTANCIA CLÍNICA



CODIGO MNL-R03.3150-001
VERSION 04

INSTITUTO NACIONAL DE SALUD

Enero de 2025

 INSTITUTO NACIONAL DE SALUD	PROCESO INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA	MANUAL DE TÉCNICAS CONVENCIONALES PARA EL ESTUDIO DE LA ECOLOGÍA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DE HONGOS DE IMPORTANCIA CLÍNICA	Versión: 04
		MNL-R03.3150-001	2025-01-17
			Página 2 de 82

TABLA DE CONTENIDO

Pág

1. INTRODUCCIÓN	5
2. OBJETIVO.....	7
3. ALCANCE	7
4. RESPONSABILIDAD.....	7
5. DEFINICIONES Y ABREVIATURAS	7
6. CONDICIONES GENERALES	8
7. FUNDAMENTO	8
8. BUENAS PRACTICAS DE LABORATORIO	8
9. MATERIALES Y REACTIVOS	8
10. EQUIPOS	8
11. DESCRIPCION	8
11.1. Medios y técnicas para identificación de <i>Cryptococcus neoformans</i> y <i>Cryptococcus gattii</i>.....	8
11.1.1. Asimilación de azúcares	8
11.1.1.1. Medio modificado de Wickerham (líquido)	8
11.1.1.2. Medio modificado de Wickerham	9
11.1.1.3. Sistema de identificación de levaduras api 20C AUX	10
11.1.2. Medios para identificación de <i>Cryptococcus neoformans</i> y <i>Cryptococcus gattii</i>	11
11.1.2.1. Medio con ácido caféico	11
11.1.2.2. Medio agar bifenil – semillas para ave (<i>Guizotia abyssinica</i>)	12
11.1.2.3. Medio para determinación de la ureasa (micrométodo)	12
11.1.2.4. Técnica para determinar la presencia de la enzima nitrato-reductasa	13
11.1.2.5. Agar glucosado de Sabouraud	14
11.1.2.6. Medio de canavanina-glicina-azul de bromotimol sódico (C.G.B)	15
11.1.2.7. Asimilación de D-prolina y D-Triptofano	16
11.2. Serotipificación de <i>Cryptococcus neoformans</i> y <i>Cryptococcus gattii</i>.....	16
11.2.1. Serotipificación con técnicas convencionales	16
11.3. Fase sexual: determinación de la pareja sexual de <i>Cryptococcus neoformans in-vitro</i>	20
11.4. Protocolos para estudios fisiológicos	22
11.4.1. Curvas de crecimiento	22
11.4.2. Evaluación del crecimiento a 37 °C	23
11.4.3. Fenotipo de las colonias	23
11.4.4. Tamaño de la cápsula	24
11.4.5. Semicuantificación de la enzima fenol oxidasa	25
11.4.6. Cuantificación de la enzima fenol oxidasa	26
11.4.7. Extracción y cuantificación de melanina	27
11.4.8. Variabilidad entre cepas en medio con Floxina B	28
11.4.9. Determinación de la Floxina B acumulada por la célula	29
11.4.10. Detección de actividad proteolítica extracelular	29
11.4.11. Detección de fosfolipasa extracelular	31
11.4.12. <i>Switching</i> fenotípico en <i>C. neoformans</i>	32
11.4.13. Protocolo de toxinas asesinas “killer”	33

 INSTITUTO NACIONAL DE SALUD	PROCESO INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA	MANUAL DE TÉCNICAS CONVENCIONALES PARA EL ESTUDIO DE LA ECOLOGÍA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DE HONGOS DE IMPORTANCIA CLÍNICA	Versión: 04
		MNL-R03.3150-001	2025-01-17
			Página 3 de 82

11.4.14. Prueba de GCE (green color effect) prueba tamiz para detección de toxinas de aislamientos de <i>C. laurentii</i>	33
11.5. ECOLOGIA	34
11.5.1. Técnica para aislar hongos patógenos del suelo (Histoplasma, coccidioides, Blastomyces, etc.)	34
11.5.2. Técnica para procesamiento de tierras	35
11.5.3. Técnica para el procesamiento de frutos del almendro	36
11.5.4. Técnica de recolección y procesamiento de madera de <i>Eucaliptus</i>	37
11.5.5. Protocolo de inoculación y siembra de muestras de <i>Eucaliptus</i> (Brasil)	37
11.5.6. Técnica y protocolo de infección de almendros	38
11.5.6.1. Preparación del inóculo	38
11.5.6.2. Infección de las hojas	38
11.5.6.3. Infección de la tierra	38
11.5.6.4. Infección de la raíz	39
11.5.6.5. Infección en el tallo	39
11.5.6.6. Procesamiento de los almendros	39
11.5.7. Procesamiento de tallos para hongos endofíticos	39
11.5.8. Protocolo para la determinación de la virulencia de aislamientos de <i>Cryptococcus neoformans</i> en modelos animales	40
11.5.9. Técnica para coloración e identificación de hongos en cortes de tejido vegetal	41
11.5.10. Prueba para determinar actividad de la Ligninasa	41
11.5.11. Medio agar semilla de Eucalipto	41
11.5.12. Medio agar rosa de Bengala – semillas para ave	42
11.5.13. Medio agar Bifenil – semilla de Eucalipto	43
11.5.14. Medio agar rosa de Bengala – semillas de Eucalipto	44
11.5.15. Agar extracto de suelos	45
11.5.16. Agar extracto de <i>Eucalyptus</i>	45
11.5.17. Agar extracto de almendros	45
11.5.18. Troncos de <i>Eucalyptus</i> y almendros	46
11.5.19. Medio de Alfamel	46
11.5.20. Técnicas para el estudio de la interacción entre <i>C. neoformans</i> y amebas de vida libre	46
11.5.20.1. Procesamiento de las muestras de suelos y de excrementos de aves	46
11.5.20.2. Medio xénico (con bacterias) usado en el aislamiento de amebas oportunistas de vida libre	46
11.5.20.3. Inoculación del medio con muestras de suelo	47
11.5.20.4. Aislamiento de amebas de vida libre de muestras ambientales	47
11.5.20.5. Identificación de amebas de vida libre	47
11.6. Otras técnicas	47
11.6.1. Prueba de Benomil	47
11.6.2. Técnica de descontaminación con ácido clorhídrico	49
11.6.3. Conteo de levaduras en cámara de Neubauer	49
11.7. PROTOCOLOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR	50
11.7.1. Extracción de ADN genómico	50
11.7.1.1. Protocolo de extracción con nitrógeno líquido	50
11.7.1.2. Protocolo de extracción con perlas de vidrio	51
10.7.1.3 Protocolo de extracción de ADN para cultivos fúngicos por choque térmico (modificado de	

 INSTITUTO NACIONAL DE SALUD	PROCESO INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA	MANUAL DE TÉCNICAS CONVENCIONALES PARA EL ESTUDIO DE LA ECOLOGÍA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DE HONGOS DE IMPORTANCIA CLÍNICA	Versión: 04
		MNL-R03.3150-001	2025-01-17
			Página 4 de 82

Ferrer C. et al; JCM 2001)	52
11.7.2. PCR – huella digital	53
11.7.3. Visualización de los productos de PCR por electroforesis en gel de agarosa	54
11.7.4. Extracción de ADN de <i>Cryptococcus neoformans</i> y <i>Cryptococcus gattii</i> a partir de muestras de tierras	55
11.7.5. PCR para <i>Cryptococcus neoformans</i> y <i>Cryptococcus gattii</i> a partir de muestras de tierra	57
11.7.6. Amplificación y digestión del Gen Orotidin Monofosfato Pirofosforilasa (OMPasa) llamado también URA5 mediante la técnica de RFLP	57
11.7.7. Ultra Clean DNA Soil	59
11.7.8. Fenol saturado con Tris-EDTA	60
11.7.9. Determinación de la pareja sexual mediante PCR	61
11.7.10. Extracción de ADN de levaduras y hongos filamentosos a partir de cultivos puros (VELGRAKI/MEYER)	63
11.7.11. PCR para identificación de especies de <i>Candida</i>	63
11.7.11.1. Preparación del ADN de los aislamientos	64
11.7.11.2. Preparar mezcla máster y usar para cada reacción	64
11.7.11.3. Condiciones de PCR	64
11.7.11.4. Electroforesis en gel de Agarosa	64
11.7.12. PCR para la detección del gen de la Fosfolipasa B	65
11.7.12.1. Electroforesis en gel de Agarosa	65
11.8. Protocolos para el estudio en modelo animal	65
11.8.1. Preparación del inóculo de <i>Cryptococcus neoformans</i> <i>Cryptococcus o</i> o <i>Cryptococcus gattii</i> para pruebas de virulencia en ratones	65
11.8.2. Inoculación de ratones Balb/C vía intravenosa con <i>Cryptococcus neoformans</i> o <i>Cryptococcus gattii</i>	66
11.8.3. Procesamiento de muestras de órganos a partir de ratones	67
11.8.4. Inmunosupresión de ratones Balb/C con Triamcinolona (KENACORT® – LAB. SQIBB) durante 70 días	68
11.9. Procesamiento de muestras ambientales para el aislamiento de <i>Candida auris</i>	71
11.9.1. Preparación de caldo selectivo sabouraud-dextrosa-salino	71
11.9.2. Protocolo para la toma de muestras ambientales de superficie para el aislamiento de <i>Candida auris</i>	71
11.9.3. Procesamiento de muestras recolectadas en el ambiente hospitalario	72
11.10. PCR convencional para la identificación de <i>Candida auris</i>	73
11.10.1. Cultivo para aislamiento	74
11.10.2. Extracción de ADN	74
11.10.3. Cuantificación del ADN	75
11.10.4. Ajuste del ADN	75
11.10.5. Preparación del máster mix	75
11.10.6. Adición de ADN	76
11.10.7. Amplificación del ADN	76
12. DOCUMENTOS DE REFERENCIA	77
13. CONTROL DE CAMBIOS	78
14. ANEXOS	79
14.1. Anexo 1. Preparación de medios y soluciones	80

 INSTITUTO NACIONAL DE SALUD	PROCESO INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA	MANUAL DE TÉCNICAS CONVENCIONALES PARA EL ESTUDIO DE LA ECOLOGÍA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DE HONGOS DE IMPORTANCIA CLÍNICA	Versión: 04
		MNL-R03.3150-001	2025-01-17
			Página 5 de 82

1. INTRODUCCIÓN

Los hongos oportunistas son miembros habituales de la flora humana normal, pero también se pueden encontrar en la naturaleza como microorganismos saprofitos. Al aparecer deficiencias en la defensa de un individuo, pueden llegar a producir enfermedades que varían en su gravedad, pudiendo asociarse con una infección superficial de la piel o las mucosas hasta llegar a producir una afectación sistémica con compromiso de múltiples órganos internos.

La criptococosis es una micosis sistémica producida por dos complejos de especies de hongos levaduriformes, complejo de especies *Cryptococcus neoformans* o complejo de especies *Cryptococcus gattii*, descubiertos hace aproximadamente cien años por Sanfelice, quien aisló originalmente el microorganismo de un jugo de melocotón. Es una enfermedad de distribución universal que adquiere protagonismo con la aparición de la epidemia del sida. Antes era rara y afectaba a pacientes con alguna enfermedad de base que producía una alteración de la inmunidad celular (neoplasias, lupus eritematoso sistémico, trasplantes de órgano sólido o médula ósea, tratamiento con corticoides u otra medicación inmunosupresora, diabetes, sarcoidosis, etc.). Por el contrario, en los pacientes con sida, es la micosis sistémica más frecuente. Entre el 80-90% de los casos de criptococosis están descritos en este grupo, aunque la incidencia es variable, según la zona. En EEUU, Europa y Australia se observa en un 5-10% de los pacientes, mientras que en Sudamérica y África estos porcentajes aumentan al 10-30%.

Actualmente, el complejo de especies *Cryptococcus neoformans* está compuesto por dos variedades: *C. neoformans* var. *grubii* y *C. neoformans* var. *neoformans* (serotipos A y D) y un híbrido serotipo AD; por su parte, el complejo de especies *C. gattii*, está compuesto por los serotipos B y C. Existen diferencias entre los dos complejos de especies, tanto desde el punto de vista patogénico como de distribución geográfica, de tal forma que *C. neoformans* se ha relacionado con la infección en los pacientes inmunodeprimidos, siendo de distribución mundial, mientras que el *C. gattii* se ha descrito en infecciones de pacientes inmunocompetentes y su distribución está más restringida a países tropicales y subtropicales. También se diferenciaban estas especies por sus características bioquímicas: los tipos B y C, asimilan los ácidos 1-málico, fumárico y succínico, producen pigmento de color verde sobre agar niger, y sobre agar con L-cavanina-glicina-azul de bromotimol, y asimilan la glicina como única fuente de carbono. Los serotipos A y D, por el contrario, no presentan estas reacciones. Existen también diferencias genéticas por hibridación del DNA. La distribución en la naturaleza es asimismo, diferente: los tipos A y D se asocian con las deyecciones de palomas y otros pájaros, mientras que los aislamientos de los complejos *C. gattii* se han encontrado en distintas especies de eucaliptos (*Eucalyptus calmadulensis*, *Eucalyptus rudis*, etc.) y en los koalas de Australia.

La infección se adquiere por inhalación de las levaduras desecadas ($<3 \mu\text{m}$) existentes en la naturaleza. La patogenicidad viene determinada por la cápsula que impide la fagocitosis y la activación del complemento y por la enzima fenil-oxidasa que contribuye al especial neurotropismo del hongo. Cuando el criptococo llega a los alveolos pulmonares se desencadena una respuesta de la inmunidad celular y humoral del huésped, que en condiciones normales es suficiente para controlar la infección. Según los modelos experimentales, la resistencia a la infección parece que depende de la activación de los macrófagos y neutrófilos por los linfocitos más sensibilizados, siendo además necesaria una buena respuesta humoral con anticuerpos opsonizantes. Debido a que los pacientes más susceptibles a la infección por este hongo presentan una alteración de la inmunidad celular o humoral, el microorganismo no es eliminado por los mecanismos de defensa apropiados cuando penetra en las vías respiratorias. Así, progresa hacia el pulmón y se disemina por vía hematógena hasta el sistema nervioso central (SNC), siendo ésta la localización más frecuente, produciendo cuadros de meningitis o meningoencefalitis. Las manifestaciones clínicas variarán en función del tipo de enfermo. La aparición de la enfermedad suele ser aguda en pacientes con sida, en tratamiento con corticoides o que sufren neoplasias hematológicas, mientras que en los restantes suele presentarse de una forma más crónica. La mayoría de los pacientes

 INSTITUTO NACIONAL DE SALUD	PROCESO INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA	MANUAL DE TÉCNICAS CONVENCIONALES PARA EL ESTUDIO DE LA ECOLOGÍA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DE HONGOS DE IMPORTANCIA CLÍNICA	Versión: 04
		MNL-R03.3150-001	2025-01-17
			Página 6 de 82

presenta signos inespecíficos de fiebre, malestar general y cefalea. Los hallazgos físicos tampoco aportan mucho, porque los signos meníngeos son poco frecuentes, al igual que los signos neurológicos focales o las convulsiones. Es importante que el médico mantenga una alta sospecha de esta enfermedad para poder así llegar al diagnóstico.

2. OBJETIVO

Implementar los procedimientos básicos y técnicas de biología molecular para el aislamiento e identificación de aislamientos pertenecientes al complejo de especies *Cryptococcus neoformans* y complejo de especies *Cryptococcus gattii* a partir de muestras clínicas y ambientales y otros hongos de importancia clínica, así como las características fenotípicas y características en modelos animales.

3. ALCANCE

Esta manual aplica para el Grupo de Microbiología, de la Subdirección de Investigación Científica y Tecnológica del Instituto Nacional de Salud, dentro de la línea de investigación en biología molecular en microbiología clínica. Se basa específicamente en los procedimientos empleados para la identificación y análisis fenotípico y genotípico de los miembros de los complejos de especies *Cryptococcus neoformans* *Cryptococcus gattii* y otros hongos de importancia clínica.

4. RESPONSABILIDAD

El responsable por el cumplimiento de lo especificado en el presente manual es el profesional capacitado para la realización de los procedimientos que aquí se describen, bajo la supervisión del líder de micología y/o del coordinador del Grupo de Microbiología. El profesional del área de micología es responsable de conocer el contenido de este documento realizar los diferentes procedimientos, con calidad y oportunidad además de la actualización de este documento.

5. DEFINICIONES Y ABREVIATURAS

- ✓ **API 20CAUX:** la galería API 20 C AUX es un sistema para la identificación precisa de las levaduras que se encuentran más frecuentemente, constituida por 20 cúpulas que contienen substratos deshidratados y permiten efectuar 19 ensayos de asimilación.
- ✓ **ATCC:** American Type Culture Collection.
- ✓ **BSA:** Bovine Seric Albumine (albumina sérica bovina).
- ✓ **CGB:** Canavanina-Glicina- Azul de Bromotimol sódico.
- ✓ **Criptococcosis:** la criptococosis es una micosis sistémica producida por un hongo levaduriforme encapsulado denominado complejo de especies *Cryptococcus neoformans* y complejo de especies *Cryptococcus gattii*, la cual afecta a pacientes inmunosuprimidos e inmunocompetentes.
- ✓ **Fase sexual:** fase teleomórfica reproductiva del *Cryptococcus* que ocurre en la naturaleza.
- ✓ **Inoculación intraperitoneal:** inyección de una sustancia en el peritoneo del animal.
- ✓ **Pareja sexual:** característica de un aislamiento de *Cryptococcus* para el sistema de apareamiento, lo cual lo clasifica como α o Alpha.
- ✓ **PBS:** Phosphate Buffer Saline (buffer fosfato salino).
- ✓ **PFGE:** Pulse Field Gel Electrophoresis (electroforesis en gel de campos pulsados).
- ✓ **RPM:** Revoluciones Por Minuto.
- ✓ **Switching fenotípico:** capacidad de las colonias de *C. neoformans* o *C. gattii* de generar cambios en su apariencia morfológica.
- ✓ **YCB:** Yeast Carbon Base (base carbón levadura).

 INSTITUTO NACIONAL DE SALUD	PROCESO INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA	MANUAL DE TÉCNICAS CONVENCIONALES PARA EL ESTUDIO DE LA ECOLOGÍA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DE HONGOS DE IMPORTANCIA CLÍNICA	Versión: 04
		MNL-R03.3150-001	2025-01-17
			Página 7 de 82

6. CONDICIONES GERERALES

- Leer muy bien el manual antes de iniciar su desarrollo
- Seguir las reglas de bioseguridad establecidas en el laboratorio
- Limpiar el lugar de trabajo antes de iniciar y al terminar
- No modificar los pasos de este manual y en caso de duda consultar al personal capacitado

7. FUNDAMENTO

Nota: cada fundamento aparece con la prueba respectiva

8. BUENAS PRÁCTICAS DE LABORATORIO

Las actividades relacionadas en este manual deberán ser realizadas cumpliendo con las normas de bioseguridad establecidas en Manual de Bioseguridad del Instituto Nacional de Salud MNL-A01.0000-001.

9. MATERIALES Y REACTIVOS

Nota: los materiales y reactivos se especifican en la prueba respectiva.

10. EQUIPOS

Nota: los equipos se especifican en la prueba respectiva.

11. DESCRIPCIÓN

11.1. Medios y técnicas para identificación de *Cryptococcus Neoformans* y *Cryptococcus Gattii*

11.1.1. Asimilación de azúcares

Fundamento: se basa en la capacidad que tiene el microorganismo de utilizar diferentes azucares como fuente de carbono para su crecimiento.

11.1.1.1. Medio modificado de Wickerham (líquido)

Es un medio para la determinación de la asimilación y fermentación de carbohidratos para la identificación de aquellos aislamientos inusuales.

Fórmula:

Medio base

Azul de bromocresol 1,6% en agua destilada	1,25 ml
NaOH 0,1 N	6,25ml
Agua desionizada	562,5 ml

Carbohidratos* exceptuando a la rafinosa** 0,5 g Base nitrogenada de levadura 0,33g

 INSTITUTO NACIONAL DE SALUD	PROCESO INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA	MANUAL DE TÉCNICAS CONVENCIONALES PARA EL ESTUDIO DE LA ECOLOGÍA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DE HONGOS DE IMPORTANCIA CLÍNICA	Versión: 04
		MNL-R03.3150-001	2025-01-17
			Página 8 de 82

Glucosa, maltosa, sacarosa, lactosa, galactosa, melibiosa, celobiosa, inositol, xilosa, rafinosa, trehalosa, dulcitol.

**0,5 g de cada carbohidrato con excepción de la rafinosa que es 1 g

Preparación:

- Medio base: mezclar cada uno de los reactivos del medio base
- Carbohidratos: disolver por agitación (no por calor) cada uno de los carbohidratos en 5 ml de agua destilada
- Carbohidratos más base: agregar a cada carbohidrato completamente disuelto 45 ml del medio base, disolver y distribuir en frascos de 5 ml por frasco y esterilizar en autoclave a 121 °C por 10 minutos
- Almacenar en refrigeración

Técnica:

- Anotar el procedimiento realizado en el respectivo cuaderno de trabajo
- Sembrar en el medio modificado de Wickerham una colonia fresca de *C. neoformans*
- Incubar a 27°C por 72 horas
- Realizar la lectura

Controles:

- *Candida guilliermondii*
- *Candida pseudotropicalis*
- *Cryptococcus neoformans*

Lectura de los controles:

Cepa	Azúcares											
	Gl	Ma	Sa	La	Ga	Me	Ce	In	Xi	Ra	Tr	D
1	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+
2	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-
3	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+

11.1.1.2. Medio modificado de Wickerham

Reactivos:

Medio base

Azul de bromocresol 1,6% en agua destilada	1,25 ml
NaOH 0,1 N	6,25ml
Agar noble	12,50 g
Agua desionizada	562,5 ml

Carbohidratos* exceptuando a la rafinosa** 0,5 g Base nitrogenada de levadura 0,33g

Glucosa, maltosa, sacarosa, lactosa, galactosa, melibiosa, celobiosa, inositol, xilosa, rafinosa, trehalosa, dulcitol

**0,5 g de cada carbohidrato con excepción de la rafinosa que es 1 g

 INSTITUTO NACIONAL DE SALUD	PROCESO INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA	MANUAL DE TECNICAS CONVENCIONALES PARA EL ESTUDIO DE LA ECOLOGÍA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DE HONGOS DE IMPORTANCIA CLÍNICA	Versión: 04
		MNL-R03.3150-001	2025-01-17
			Página 9 de 82

Preparación:

- Medio base: mezclar cada uno de los reactivos del medio base, disolver al calor y dejar enfriar al baño María a 47°C
- Carbohidratos: disolver por agitación (no por calor) cada uno de los carbohidratos en 5 ml de agua destilada
- Carbohidratos más base: agregar a cada carbohidrato completamente disuelto 45 ml del medio base fundido a 47°C, agitar y distribuir en tubos de ensayo, colocando 5 ml por tubo y esterilizar en autoclave a 121°C por 10 minutos. Dejar solidificar en bisel
- Almacenar en refrigeración

Controles:

- *Candida guilliermondii*
- *Candida pseudotropicalis*
- *Cryptococcus neoformans*

Lectura de los controles

Cepa	Azúcares										
	Gl	Ma	Sa	La	Ga	Me	Ce	In	Xi	R a	Tr
1	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
2	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-
3	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+

11.1.1.3. Sistema de identificación de levaduras api 20C AUX

Reactivos:

- Medio sabouraud
- Solución salina
- Galería api 20C AUX
- Cámaras de incubación
- Ampollas de C médium
- Hoja de resultado
- Catálogo analítico

Procedimiento:

- Anotar el procedimiento realizado en el respectivo cuaderno de trabajo
- Realizar un cultivo de la cepa en agar Sabouraud a 27°C por 48 horas
- Realizar una suspensión de la cepa en solución salina al 2 de McFarland (Ver **Anexo 1**)
- Transferir 100 µl de la anterior suspensión a una ampolla de C médium, suministrado por el estuche. Homogenizar con la pipeta, evitando la formación de burbujas
- Crear una atmósfera húmeda adicionando 5 ml de agua destilada en los pozos de la cámara de incubación
- Llenar las cúpulas de los diferentes azúcares con la suspensión obtenida del C médium
- Cerrar la cámara de incubación e incubar durante 48-72 horas a 30°C
- Observar el crecimiento de las levaduras en comparación con la cúpula 0, control negativo
- Una cúpula más turbia que el control negativo indica una reacción positiva, que debe anotarse en la hoja de resultados

- En la hoja de resultados (**Figura 1**), las pruebas están separados en grupos de tres y se indica para cada uno un valor de 1, 2 ó 4. Sumando al interior de cada grupo los números que corresponden a reacciones positivas, se obtienen 7 cifras que constituyen el perfil numérico
- La identificación se hace ubicando el perfil numérico en el catálogo analítico

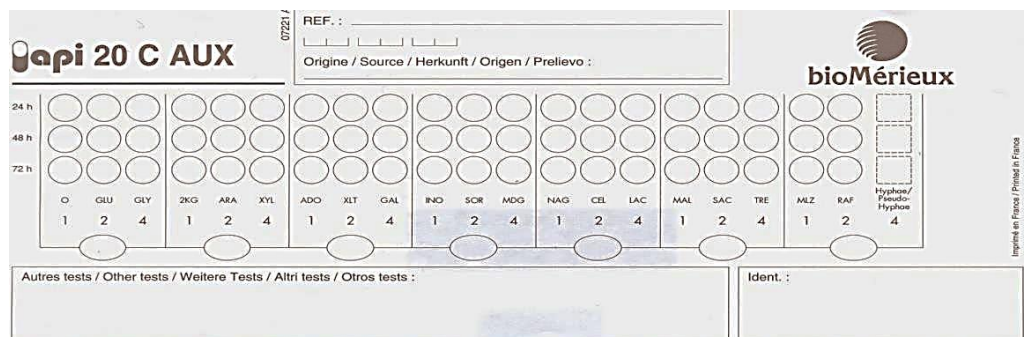


Figura 1. Hoja de resultado

11.1.2. Medios para identificación de *Cryptococcus neoformans* y *Cryptococcus gattii*

11.1.2.1. Medio con ácido cafeico

Fundamento: es útil para el aislamiento selectivo de *C. neoformans* el cual, a diferencia de otras levaduras, crece produciendo un pigmento de melanina de color café oscuro debido a la oxidación de los substratos fenólicos del medio de cultivo por la presencia de la enzima fenoloxidasa que posee el hongo.

Fórmula:

Glucosa	1,00g
Sulfato de amonio	5 g
Extracto de levadura	2 g
Fosfato de potasio	0,80g
Sulfato de magnesio	0,70g
Ácido cafeico	0,18g
Solución de citrato férrico*	4 ml
Agar noble	20 g
Agua destilada	1,00L

Se prepara mezclando 10 mg de citrato férrico en 20 ml de agua

Preparación:

- Disolver al calor y esterilizar en autoclave a 121°C por 15 minutos
- Dejar enfriar y adicionar una solución de antibióticos que contiene 20 U de penicilina, 40 U de estreptomycin por mly 125 mg/ml de cloranfenicol disueltos en etanol
- Servir en cajas de Petri y dejar solidificar
- Conservación: nevera 4°C en oscuridad

 INSTITUTO NACIONAL DE SALUD	PROCESO INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA	MANUAL DE TÉCNICAS CONVENCIONALES PARA EL ESTUDIO DE LA ECOLOGÍA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DE HONGOS DE IMPORTANCIA CLÍNICA	Versión: 04
		MNL-R03.3150-001	2025-01-17
			Página 11 de 82

Control de esterilidad:

Incubar una caja a 37°C durante 24 horas; descartar el lote si observa algún crecimiento

Técnica:

- Anotar el procedimiento realizado en el respectivo cuaderno de trabajo
- Sembrar el aislamiento a evaluar durante 24-48 horas en medio Sabouraud a 27°C
- Realizar la siembra por estría en una caja de agar ácido cafeico
- Incubar a 27°C durante 72 horas con lecturas diarias

Interpretación:

La presencia de la enzima se determina por la aparición de colonias de levaduras pigmentadas de color café oscuro

Controles: Positivo *Cryptococcus neoformans* Negativo *Candida albicans*

11.1.2.2. Medio agar bifeníl – semillas para ave (*Guizotia abyssinica*)

Fundamento: es útil para el aislamiento selectivo de *C. neoformans* el cual, a diferencia de otras levaduras, crece produciendo un pigmento de melanina de color café oscuro debido a la oxidación de los substratos fenólicos del medio de cultivo por la presencia de la enzima fenoloxidasa que posee el hongo.

Fórmula:

Guizotia abyssinica (semilla)	50 g
KH ₂ PO ₄	1 g
Creatinina	1 g
Bacto - agar	15 g
Agua destilada	1 L

Aditivos:

Bifeníl (disuelto en 20 ml de alcohol absoluto) 1 g

Para cada 1000 ml

Amikacina (genérico) 1mg/ml

Cloranfenicol ** 0,04 g/L

** El cloranfenicol se disuelve en alcohol absoluto

Preparación:

- Triturar ó licuar las semillas de *Guizotia abyssinica* en revolución alta por 5 minutos y adicionar a 1000 ml de agua destilada
- Hervir por 30 minutos, filtrar en papel filtro o gasa y ajustar el volumen a 1000 ml Adicionar los componentes restantes
- Esterilizar en autoclave 110 °C por 20 minutos
- Enfriar a 48°C y adicionar la amikacina, el cloranfenicol y el bifeníl
- Mezclar suavemente y servir en cajas de Petri plásticas con un volumen aproximado de 30 ml

11.1.2.3. Medio para determinación de la ureasa (micrométodo)

Fundamento: se emplea para determinar la habilidad de hidrolizar la urea debido a la presencia de la enzima ureasa.

 INSTITUTO NACIONAL DE SALUD	PROCESO INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA	MANUAL DE TECNICAS CONVENCIONALES PARA EL ESTUDIO DE LA ECOLOGÍA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DE HONGOS DE IMPORTANCIA CLÍNICA	Versión: 04
		MNL-R03.3150-001	2025-01-17
			Página 12 de 82

Fórmula:

Urea (Difco)	6,00 g
Extracto de levadura	0,03 g
Rojo de fenol	3,00 mg
KH ₂ PO ₄	0,41 g
Na ₂ HPO ₄	0,43 g
Agua destilada	150,00ml

Preparación: mezclar todos los reactivos y esterilizar por filtración.

Control de esterilidad:

Tomar un tubo del lote preparado, incubarlo a 37°C durante 24 horas. Si observa viraje del medio descartar todos los tubos

Técnica:

- Anotar el procedimiento realizado en el respectivo cuaderno de trabajo
- Realizar una suspensión de la levadura fresca (24-72 horas) en 0,5 ml del medio urea
- Incubar entre 4 a 6 horas a 37°C
- Lectura

Interpretación:

El viraje del indicador a rojo determina la presencia de la enzima ureasa

Controles: Positivo *Cryptococcus neoformans* Negativo *Candida albicans* (ATCC 18804)

11.1.2.4. Técnica para determinar la presencia de la enzima nitrato-reductasa

Fundamento: se emplea para determinar la habilidad de utilizar el nitrato como única fuente de nitrógeno debido a la presencia de la enzima nitrato reductasa, la cual reduce el nitrato a nitrito. Se emplea la prueba rápida descrita por Cooper

Fórmula:

Solución base 5X pH 5,8

KNO ₃	2,00 g
NaH ₂ PO ₄	11,70 g
Na ₂ HPO ₄	1,14 g
Solución de cloruro de zefirán al 17% en agua	1,12 ml
Agua destilada	200,00 ml

Esterilizar en autoclave a 121°C por 15 minutos

* La solución de cloruro de zefirán al 17% en agua se conoce con el nombre de cloruro de benzalconio

Indicadores:

- Alfa naftilamina al 2%
- Ácido sulfanílico al 0,8% en ácido acético 5N

Control de calidad:

Cada una de las soluciones empleadas deben estar totalmente transparentes.

 INSTITUTO NACIONAL DE SALUD	PROCESO INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA	MANUAL DE TÉCNICAS CONVENCIONALES PARA EL ESTUDIO DE LA ECOLOGÍA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DE HONGOS DE IMPORTANCIA CLÍNICA	Versión: 04
		MNL-R03.3150-001	2025-01-17
			Página 13 de 82

Técnica:

- Anotar el procedimiento realizado en el respectivo cuaderno de trabajo
- Sembrar la levadura a identificar en Sabouraud agar inclinado e incubar a 27°C durante 48 horas
- Preparar escobillones estériles para tomar el inóculo de cada una de las levaduras a identificar y marcar cada uno de ellos dentro de un tubo de ensayo estéril
- Humedecer un escobillón con la solución de nitratos
- Frotar el escobillón humedecido sobre las colonias de la levadura, obteniendo buena cantidad de material
- Tapar el tubo y llevarlo a incubar durante 10 minutos a 45°C en un horno
- Revelar la reacción agregando 2 gotas de alfa-naftilmanina al 0,5% y 2 gotas de ácido sulfanílico al 0,8% en ácido acético 5N

Interpretación:

Un color rojo brillante indica la presencia de la enzima.

Controles: Positivo: *Cryptococcus albidus* Negativo: *Cryptococcus neoformans*

11.1.2.5. Agar glucosado de Sabouraud

Fundamento: se emplea para el mantenimiento de la mayoría de los hongos patógenos para el hombre. Se puede obtener comercialmente (DIFCO, BBL, MERCK, OXOID).

Fórmula:

Glucosa	40 g
Peptona*	10 g
Agar	20 g

Solución de cloranfenicol**	0,1 ml
Agua destilada	1 L
Etanol 95%	10 ml
Cloranfenicol	500 mg

* Se pueden emplear varias peptonas: neopeptona, DIFCO, OXOID, BBL, fitona, peptona micológica

** Solución de cloranfenicol

Preparación:

- Mezclar los reactivos y el agua
- Disolver calentando con agitación constante hasta ebullición
- Esterilizar en autoclave a 120 °C por 15 minutos
- Servir en tubos de ensayo o en cajas de Petri o dejar solidificar
- Almacenar en refrigeración

Control de calidad:

- Esterilidad: incubación a 37 °SC por 24 horas
- Color amarillo claro opalescente
- Cultivo de *Candida albicans* a 25-27 °C: buen crecimiento a las 24-48 horas

Nota: se puede preparar caldo Sabouraud (no adicionar agar); el agar glucosado de Sabouraud también es

 INSTITUTO NACIONAL DE SALUD	PROCESO INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA	MANUAL DE TÉCNICAS CONVENCIONALES PARA EL ESTUDIO DE LA ECOLOGÍA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DE HONGOS DE IMPORTANCIA CLÍNICA	Versión: 04
		MNL-R03.3150-001	2025-01-17
			Página 14 de 82

utilizado con glucosa al 2%
Determinación de la variedad

11.1.2.6. Medio de canavanina-glicina-azul de bromotimol sódico (C.G.B)

Fundamento: se emplea como ayuda para la determinación de la variedad de los aislamientos del complejo *C. neoformans*. Se basa en la capacidad que tienen los aislamientos de *C. gattii* de emplear la glicina como fuente de carbono y nitrógeno, y adicionalmente ser resistentes a la canavanina. Cuando los aislamientos de *C. gattii* se siembran en este medio, se obtiene una coloración azul debido a la alcalinización del amonio liberado durante la degradación de la glicina. Esta alcalinización no se produce con los aislamientos de las variedades *grubii* y *neoformans* porque generalmente no pueden asimilar la glicina o son sensibles a la canavanina.

Fórmula:
Solución A

Glicina	10 g
KH ₂ PO ₄	1 g
MgSO ₄	1 g
Tiamina HCl	1 mg
Sulfato de L-canavanina	30 mg
Agua destilada	1000ml

Ajustar pH a 5,6
Se esteriliza por filtración, poro 0,45 µ

Solución B

Azul de bromotimol sódico*	0,4 g
Agua destilada	100,0 ml

*Si el azul de bromotimol no contiene sodio, se agregan: azul de bromotimol (0,4 g), hidróxido de sodio 0,01 N (64 ml) y agua destilada (36 ml)

Preparación:

- Colocar 20 ml de la solución B en un matraz de 2 L, agregar 880 ml de agua destilada y 20 g de agar bacteriológico
- Disolver al calor y esterilizar en autoclave a 121°C por 15 minutos
- Dejar enfriar en baño María a 50°C y agregar 100 ml de solución A
- Distribuir rápidamente en tubos de ensayo (o en cajas de Petri) y dejar solidificar
- Almacenar en refrigeración

Control de calidad:

- Esterilidad: incubación a 37°C por 24 horas
- Aspecto: color amarillo, aspecto opalescente
- Crecimiento: *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* a 25-27°C al cabo de 4 días hay crecimiento y viraje del indicador de amarillo a azul; *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* a 25-27°C, en el mismo tiempo, no crece y cuando lo hace no vira el indicador

 INSTITUTO NACIONAL DE SALUD	PROCESO INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA	MANUAL DE TÉCNICAS CONVENCIONALES PARA EL ESTUDIO DE LA ECOLOGÍA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DE HONGOS DE IMPORTANCIA CLÍNICA	Versión: 04
			2025-01-17
		MNL-R03.3150-001	Página 15 de 82

Técnica:

- Anotar el procedimiento realizado en el respectivo cuaderno de trabajo
- Sembrar en el medio CGB una colonia fresca de *C. neoformans*
- Incubar a 27°C por 72 horas y realizar lecturas cada 24 horas

Interpretación:

El viraje del indicador, azul de bromotimol sódico, de amarillo verdoso a azul permite la identificación de *Cryptococcus gattii*

Controles:

Cryptococcus neoformans var. *grubii* y *neoformans*: negativo

11.1.2.7. Asimilación de D-prolina y D-Triptofano

Fundamento: se emplea como ayuda para la determinación de la variedad teniendo en cuenta que *C. gattii* utiliza la prolina como fuente de nitrógeno mientras que los aislamientos de las variedades *grubii* y *neoformans* no lo hacen.

Técnica:

- Anotar el procedimiento realizado en el respectivo cuaderno de trabajo
- Resembrar los aislamientos en agar Sabouraud durante 24-48 horas
- Hacer una suspensión de la levadura en 4 ml de agua destilada estéril y ajustar la concentración al tubo No. 5 de las escalas de McFarland
- Preparar un agar con base nitrogenada para levaduras y esterilizar por autoclave 15 minutos a 121°C
- Dejar enfriar hasta una temperatura de 47-48°C y agregar 4 ml de la suspensión de la levadura a 20 ml de agar
- Servir el medio en cajas de Petri y colocar los sensidiscos impregnado con el aminoácido sobre el agar, colocando un sensidisco impregnado con glucosa como control positivo
- Las cajas se incuban de 3 a 5 días a 26°C y se observa si hubo o no asimilación

Interpretación:

C. neoformans var. *neoformans* no asimila ninguno de los dos aminoácidos, mientras que *C. gattii* los asimila ambos

11.2. Serotipificación de *Cryptococcus Neoformans* y *Cryptococcus Gattii*

Fundamento: se basa en la identificación de diferencias antigénicas en la cápsula compuesta por polisacáridos, lo cual se refleja en el serotipo del aislamiento.

11.2.1. Serotipificación con técnicas convencionales

Preparación del antígeno A:

La cepa seleccionada para la preparación del antígeno es la H0058-I-1313, donada por la Dra. Kwon-Chung y se sigue el protocolo descrito por ella "comunicación personal".

Materiales:

- Medio agar Sabouraud
- Medio líquido de Sabouraud modificado pH 5,0 Formalina 1%
- Tubos de centrifuga
- Solución salina 0,85% formalinizada 0,5%

 INSTITUTO NACIONAL DE SALUD	PROCESO INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA	MANUAL DE TÉCNICAS CONVENCIONALES PARA EL ESTUDIO DE LA ECOLOGÍA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DE HONGOS DE IMPORTANCIA CLÍNICA	Versión: 04
		MNL-R03.3150-001	2025-01-17
			Página 16 de 82

Técnica:

- Anotar el procedimiento realizado en el respectivo cuaderno de trabajo
- Realizar un cultivo inicial de la cepa en agar Sabouraud a 27°C por 48 horas
- Con el crecimiento obtenido, inocular 1 litro de medio líquido de Sabouraud modificado pH 5,0 e incubar a 25°C por 72 horas, con agitación constante de 180 rpm
- Inactivar las células con formalina al 1% durante toda la noche, en frío (4°C)
- Realizar la prueba de viabilidad en agar Sabouraud por 24 a 48 horas a 27°C
- Recolectar el contenido de cada cultivo en tubos de centrifuga, estériles, concentrar las células por centrifugación a 2000 rpm por 10 minutos
- Descartar el sobrenadante y lavar las células, 3 veces, con solución salina (0,85%) formalinizada 0,5%
- Ajustar la concentración del inóculo, resuspendiendo las células en el mismo PBS 0,01 M formalinizado 0,3% pH 7,4 hasta obtener una turbidez de McFarland No. 8 (ver **Anexo1**)
- Distribuir los inóculos en tubos estériles con volúmenes de 7 ml y almacenar en refrigeración por períodos no mayores de 1 mes (Comunicación personal Dra. Kwon-Chung)

Preparación de los antígenos B, C y D:

Las cepas seleccionadas para la preparación de los antígenos son: H0058-I-1312, H0058-I-1316 y H0058-I-1311, donadas por la Dra. Kwon-Chung y se sigue el protocolo descrito por ella (comunicación personal).

Materiales:

- Medio agar Sabouraud
- Medio sólido de Sabouraud modificado pH 5,0
- Formalina 1%
- Tubos de centrifuga
- PBS 0,85%

Técnica:

- Anotar el procedimiento realizado en el respectivo cuaderno de trabajo
- Realizar un cultivo inicial de cada cepa en agar Sabouraud a 27°C por 48 horas con el crecimiento obtenido se inocula en agar Sabouraud modificado e incubar a 27°C por 72 horas, a 180 rpm
- Inactivar las células con formalina al 1% durante 4 horas a temperatura ambiente
- Realizar la prueba de viabilidad en agar Sabouraud por 24 a 48 horas a 27°C
- Recolectar el contenido de cada cultivo en tubos de centrifuga, estériles, concentrar las células por centrifugación a 2000 rpm por 30 minutos
- Descartar el sobrenadante y lavar las células, 3 veces con PBS 0,85% centrifugando 10 minutos cada vez
- Ajustar la concentración del inóculo, resuspendiendo las células en 5 ml de este PBS 0,85% hasta obtener una turbidez del 2% (la suspensión contiene aproximadamente 2×10^8 cel/ml)
- Distribuir los inóculos en tubos estériles con volúmenes de 3 ml y almacenar en refrigeración por períodos no mayores de 1 mes. (Comunicación personal Dra. Kwon-Chung)

Protocolos de inoculación para el serotipo A:

Para los protocolos de inoculación se utilizan conejos albinos Nueva Zelanda de 2 Kg. de peso. Los animales son tatuados y dejados en observación durante 15 días antes de iniciar las inoculaciones. Son alimentados todo el tiempo con zanahoria, concentrados y cantidad suficiente de agua.

Técnica:

- Anotar el procedimiento realizado en el respectivo cuaderno de trabajo
- Al empezar con el protocolo se debe realizar una sangría preinoculación y el suero se almacena a -20°C
- Antes de cada inoculación, centrifugar el inóculo a 2000 rpm por 5 minutos, y resuspender el

 INSTITUTO NACIONAL DE SALUD	PROCESO INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA	MANUAL DE TÉCNICAS CONVENCIONALES PARA EL ESTUDIO DE LA ECOLOGÍA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DE HONGOS DE IMPORTANCIA CLÍNICA	Versión: 04
		MNL-R03.3150-001	2025-01-17
			Página 17 de 82

volumen de células en solución salina estéril, en volumen igual al original

- La inoculación de 3 ml se hace vía IV en la vena marginal de la oreja según el protocolo descrito por Kwon-Chung (comunicación personal)
- Tanto la sangría previa como la de la 5a. semana se hace recolectando 10 ml de sangre de la vena de la oreja; a partir de la 5a. semana se toman 50 ml de sangre de la vena central de la oreja
- Se deja retraer el coágulo a temperatura ambiente, se centrifuga y se separa el suero el cual se almacena en alícuotas a -4°C. (Comunicación personal Dra. Kwon-Chung)

Protocolos de inoculación para los serotipos B, C y D:

Para los protocolos de inoculación se utilizan conejos albinos Nueva Zelanda de 2 Kg de peso. Los animales son tatuados y dejados en observación durante 15 días antes de iniciar las inoculaciones. Son alimentados todo el tiempo con zanahoria, concentrados y cantidad suficiente de agua.

Técnica:

- Anotar el procedimiento realizado en el respectivo cuaderno de trabajo
- Al empezar con el protocolo se debe realizar una sangría preinoculación y el suero se almacena a -20°C
- Antes de cada inoculación, centrifugar el inóculo a 2000 rpm por 5 minutos, y resuspender el volumen de células en solución salina estéril, en volumen igual al original
- La inoculación de 1 ml se hace vía IV en la vena marginal de la oreja según el protocolo descrito por Kwon-Chung (comunicación personal)
- Tanto la sangría previa como la de la 5a. semana se hace recolectando 10 ml de sangre de la vena de la oreja; a partir de la 5a. semana se toman 50 ml de sangre de la vena central de la oreja (ver **Anexo1**)
- Se deja retraer el coágulo a temperatura ambiente, se centrifuga y se separa el suero el cual se almacena en alícuotas a -4°C. (Comunicación personal Dra. Kwon-Chung)

Prueba de Absorción:

Como antígeno de absorción se emplean las mismas células de *Cryptococcus neoformans* de las cepas 68A, 112B, 18C y 52D con las cuales se habían preparado los antígenos. El procedimiento para su preparación es el mismo protocolo seguido para preparar el inóculo, el cual incluye el cultivo en Sabouraud e inactivación de las células.

Materiales:

- Tubos de centrifuga
- PBS 0,01 M pH7,4

Técnica:

- Anotar el procedimiento realizado en el respectivo cuaderno de trabajo
- Realizar un cultivo inicial de la cepa en agar Sabouraud a 27°C por 48 horas
- Con el crecimiento obtenido, inocular 1 litro de medio líquido de Sabouraud modificado pH 5,0 e incubar a 25°C por 72 horas, con agitación constante de 180 rpm
- Inactivar las células con formalina al 1% durante toda la noche, en frío (4°C)
- Realizar la prueba de viabilidad en agar Sabouraud por 24 a 48 horas a 27°C
- Colocar el contenido de la fiola de 1 litro en tubos de centrifuga estériles y recolectar las células por centrifugación a 2000 rpm por 10 minutos
- Descartar el sobrenadante y lavar el volumen celular tres veces con PBS 0,01 M pH 7.4 formalinizado (ver **Anexo 1**)
- Después del tercer lavado, ajustar la concentración del antígeno al 24% en el mismo buffer
- Colocar alícuotas en tubos de centrifuga estériles, en volúmenes de 4 ml y almacenar en refrigeración

 INSTITUTO NACIONAL DE SALUD	PROCESO INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA	MANUAL DE TÉCNICAS CONVENCIONALES PARA EL ESTUDIO DE LA ECOLOGÍA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DE HONGOS DE IMPORTANCIA CLÍNICA	Versión: 04
		MNL-R03.3150-001	2025-01-17
			Página 18 de 82

Cada suero se absorbe contra las células de los serotipos heterólogos de la siguiente forma:

- Centrifugar el tubo de células contra las cuales se va a absorber, a 2000 rpm, por 10 minutos, descartar el sobrenadante (el volumen de células que queda en el tubo es de aproximadamente 1 ml)
- Colocar, sobre las células, 5 ml del suero a absorber
- Agitar fuertemente en vortex e incubar a 37°C por 30 minutos en agitación
- Centrifugar a 2000 rpm, por 10 minutos
- Con una pipeta Pasteur estéril, extraer el suero en un nuevo tubo estéril
- Colocar 1 ml de PBS 0,01 M pH 7,4, agitar en vortex y centrifugar nuevamente a 2000 rpm, por 10 minutos
- Extraer el sobrenadante y colocar en el tubo en el que se había colocado el suero absorbido
- Titular cada suero así absorbido por aglutinación en lámina, contra el antígeno heterólogo contra el cual se estaba absorbiendo
- Absorber las células contra otro de los serotipos siguientes con el mismo procedimiento

Titulación y almacenamiento de antisueros:

Como antígeno se emplean las mismas levaduras de *Cryptococcus neoformans* de las cepas 68A, 112B, 18C y 52 D; cultivadas en las mismas condiciones empleadas para la preparación del inóculo, inactivadas y llevadas a una concentración final del 2% con buffer de fosfato salino formalinizado 0,01 M pH 7,4.

Técnica:

- Anotar el procedimiento realizado en el respectivo cuaderno de trabajo
- Realizar diluciones sucesivas de cada uno de los antisueros a probar de 1:2 hasta 1:1024 o más si es necesario, incluyendo el sangrado previo, en buffer de fosfato salino 0,01 M pH 7,4 sin formalina y la titulación de los antisueros se realiza mediante la técnica de aglutinación en lámina
- Cada suero se prueba tanto con los antígenos homólogos como con los heterólogos
- Una vez titulados los antisueros, se hacen pooles, mezclando los sueros que tienen títulos iguales y son del mismo serotipo y se almacenan a 4°C

Prueba de aglutinación en lámina para serotipificación:

Se emplea para la detección del polisacárido capsular de *C. neoformans* mediante la aglutinación con anticuerpos policlonales específicos para cada serotipo.

Técnica:

- Anotar el procedimiento realizado en el respectivo cuaderno de trabajo
- Marcar una lámina de vidrio transparente con las letras de cada uno de los serotipos A, B, C y D, al frente de cada una de las columnas y con los números de las cepas a serotipificar al frente de cada una de las filas (**Figura 2**)

	A	B	C	D
Cepa 1				
Cepa 2				
Cepa 3				
Cepa 4				
Cepa 5				
Cepa 6				

Figura 2. Diagrama de serotipificación

- Preparar una suspensión de cada una de las cepas a serotipificar a una concentración del 2% en buffer fosfato salino formalinizado 0,01 M pH 7,4
- Colocar 25 µl de cada una de las suspensiones anteriores, en los cuatro círculos, al frente de la

 INSTITUTO NACIONAL DE SALUD	PROCESO INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA	MANUAL DE TECNICAS CONVENCIONALES PARA EL ESTUDIO DE LA ECOLOGÍA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DE HONGOS DE IMPORTANCIA CLÍNICA	Versión: 04
		MNL-R03.3150-001	2025-01-17
			Página 19 de 82

- marca respectiva en las filas
- Colocar 25 µl del antisuero de *C. neoformans* Serotipo A, previamente titulado en el numeral 4, en todos los círculos localizados al frente de la columna marcada con A
- Repetir el procedimiento anterior con los otros 3 antisueros (B, C y D)
- Mezclar bien con un palillo de madera y agitar por 10 minutos a 160 rpm
- Observar la aparición de una reacción de aglutinación

Nota: la aparición de aglutinación en alguno de los círculos (A, B, C y D) indica el serotipo del *Cryptococcus*.

11.3. Fase sexual: determinación de la pareja sexual de *Cryptococcus Neoformans in-vitro*

Fundamento: se emplea para la determinación *in-vitro* de la pareja sexual de los aislamientos de *Cryptococcus neoformans*.

Material:

- Agar Sabouraud modificado pH 5,0
- Medio de sacarosa, extracto de levadura y biotina SYB
- Medio V8 -1
- Medio V8 -2
- Agar extracto de tierra
- Agar extracto de *Eucalyptus*
- Agar extracto de almendros
- Troncos de *Eucalyptus* y troncos de almendro
- Solución salina estéril (0,85%)
- Micropipetas
- Centrífuga
- Cajas de Petri de 100x15 mm y 35x10 mm
- Tubos

Procedimiento:

- Anotar el procedimiento realizado en el respectivo cuaderno de trabajo
- Realizar un cultivo previo de las cepas control y de los aislamientos a evaluar en agar Sabouraud modificado pH 5,0 a 27°C por 72 horas. Estos últimos se deben aparear con los controles α y β de las variedades respectivas
- Tomar una asada del cultivo y resuspender cada cepa a aparear en 1 ml de solución salina estéril
- Mezclar en un nuevo tubo estéril 150 µl de cada una de las cepas de los aislamientos con 150 µl de las cepas del control respectivo. Agitar suavemente
- Incubar a 27°C por 30 minutos
- Centrifugar a 2000 rpm por 15 minutos
- Descartar el sobrenadante y con una pipeta Pasteur estéril sembrar en forma de X el sedimento en los substratos mencionados anteriormente
- Sellar las cajas con cinta de enmascarar e incubarlas a 27°C durante 1-2 meses
- Observar las cajas cada tres días macroscópicamente y si es necesario microscópicamente

 INSTITUTO NACIONAL DE SALUD	PROCESO INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA	MANUAL DE TÉCNICAS CONVENCIONALES PARA EL ESTUDIO DE LA ECOLOGÍA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DE HONGOS DE IMPORTANCIA CLÍNICA	Versión: 04
		MNL-R03.3150-001	2025-01-17
			Página 20 de 82

Nota:

Para el estudio macroscópico: colocar la caja en un estereoscopio y determinar la presencia de micelios en el borde del cultivo

Para el estudio microscópico: en una gota de nigrosina colocada sobre una lámina coloque una muestra tomada con asa del borde y del centro de la colonia y cubra con una laminilla. La formación de fase sexual se evidencia al observar con el objetivo de 40X la presencia de conexiones en gancho, basidias y/o basidioporas.

Interpretación:

El tipo de pareja sexual del aislamiento se determina de la siguiente manera: si el aislamiento apareja con un control tipo α , es α y viceversa.

Cepas control:

- *C. neoformans* var. *neoformans* B4476 (serotipo D, pareja sexual α)
- *C. neoformans* var. *neoformans*, B4500 (serotipo D, pareja sexual α)
- *C. neoformans* var. *gattii*, serotipo C, NIH 191 (pareja sexual α)
- *C. neoformans* var. *gattii*, serotipo B, NIH 444 (pareja sexual α)

Apareamientos:

Cepas control

A1= B 4476 (α) + B 4500 (α) A2= NIH 191 (α) + NIH 444 (α)

Sabouraud modificado pH 5,0

Neopeptona	1 g
Glucosa	1 g
NaCl	2 g
H ₂ O	100 ml
Agar	2,5 g

Procedimiento:

- Disolver y ajustar el pH a 5 con HCl 1N
- Esterilizar en autoclave a 121°C por 15 minuto

Medios de sacarosa, extracto de levadura, biotina (SYB)

KH ₂ PO ₄	1,0 g	
MgSO ₄	0,5 g	
CaCl ₂	0,1 g	
NaCl	0,1 g	
Biotina	5,0 µg	
Sacarosa	20,0 g	
Extracto de levadura		0,5g
Agar noble	40,0 g	
H ₂ O	1,0 L	

Suplementos:

CuSO ₄ .5H ₂ O	0,1 mg
MnSO ₄ .4H ₂ O	0,04 mg
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,2 mg

 INSTITUTO NACIONAL DE SALUD	PROCESO INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA	MANUAL DE TÉCNICAS CONVENCIONALES PARA EL ESTUDIO DE LA ECOLOGÍA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DE HONGOS DE IMPORTANCIA CLÍNICA	Versión: 04
		MNL-R03.3150-001	2025-01-17
			Página 21 de 82

Procedimiento:

- Disolver al calor, ajustar el pH a 6,8-7,0
- Esterilizar en autoclave a 121°C por 15 minutos

Medio V8-1

Jugo V8 350 ml
 Levadura de cerveza 5 g
 Agar 14 g
 H₂O 340 ml

Procedimiento:

- Disolver la levadura comprimida en el jugo V8, ajustar la mezcla a pH 6,8
- Dejar en baño María por 10 minutos, dejar enfriar y ajustar nuevamente el pH
- Disolver aparte el agar en el agua, dejándolo hervir y agregar luego el jugo V-8
- Esterilizar por autoclave a 121°C por 15 minutos y servir

Medio V8-2

Jugo V8 50 ml
 KH₂PO₄ 0,5 g
 Agar 40 g
 H₂O 1 L

Procedimiento:

- Ajustar el pH a 7,2.
- Esterilizar por autoclave a 121°C por 15 minutos

11.4. Protocolos para estudios fisiológicos

11.4.1. Curvas de crecimiento

Fundamento: se emplea para determinar la tasa de crecimiento de un cultivo fúngico

Materiales:

- Espectrofotómetro
- Agitador
- Incubadora
- Microscopio
- Cámara de Neubauer
- Estereoscopio
- Agar glucosado de Sabouraud
- Caldo glucosado de Sabouraud

Técnica:

- Anotar el procedimiento realizado en el respectivo cuaderno de trabajo
- Sembrar los aislamientos a estudiar por agotamiento en agar Sabouraud durante 48 horas a 27°C
- Resembrar los aislamientos a estudiar (de una sola colonia) durante 48-horas a 27°C (si la cepa se encuentra liofilizada o en agua se deben realizar por lo menos dos resiembras antes de utilizarla)
- Inocular 1 colonia de la cepa a estudiar en 50 ml de caldo Sabouraud glucosado
- Colocar las fiolas en agitación a 180 RPM a 37°C durante toda la noche
- Preparar un inóculo con una concentración de 1x10⁵ células/ml

 INSTITUTO NACIONAL DE SALUD	PROCESO INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA	MANUAL DE TÉCNICAS CONVENCIONALES PARA EL ESTUDIO DE LA ECOLOGÍA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DE HONGOS DE IMPORTANCIA CLÍNICA	Versión: 04
		MNL-R03.3150-001	2025-01-17
			Página 22 de 82

- Inocular 50 ml de caldo Sabouraud glucosado
- Incubar en agitación a 150 RPM a 37°C
- Medir la absorbancia a 600 nm a diferentes tiempos: 0, 24, 30, 35 48, 54, 62 y 72 horas
- Adicionalmente realizar conteo en cámara de Neubauer y confirmarlos con UFC en agar Sabouraud

11.4.2. Evaluación del crecimiento a 37 °C

Fundamento: se emplea para determinar la capacidad que tiene el microorganismo de crecer a temperaturas fisiológicas

Materiales:

- Agar glucosado de Sabouraud
- Solución salina 0,85%
- Asas
- Tubos de Khan
- Caja de Petri de 100 x 15mm
- Incubadora
- Espectrofotómetro

Técnica:

- Anotar el procedimiento realizado en el respectivo cuaderno de trabajo
- Sembrar el aislamiento en tubos de agar glucosado de Sabouraud a 27°C por 48 horas
- Preparar un inóculo a una concentración de 1×10^7 UFC/ml, ajustando el espectrofotómetro a una longitud de onda de 530 nm, para obtener una lectura de 0,272
- Realizar dos diluciones 1:100 para obtener una concentración de 1×10^3 UFC/ml y sembrar 50 μ l enagar Sabouraud, esperando un crecimiento de 50 colonias
- Informar si hubo crecimiento o no de la levadura y realizar el recuento de colonias

Cepa control:

- *C. uniguttulatus* (H0058-3H)
- *C. albicans* (ATCC 18804)

11.4.3. Fenotipo de las colonias

Fundamento: se emplea para determinar la morfología de las colonias de *C. neoformans* en cuanto a tamaño, textura y forma.

Materiales:

- Agar glucosado de Sabouraud
- Solución salina 0,85%
- Asas
- Tubos de Khan
- Cámara de NeuBauer
- Micropipeta 100 μ l
- Microscopio
- Espectrofotómetro
- Incubadora

 INSTITUTO NACIONAL DE SALUD	PROCESO INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA	MANUAL DE TÉCNICAS CONVENCIONALES PARA EL ESTUDIO DE LA ECOLOGÍA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DE HONGOS DE IMPORTANCIA CLÍNICA	Versión: 04
		MNL-R03.3150-001	2025-01-17
			Página 23 de 82

Técnica:

- Anotar el procedimiento realizado en el respectivo cuaderno de trabajo
- Sembrar los aislamientos a estudiar por agotamiento en agar Sabouraud durante 48 horas a 27°C (si la cepa se encuentra liofilizada o en agua, se deben realizar dos resiembras antes de utilizarse)
- Realizar una suspensión de la levadura ajustada a 1×10^7 UFC/ml, leída por espectrofotometría a una longitud de onda de 530 nm, con una lectura de 0,272
- Realizar una dilución 1/10000 a partir de la suspensión anteriormente preparada (1×10^3 UFC/ml)
- Realizar una siembra masiva en agar Sabouraud con 100 µl y 50 µl de la dilución anterior (aprox 100 y 50 UFC)
- Incubar las cajas a 30°C durante 7 días y examinar diariamente el tamaño, la forma y la textura de las colonias

Cepas control:

- *C. neoformans* B-3506 (H0058-I-1320). Colonias que presentan textura mucoide y borde y superficie lisa
- *C. neoformans* (H0058-I580). Colonias que presentan textura no mucoide, superficie y borde y superficie lisos y borde rugoso

Interpretación:

- Tamaño: medido diariamente en mm
- Textura: mucoide o no mucoide
- Forma:
 - S: superficie y margen lisas
 - W: superficie irregular y margen ondulada
 - C: superficie lisa y margen ondulada

11.4.4. Tamaño de la cápsula

Materiales:

- Incubadora
- Microscopio
- Agar glucosado de Sabouraud
- Caldo glucosado Sabouraud

Técnica:

- Anotar el procedimiento realizado en el respectivo cuaderno de trabajo
- Sembrar los aislamientos a estudiar por agotamiento en agar Sabouraud durante 48 horas a 27°C
- Resembrar los aislamientos a estudiar de una sola colonia durante 48 horas a 27°C en agar glucosado de Sabouraud (si la cepa se encuentra liofilizada o en agua se deben realizar por lo menos dos resiembras antes de utilizarla)
- Sembrar los aislamientos en 5 ml caldo Sabouraud glucosado a 30°C en agitación (150RPM) durante 48 horas
- Tomar una gota del caldo y prepare una lámina con tinta china. Contar 20 levaduras con aceite de inmersión (100X)
- El tamaño de la cápsula se mide tomando la distancia del final de la cápsula y la pared celular y el diámetro de la célula (incluyendo la cápsula)

Cepas control:

- *C. neoformans* B-3506 (H0058-I-1320)
- *C. neoformans* (H0058-I-580)
- *C. neoformans* (H0058-I-548)
- *C. neoformans* (H0058-I-737)
- *C. neoformans* (H0058-I-755)

 INSTITUTO NACIONAL DE SALUD	PROCESO INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA	MANUAL DE TECNICAS CONVENCIONALES PARA EL ESTUDIO DE LA ECOLOGÍA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DE HONGOS DE IMPORTANCIA CLÍNICA	Versión: 04
		MNL-R03.3150-001	2025-01-17
			Página 24 de 82

11.4.5. Semicuantificación de la enzima fenol oxidasa

Fundamento: se emplea para determinar la actividad de la enzima fenoloxidasas, la cual actúa sobre los compuestos fenólicos presentes en el medio (L-Dopa) que le sirven como sustrato para la producción de melanina.

Materiales:

- Agar medio mínimo L-Dopa
- Agar glucosado de Sabouraud
- Agua destilada estéril
- Asas
- Cajas de Petri de 100 x 15
- Pipetas de 5 y 1 ml
- Pipeteador
- Puntas de 1-200 µl
- Micropipeta
- Tubos de vidrio tapa rosca
- Incubadora

- Medio mínimo + L-Dopa

Glucosa	15mM	0,54g
MgSO4	10mM	0,24g
KH2PO4	29,4mM	0,8g
Glicina	43mM	0,64g
Tiamina	30mM	0,002g
Agar	1,5%	3g
L-dopa	1,0mM	0,04g

- Agua destilada 200ml
- Disolver al calor y esterilizar en autoclave a 121°C por 15 minutos

Técnica:

- Anotar el procedimiento realizado en el respectivo cuaderno de trabajo
- Sembrar el aislamiento en tubos de agar glucosado de Sabouraud e incubar a 27°C por 48 horas
- Preparar un inóculo a una concentración de 1x10⁷ UFC/ml, ajustando el espectrofotómetro a una longitud de onda de 530 nm, para obtener una lectura de 0,272
- Realizar una dilución 1:1000 para obtener una concentración de 1x10⁴ UFC/ml.
- Tomar 100ml de la dilución y distribuir uniformemente en cajas de agar con medio mínimo + L-Dopa(sembrar cada aislamiento por triplicado)
- Incubar a 30°C por 21 días
- Realizar lectura diaria

Cepas control:

- *C. neoformans* (H0058-I-581). Presenta actividad baja
- *C. neoformans* (H0058-I-755). Presenta actividad alta
- *C. neoformans* (H0058-I- 2257). Presenta actividad baja

Interpretación: Leer la intensidad de melanización de acuerdo con la **Figura 3**.

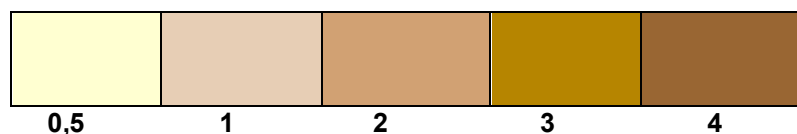


Figura 3. Intensidad de melanización

Rango de interpretación de la actividad enzimática

Enzima	Rango de Actividad			
	Negativo	Bajo	Medio	Alto
<i>Fenoloxidasa</i>	0	0,5 – 1,99	2 – 2,99	3 - 4

11.4.6. Cuantificación de la enzima fenol oxidasasa

Fundamento: se emplea para cuantificar la enzima fenoloxidasa, la cual actúa sobre los compuestos fenólicos presentes en el medio (L-Dopa) que le sirven como sustrato para la producción de melanina.

Materiales:

- Agar glucosado de sabouraud
- Medio mínimo líquido con L-dopa
- Espectofotómetro
- Incubadora
- Tubos falcon 25ml

- Medio mínimo + L-Dopa

Glucosa	15mM	0,54g
MgSO ₄	10mM	0,24g
KH ₂ PO ₄	29,4mM	0,8g
Glicina	43mM	0,64g
Tiamina	30mM	0,002g
L-dopa	1,0mM	0,04g

- Agua destilada 200ml
- Disolver al calor y esterilizar en autoclave a 121°C por 15 minutos

Técnica:

- Anotar el procedimiento realizado en el respectivo cuaderno de trabajo
- Sembrar el aislamiento en agar glucosado de sabouraud por 48 horas
- Inocular una asada del aislamiento en 25ml de L-3,4-dihydroxyfenilalanina (L-dopa) e incubar a 30°C por 16 horas con agitación a 250rpm (realizar el procedimiento por triplicado)
- Incubar nuevamente los cultivos a 25°C por 24 horas con agitación a 250 rpm
- Centrifugar a 3000 rpm por 10 min 1ml del cultivo y determinar la densidad óptica (DO₄₇₅) del sobrenadante.

 INSTITUTO NACIONAL DE SALUD	PROCESO INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA	MANUAL DE TÉCNICAS CONVENCIONALES PARA EL ESTUDIO DE LA ECOLOGÍA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DE HONGOS DE IMPORTANCIA CLÍNICA	Versión: 04
		MNL-R03.3150-001	2025-01-17
			Página 26 de 82

Interpretación: Una unidad de la casa equivale a una densidad óptica a 475nm de 0,001.

11.4.7. Extracción y cuantificación de melanina

Fundamento: se emplea para extraer y cuantificar melanina producida por aislamientos del complejo *C. neoformans* en un medio inductor de pigmentación bajo condiciones alcalinas que permiten la solubilidad de la melanina.

Materiales:

- Agar glucosado de Sabouraud
- Medio mínimo L-dopa
- TN (50 mM Tris (pH 7,5), 10 mM NaN₃)
- TES (50mM Tris (pH 7,5), 20mM EDTA, 10% SDS)
- DMSO
- NaOH
- Melanina Sintética (SIGMA ref. M0418)
- Perlas de vidrio (0,2mm)
- Puntas blancas
- Escala de McFarland
- Agua miliQ
- Agua destilada

Técnica

- Anotar el procedimiento realizado en el respectivo cuaderno de trabajo
- Cultivar las células en cajas de agar Sabouraud e incubar a 27°C por 48 horas
- Realizar una suspensión del aislamiento en agua destilada y ajustarla al patrón 0,5 de la escala de McFarland ($1-5 \times 10^8$)
- Realizar una dilución hasta 10^{-4} en agua destilada
- Tomar 100µl de la dilución y distribuir uniformemente en cajas de petri para cada grupo experimental (En medio inductor de pigmentación 3-4 dihidroxifenilalanina y como control negativo, en medio sin el inductor de pigmentación). Proteger los aislamientos de la luz cubriéndolos con papel aluminio
- Cultivar entre 7 a 21 días o hasta que se observe macroscópicamente la pigmentación
- Recoger las blastoconidias en 1 ml de buffer TN sobre hielo. Ajustar a una absorbancia de 2.1nm (33×10^8 cel/ml)
- Centrifugar, en una centrífuga clínica a 3000 rpm durante 10 min. Aspirar el sobrenadante con pipetas de 10µl
- Resuspender las células en 50 µl de TES y calentar a 98 °C por 3 minutos (baño serológico). Este paso debe ser hecho rápidamente para inactivar proteasas. Las muestras pueden ser almacenadas a -20 °C después de esto
- Agregar 0,2g de perlas de vidrio de 0.2 mm. Agitar vigorosamente con vortex por dos minutos para romper la cápsula con perlas de vidrio
- Adicionar 100 µl de TES, vortex brevemente y calentar a 98 °C por dos minutos
- Centrifugar a 3000 RPM durante 10 minutos a 4°C
- Separar el sedimento del sobrenadante
- Resuspender el sobrenadante en 100mL de NaOH 1N y el sedimento en 200ul NaOH 1N
- Mezclar usando ciclos de 2 minutos en vortex y 2 minutos en hielo por 20 minutos (10 veces), para lograr un buen lisado celular, en condiciones alcalinas
- Diluir los lisados con H₂O miliQ hasta completar 550mL; posteriormente se les adiciona DMSO 10% (55mL) y se incuba por 2 horas a 80° C para lograr la dilución del pigmento
- Centrifugar a 3000 rpm durante 10 minutos a 4° C. Separar el sobrenadante y cuantificar en

 INSTITUTO NACIONAL DE SALUD	PROCESO INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA	MANUAL DE TECNICAS CONVENCIONALES PARA EL ESTUDIO DE LA ECOLOGÍA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DE HONGOS DE IMPORTANCIA CLÍNICA	Versión: 04
		MNL-R03.3150-001	2025-01-17
			Página 27 de 82

espectrofotómetro a 475nm de longitud de onda, usando NaOH 1N como blanco

Blanco grupo experimentación: 100µl NaOH 1N + 450µl H₂O miliQ + 55µl DMS

- Determinar la concentración de melanina realizando una curva de calibración con diluciones seriadas de concentraciones conocidas de melanina

Cálculos: De acuerdo con la curva de calibración previamente estandarizada los valores obtenidos de la regresión de esta son: A=-0.00318 B= 0.00195 (B=m A=b)

La ecuación es: Y= m x + b

Y= absorbancia de la muestra a 475nm

X= Concentración de melanina en µg/ml

Cepas control:

- *C. neoformans* (H0058-I-2257). Presenta actividad baja
- *C. neoformans* (H0058-I-1959). Presenta actividad alta

Este protocolo es una ligera modificación del método empleado en el Laboratorio de Fisiología molecular (INS) para la cuantificación de melanina de melanocitos estandarizado por el doctor Luís Alberto Gómez.

11.4.8. Variabilidad entre cepas en medio con Floxina B

Fundamento: la variabilidad se establece según la coloración de las colonias, que para células vivas es rosada y para células muertas o con membranas disfuncionales se observa una coloración roja. Las colonias que presenten dos tipos de coloración serán consideradas como segregantes.

Materiales:

- Tubos con agar papa dextrosa (PDA)
- Agar YM
- Agar YMPB (agar YM + 10mM de Floxin B (Sigma))
- Tubos de Khan
- Espectrofotómetro
- Incubadora

Agar YM		
Extracto de levadura	1,0%	5 g
Extracto de malta	1,5%	7,5 g
Agar	2,0%	10 g
Agua		500 ml

Procedimiento:

- Ajustar a pH 4,0 con buffer fosfato de citrato
- Disolver al calor y esterilizar en autoclave a 121°C por 15 min

Agar YMPB		
Extracto de levadura	1,0%	5 g
Extracto de malta	1,5%	7,5 g
Floxin B	10 mM	0,0041 g
Agar	2,0%	10 g
Agua		500 ml

 INSTITUTO NACIONAL DE SALUD	PROCESO INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA	MANUAL DE TECNICAS CONVENCIONALES PARA EL ESTUDIO DE LA ECOLOGÍA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DE HONGOS DE IMPORTANCIA CLÍNICA	Versión: 04
		MNL-R03.3150-001	2025-01-17
			Página 28 de 82

Procedimiento:

- Ajustar a pH 4,0 con buffer fosfato de citrato
- Disolver al calor y esterilizar en autoclave a 121°C por 15 min

Técnica:

- Anotar el procedimiento realizado en el respectivo cuaderno de trabajo
- Sembrar el aislamiento en tubos de agar papa dextrosa (PDA) a 24°C durante 72 horas
- Realizar una suspensión del aislamiento en agua destilada estéril y ajustarlo a una concentración de 10^6 cel/ml
- Tomar 10ml de la suspensión y distribuir en cajas de agar YMPB e incubar a 24°C
- Después del quinto día de incubación, observar las colonias diariamente durante un mes

Interpretación: La variabilidad se establecerá según la coloración de las colonias, que pueden ser rosadas o rojas. Las colonias que presenten dos tipos de coloración serán consideradas como segregantes.

11.4.9. Determinación de la Floxina B acumulada por la célula

Materiales:

- Tubos de agar papa dextrosa (PDA)
- Agar YM
- Caldo YMPB
- Escala de McFarland
- Tubos de khan
- Espectrofotómetro
- Incubadora

Técnica

- Anotar el procedimiento realizado en el respectivo cuaderno de trabajo
- Realizar dos pases, a partir de la colonia segregante observada en el medio YMPB, del aislamiento en tubos de agar papa dextrosa (PDA) a 24°C durante 72 horas
- En caldo YMPB inocular 1×10^6 cel/ml e incubarlo con agitación hasta obtener $2,5 \times 10^8$ cel/ml (36horas) en oscuridad
- Recolectar las células por centrifugación (3000rpm por 10minutos)
- Determinar la absorbancia del sobrenadante a 540nm

Interpretación: El valor de absorbancia determina la cantidad de colorante (Floxina B) acumulado por la célula.

11.4.10. Detección de actividad proteolítica extracelular

Fundamento: se determina utilizando el medio carbón base de levadura (YCB) suplementado con albúmina bovina sérica, donde se observa un halo de proteólisis que permite determinar la actividad proteolítica mediante el cálculo del índice PZ (diámetro de la colonia/diámetro de la colonia + halo de proteólisis).

Materiales:

- Agar glucosado de Sabouraud
- Agar YCB suplementado
- Ácido tricloroacético
- Solución de azul de Coomassie (0,1% en solución decolorante)
- Solución decolorante (metanol 40%-ácido acético 10%, en agua destilada)
- Agua destilada
- Micropipeta Puntas de 1-200 µl

 INSTITUTO NACIONAL DE SALUD	PROCESO INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA	MANUAL DE TÉCNICAS CONVENCIONALES PARA EL ESTUDIO DE LA ECOLOGÍA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DE HONGOS DE IMPORTANCIA CLÍNICA	Versión: 04
		MNL-R03.3150-001	2025-01-17
			Página 29 de 82

- Tubos de vidrio de tapa rosca
- Cajas de Petri de 100 x 15mm
- Incubadora
- Regla
- Asas
- Escobillones estériles
- Agar YCB suplementado
- H₂O 160ml
- Agar 1.8% 3,6gr
- Disolver al calor y esterilizar en autoclave a 121°C por 15 minutos
- Dejar enfriar a 50°C y adicionar YCB solución 20ml y BSA+PP solución 20ml

YCB solución

- ✓ YCB (Difco) 11,7% 2,34gr
- ✓ Agua destilada 20ml

Solución albúmina bovina sérica + polipeptona (BSA+PP)

- ✓ BSA Fracción V (sigma) 1% 0,2gr
- ✓ Polipeptona 0,1% 0,02gr

Solución decolorante

Metanol	40%	40ml
Ácido acético	10%	10ml
Agua destilada		50ml

Solución de azul de Coomasie

- ✓ Azul brillante de coomasie 0,1% 0,2g
- ✓ Solución decolorante 200ml

Técnica:

- Anotar el procedimiento realizado en el respectivo cuaderno de trabajo
- Sembrar el aislamiento en agar glucosado de Sabouraud e incubar a 27°C por 72h.
- Realizar una suspensión de aislamiento en agua destilada estéril, y ajustarla al patrón 3 de la escalade McFarland
- Inocular una gota de suspensión (5ml) de la suspensión en el centro de la caja de agar YCB suplementado huevo (dejar secar la suspensión inoculada)
- Incubar a 35-37°C por 10 días
- Marcar por el revés de la caja el diámetro de la colonia con un marcador de tinta indeleble
- Adicionar 5ml de ácido tricloroacético al 10% sobre las cajas de agar y dejar 1 hora en reposo
- Lavar las cajas con agua destilada y remover con un escobillón los restos de la levadura que se encuentran en el agar
- Adicionar sobre el agar, 5ml la solución de azul brillante de Coomasie y dejar en reposo durante 10 minutos
- Decolorar con solución decolorante durante 2 horas y lavar con agua destilada estéril
- Repetir el paso 9, hasta observar un halo transparente alrededor del sitio donde se encontraba inicialmente la levadura
- Leer el diámetro de la colonia (A) y el diámetro de la colonia más el halo de hidrólisis (halo transparente alrededor de la colonia) (B), determinar el valor PZ= A/B

 INSTITUTO NACIONAL DE SALUD	PROCESO INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA	MANUAL DE TÉCNICAS CONVENCIONALES PARA EL ESTUDIO DE LA ECOLOGÍA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DE HONGOS DE IMPORTANCIA CLÍNICA	Versión: 04
		MNL-R03.3150-001	2025-01-17
			Página 30 de 82

Cepas control:

- *C. neoformans* (H0058-I-743). Presenta actividad media
- *C. neoformans* (H0058-I-860). Presenta actividad baja

Interpretación: Valores PZ menores de 1 indican actividad de proteinasas.

Rango de interpretación de la actividad enzimática

Enzima	Negativo	Rango de Actividad		
		Bajo	Medio	Alto
Proteasas	PZ=1	PZ=0,7-0,99	PZ=0,5-0,69	PZ=<0,5

11.4.11. Detección de fosfolipasa extracelular

Fundamento: se determina en agar glucosado de Sabouraud suplementado con yema de huevo, donde se evalúan zonas de precipitación que indican hidrólisis, estas zonas permiten determinar la actividad fosfolipasa mediante el cálculo del índice PZ (diámetro de la colonia/diámetro de la colonia + halo de proteólisis).

Materiales:

- Agar glucosado de Sabouraud + yema de huevo
- Tubos de vidrio de tapa rosca
- Cajas de Petri de 100 x 15mm
- Micropipeta
- Puntas de 1-200 µl
- Incubadora
- Patrón 3 de McFarland
- Regla
- Asas

Agar Sabouraud suplementado con yema de huevo

Glucosa	4%
Peptona	1%
Agar	1,75%
NaCl	1M
CaCl ₂	5mM

Esterilizar en autoclave a 121°C por 15 minutos.

Dejar enfriar a 50°C y adicionar: yema de huevo enriquecida 50% (Difco) para una concentración final 2,5% (50ml/L).

Técnica:

- Anotar el procedimiento realizado en el respectivo cuaderno de trabajo
- Sembrar el aislamiento en tubos de agar glucosado de Sabouraud e incubar a 27°C por 72 horas
- Realizar una suspensión del aislamiento y ajustarla al patrón 3 de la escala de McFarland.
- Inocular una gota (5 µl) de la suspensión en el centro de la caja de agar glucosado de Sabouraud suplementado con yema de huevo (sembrar cada aislamiento por triplicado)
- Dejar secar la suspensión inoculada

 INSTITUTO NACIONAL DE SALUD	PROCESO INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA	MANUAL DE TÉCNICAS CONVENCIONALES PARA EL ESTUDIO DE LA ECOLOGÍA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DE HONGOS DE IMPORTANCIA CLÍNICA	Versión: 04
		MNL-R03.3150-001	2025-01-17
			Página 31 de 82

- Incubar a 37°C por 10 días
- Leer el diámetro de la colonia (A) y el diámetro de la colonia con la zona de precipitado (B), determinar el valor $PZ = A/B$

Cepas control:

- *C. neoformans* (H0058-I-550). Presenta actividad alta
- *C. neoformans* (H0058-I-755). Presenta actividad alta

Interpretación: Valores PZ menores de 1 indican actividad de fosfolipasas.

Rango de interpretación de la actividad enzimática

Enzima	Negativo	Rango de Actividad		
		Bajo	Medio	Alto
Fosfolipasas	PZ=1	PZ=0,7-0,99	PZ=0,5-0,69	PZ=<0,5

11.4.12. Switching fenotípico en *C. Neoformans*

Fundamento: se emplea para determinar la capacidad de las colonias de *C. neoformans* y *C. gattii* de generar cambios en su apariencia morfológica.

Materiales:

- Solución salina
- Tubos de Khan
- Asas
- Micropipetas de 100 µl y 1000 µl
- Espectrofotómetro
- Agar glucosado de Sabouraud
- Perlas de vidrio de 6 mm (Fisher 11-312-D)

Técnica

- Anotar el procedimiento realizado en el respectivo cuaderno de trabajo
- Sembrar por aislamiento las cepas a estudiar en Sabouraud agar durante 48 horas a 27-30°C para obtener una colonia
- Preparar una suspensión del aislamiento a estudiar en solución salina y ajustar a una concentración aproximada de 3×10^7 UFC/ml, ajustándola a una longitud de onda de 530 nm, con una lectura de absorbancia de 0,095
- Realizar una dilución 1:1000 a un volumen final de 20 ml y sembrar 100 µl de la dilución 3×10^4 UFC/ml (300 colonias) en 100 cajas de agar glucosado de Sabouraud, adicionando 4-8 perlas de vidrio por caja y agitar uniformemente 10 veces en diferentes direcciones de forma que las perlas se desplacen por toda la superficie del agar y que los 100 µl queden uniformemente repartidos (es posible colocar 5-6 cajas una sobre otra y agitar o colocar las cajas sobre un agitador orbital)
- Incubar a 27-30°C por 3 días y observar la morfología macroscópica
- Sembrar 100 cajas por cada aislamiento a estudiar

Cepas control:

C. neoformans (H0058-I-1311). Presenta cambios fenotípicos

El switching ocurre con una frecuencia de 1 por 10.000 ó 20.000 colonias

 INSTITUTO NACIONAL DE SALUD	PROCESO INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA	MANUAL DE TECNICAS CONVENCIONALES PARA EL ESTUDIO DE LA ECOLOGÍA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DE HONGOS DE IMPORTANCIA CLÍNICA	Versión: 04
		MNL-R03.3150-001	2025-01-17
			Página 32 de 82

Nota: Las perlas de vidrio pueden ser reutilizadas, una vez se desinfecten con hipoclorito al 10% y se esterilicen autoclave

11.4.13. Protocolo de toxinas asesinas “killer”

Fundamento: se emplea para determinar la inhibición del crecimiento de *C. neoformans* y *C. gattii* producida como resultado de la interacción con las toxinas producidas por diversas especies de levaduras del filo Basidiomycota

Tampón (Fórmula):

Na₂HPO₄ anhidro 2,83 g
 Ácido cítrico monohidratado 2,1 g ó Ácido cítrico dihidratado 19,20 g
 Agua mili Q 100 ml

Medio Killer YEPD (Fórmula):

Extracto de levadura	1%
Agar	2%
Peptona	2%
Glucosa	2%
Azul de metileno	0.003%
Tampón	100 ml

Crecimiento:

- Cepas killer – Una semana en YPGA a 25°C
- Cepas para probar-24-48 h en YPGA a 25°C

Técnica:

- Anotar el procedimiento realizado en el respectivo cuaderno de trabajo
- Realizar una suspensión de la cepa a probar en 1 ml de agua destilada estéril y ajustar al patrón 0,5 de McFarland
- Adicionar la suspensión en una caja de petri de 9 cm
- Adicionar 10 ml de YEPD (45°C). Dejar solidificar
- Sembrar una asada de la levadura killer
- Incubar a 25°C por 3 días

Interpretación:

Leer el halo de inhibición. Halos de inhibición de más de 0.5 mm indican sensibilidad. Al igual que zonas delgadas de menos de 0.5 mm pero con clara inhibición ó zonas azules que indiquen acumulación de azul de metileno en células muertas.

11.4.14. Prueba de GCE (*green color effect*) prueba tamiz para detección de toxinas de aislamientos de *C. Laurentii*

Fundamento: se basa en la capacidad de *C. laurentii* de producir toxinas killer (miocinas) dirigidas contra *C. gattii*, produciendo un efecto de color verde (GCE) en agar semillas de *Guizotia*.

Materiales:

- Incubadora 25°C
- Agar semillas de *Guizotia abyssinica*
- Agar YPGA

 INSTITUTO NACIONAL DE SALUD	PROCESO INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA	MANUAL DE TECNICAS CONVENCIONALES PARA EL ESTUDIO DE LA ECOLOGÍA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DE HONGOS DE IMPORTANCIA CLÍNICA	Versión: 04
		MNL-R03.3150-001	2025-01-17
			Página 33 de 82

Medio YPGA

Extracto de levadura	0,5%
Peptona	1%
Glucosa	2%
Agar	2%

Mezclar todos los reactivos y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Técnica:

- Anotar el procedimiento realizado en el respectivo cuaderno de trabajo
- Sembrar el microorganismo a evaluar en agar YPGA por 7 días
- Realizar una resiembra en cajas de agar semilla de *Guizotia abyssinica*
- Incubar a 25°C durante 5-8 días
- Observar el color de la colonia

Interpretación:

Los aislamientos productores de toxinas toman una coloración verde.

11.5. ECOLOGIA

11.5.1. Técnica para aislar hongos patógenos del suelo (Histoplasma, coccidioides, Blastomyces, etc.)

Materiales:

- Bolsas plásticas
- Espátula
- Balanza
- Tubos cónicos de 100 ml
- Solución salina estéril
- Pipetas
- Centrífuga
- Animales para inocular las muestras: ratones ICR y hámster
- Equipo de disección
- Agar BHI con antibiótico (1000 U de penicilina y 2000 U de estreptomicina)

Técnica:

- Anotar el procedimiento realizado en el respectivo cuaderno de trabajo
- Recoger en bolsas plásticas 500-2500 g de tierra seca, de donde se sospeche que hay microfoco. Los recipientes deben ser lo suficientemente grande para agitar bien la muestra antes de separar los 10 g que se van a procesar. Usar una máscara quirúrgica mientras recoge las muestras: usar un recipiente diferente o una espátula de metal o un bajalenguas para la recolección de cada muestra. Marcarlas de modo que pueda regresar al sitio exacto para recolección si es necesario.

 INSTITUTO NACIONAL DE SALUD	PROCESO INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA	MANUAL DE TÉCNICAS CONVENCIONALES PARA EL ESTUDIO DE LA ECOLOGÍA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DE HONGOS DE IMPORTANCIA CLÍNICA	Versión: 04
		MNL-R03.3150-001	2025-01-17
			Página 34 de 82

- Pesar 10 g de cada muestra agitándolas fuertemente y pasarlas a un recipiente de 100 ml que contenga 75 ml de NaCl 0,85 %, que debe contener 1000 U de penicilina y 2000 U de estreptomicina(u otro antibiótico antibacteriano) en una concentración que mataría las bacterias Gram (+) y Gram (-) pero no a los hongos
- Mezclar la suspensión fuertemente y deje la preparación quieta por 20 minutos. Agitar nuevamente y dejarla quieta por 40 minutos. Los filamentos y las esporas del hongo pesan muy poco. Estas se salen de las partículas del suelo por la agitación y suben a la tapa del recipiente cilíndrico. Los hongos se encuentran a 10 o 20 ml de la parte superior del cilindro. Cuando se centrifuga a una velocidad lenta, bajan únicamente las partículas de la tierra pesada. Cuando el sobrenadante se centrifuga a velocidad alta, los filamentos del hongo y las esporas se concentran en el sedimento
- Pipetear y sacar 10-20 ml del sobrenadante de la suspensión y pasarlo a un tubo cónico. Usar un tubo por cada muestra; centrifugar a 400 o 500 RPM durante 3 minutos
- Usar el sobrenadante para inocular los animales o pasarlo a un segundo tubo cónico y centrifugar a 5000 RPM durante 10 minutos. Descartar el sobrenadante y resuspender el sedimento en 3 ml de solución salina
- Inocular 1ml ya sea vía intraperitoneal ó 0,5 ml en cada testículo cuando es por vía intratesticular a cada uno de los animales (que pesan entre 12 y 14 g)
- Alimentar y dar agua a los animales y observarlos durante 3 meses. Usualmente éstos no mueren, pero si esto ocurre en alguno debe hacerse biopsia y cultivo como se explica abajo
- A los tres meses sacrificar los animales con éter y extraer bazo (cualquier órgano que parezca anormal)
- Macerar los bazos de los animales inoculados con la muestra de tierra agregando suficiente solución salina
- Cultivar en BHI agar con antibiótico y/o agar sangre. Tener mucho cuidado de no inhalar las esporas de los hongos tanto *in vivo* como *in vitro*. En ocasiones tiene que intercambiar su seguridad con el fin de obtener espacio adicional para realizar su trabajo. Ejemplo: tubos de ensayo en vez de cajas de Petri, o viceversa. Si prefiere cajas de Petri, deben contener mucho agar porque éstas se deshidratan en 3 meses de incubación. Inocular a cada caja bastante material. Sellarla con esparadrapo y no abrirla hasta que sea absolutamente necesario, pasar las colonias sospechosas a tubos de Sabourauden cámara de seguridad y usar la máscara si es necesario
- En caso de ser necesario, tomar parte de los órganos para realizar estudios histopatológicos

Tipos de inoculación

Inoculación intraperitoneal:

Inocular 1 ml de la suspensión en cada uno de los animales y observar por 3 meses. Al terminar este tiempo se realiza la autopsia y se procesa el bazo como se describió anteriormente.

Inoculación intratesticular:

Anestesiarse los animales por vía intramuscular antes de iniciar el procedimiento. Inocular 0.5 ml de la suspensión en cada uno de los testículos y observar por 3 meses. Al terminar este tiempo se procesan los testículos como se describió anteriormente.

Estudios histopatológicos:

Colocar fragmentos del órgano en formol tamponado para enviarlos al laboratorio de patología.

11.5.2. Técnica para procesamiento de tierras

Materiales:

- Buffer fosfato salino (PBS) estéril (1X)
- Solución de cloranfenicol (40 g/L, disuelto en alcohol absoluto)
- Agar ácido cafeico

 INSTITUTO NACIONAL DE SALUD	PROCESO INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA	MANUAL DE TECNICAS CONVENCIONALES PARA EL ESTUDIO DE LA ECOLOGÍA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DE HONGOS DE IMPORTANCIA CLÍNICA	Versión: 04
		MNL-R03.3150-001	2025-01-17
			Página 35 de 82

- Agar semillas de *Guizotia abyssinica*
- Tubos falcón de 50 y 15 ml
- Gasa estéril
- Micropipetas
- Puntas estériles
- Embudos

Técnica:

- Anotar el procedimiento realizado en el respectivo cuaderno de trabajo
- Colocar 5 g de la muestra en un tubo Falcón de 50 ml y agregar 25 ml de PBS estéril
- Dejar en reposo durante 30 minutos agitando constantemente
- Filtrar el contenido con ayuda de una gasa a un tubo Falcón de 15 ml
- Adicionar 50 µl de la solución de cloranfenicol y mezclar por inversión
- Sembrar masivamente 100 µl en cada uno de los medios e incube las cajas a 27°C durante 1 mes, observando diariamente
- Las colonias de color café sugestivas de *C. neoformans* y *C. gattii*, se resiembran en agar glucosado de Sabouraud para realizar las pruebas de confirmación

11.5.3. Técnica para el procesamiento de frutos del almendro

Materiales:

- Hipoclorito al 0,4%
- Buffer fosfato salino (PBS) estéril
- Cuchillo
- Martillo
- Agua destilada estéril
- Solución de antibióticos (20 U de penicilina y 40 U de estreptomicina)
- Agar ácido cafeico
- Agar semillas de *Guizotia abyssinica*
- Micropipeta
- Puntas
- Tubos falcón de 15 ml

Técnica:

- Anotar el procedimiento realizado en el respectivo cuaderno de trabajo
- Lavar el fruto del almendro con abundante agua destilada mínimo 3 veces
- Desinfectarlo con 500 ml de la solución de hipoclorito al 0,4% durante 3 minutos
- Lavar nuevamente con abundante agua destilada
- Pelar el fruto con ayuda del cuchillo hasta quedar completamente descubierta la pulpa
- Colocar la pulpa en un tubo Falcón de 15 ml cortada en trozos y agregar 15 ml de PBS estéril y partirla semilla con ayuda del cuchillo y el martillo en varios pedazos hasta llegar a la almendra que se encuentra en el interior de la semilla, colocar los trozos en un tubo Falcón y agregar 15 ml de PBS estéril
- Dejar en reposo los dos tubos durante 30 minutos agitando suavemente cada 5 minutos
- Agregar 50 µl de la solución de antibióticos y mezclar por inversión
- Sembrar masivamente 100 µl en cada uno de los medios e incubar las cajas a 27°C durante 1 mes, observando diariamente
- Las colonias de color café sugestivas de *C. neoformans* y *C. gattii*, se resiembran en agar glucosado de Sabouraud para realizar las pruebas de confirmación

11.5.4. Técnica de recolección y procesamiento de madera de *Eucaliptus*

 INSTITUTO NACIONAL DE SALUD	PROCESO INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA	MANUAL DE TÉCNICAS CONVENCIONALES PARA EL ESTUDIO DE LA ECOLOGÍA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DE HONGOS DE IMPORTANCIA CLÍNICA	Versión: 04
			2025-01-17
		MNL-R03.3150-001	Página 36 de 82

Materiales:

- Bolsa plástica
- Cuchillos
- Asas
- Buffer fosfato salino (PBS) estéril
- Solución de antibiótico (40 U de penicilina y 20 U de estreptomicina)
- Agar ácido cafeico
- Agar semillas de *Guizotia abyssinica*
- Tubos Falcón de 50 y 15 ml
- Gasas
- Micropipeta
- Puntas
- Embudo

Técnica:

- Anotar el procedimiento realizado en el respectivo cuaderno de trabajo
- Recoger en bolsa plástica trozos de madera
- Raspar del interior de la madera con ayuda del cuchillo hasta obtener finos trozos
- Pesar 5 g de la muestra en un tubo Falcón de 50 ml y agregar 25 ml de PBS estéril
- Dejar en reposo durante 30 minutos agitando constantemente
- Filtrar el contenido con ayuda de una gasa a un tubo Falcón de 15 ml
- Adicionar 50 µl de la solución de antibióticos y mezclar por inversión
- Sembrar masivamente 100 µl en cada uno de los medios e incubar las cajas a 27°C durante 1 mes, observando diariamente
- Las colonias de color café sugestivas de *C. neoformans*, se resiembran en agar glucosado de Sabouraud para realizar las pruebas de confirmación

11.5.5. Protocolo de inoculación y siembra de muestras de *Eucalyptus* (Brasil)

Procedimiento:

- Anotar el procedimiento realizado en el respectivo cuaderno de trabajo
- Pesar 5 g de la muestra de *Eucalyptus* y agregar 25 mL de la solución salina 0,85% + 200 mg/mL de cloranfenicol
- Agitar 5 minutos en vórtex y dejar en reposo durante 30 minutos
- Recolectar el sobrenadante

A partir del sobrenadante se van a llevar a cabo dos procedimientos:

Procedimiento 1

- Inocular 1 ml intraperitoneal mente (IP) 4 ratones por muestra
- Dejar en observación por 30 días
- Extraer el bazo y sembrarlo en agar ácido cafeico, agar semillas de *Guizottia* y agarglucosado de Sabouraud más antibióticos
- Observar diariamente los cultivos durante 10 semanas y sacar las colonias de color café, sospechosas de *C. neoformans* o *C. gattii* para realizar las pruebas de identificación

Procedimiento 2

- Sembrar directamente 100 µl del sobrenadante en medios de ácido cafeico, agar semillas de *Guizottia* y agar glucosado de Sabouraud más antibióticos
- Observar diariamente los cultivos durante 10 semanas y sacar las colonias de color café, sospechosas de *C. neoformans* o *C. gattii* para realizar las pruebas de confirmación

 INSTITUTO NACIONAL DE SALUD	PROCESO INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA	MANUAL DE TÉCNICAS CONVENCIONALES PARA EL ESTUDIO DE LA ECOLOGÍA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DE HONGOS DE IMPORTANCIA CLÍNICA	Versión: 04
		MNL-R03.3150-001	2025-01-17
			Página 37 de 82

11.5.6. Técnica y protocolo de infección de almendros

Materiales:

- Incubadora
- Centrifuga
- Agitador
- Agua destilada estéril
- Solución fijadora FAA (ver **Anexo 1**)
- Solución jabonosa
- Solución de *Hoagland* (ver **Anexo 1**)
- Solución de microelementos (ver **Anexo 1**)

11.5.6.1. Preparación del inóculo

Procedimiento:

- Anotar el procedimiento realizado en el respectivo cuaderno de trabajo
- Realizar una siembra masiva de *Cryptococcus gattii* serotipo C a partir de un cultivo fresco (si la cepa se encuentra en agua o liofilizada, deben realizarse dos resiembras antes de utilizar la cepa) en cajas de agar Sabouraud con los aislamientos que se van a utilizar para la infección. Incubar a 27° C durante 24- 48 horas
- Realizar pase a partir de 1 caja de agar Sabouraud a un matraz de 500ml que contenga 100 ml de caldo de Sabouraud. Incubar en agitación a 180 RPM a 30°C durante 24 horas
- Centrifugar el contenido de los matraces a 3500 RPM durante 10 minutos
- Descartar el sobrenadante y resuspender el sedimento en agua destilada estéril
- Repetir el paso 3 y 4 dos veces
- Resuspender las células en agua destilada estéril y contarlas en cámara de Neubauer
- Ajustar el inóculo a la concentración deseada, por ejemplo: 1×10^6 células/ml
- Para confirmar el recuento en cámara, realizar diluciones hasta obtener una concentración de 1×10^2 UFC/ml y siembre masivamente por duplicado 100 µl en cajas de agar Sabouraud e incubar a 27°C durante 72 horas observando diariamente

11.5.6.2. Infección de las hojas

Procedimiento:

- Anotar el procedimiento realizado en el respectivo cuaderno de trabajo
- Tomar 2 ml de la suspensión del inóculo y con ayuda de un escobillón estéril contaminar las hojas de cada uno de los almendros. Este procedimiento se realiza día de por medio durante una semana
- Observar durante 4 meses. Si ocurre algún cambio se procesarán los almendros afectados, como se describe abajo

11.5.6.3. Infección de la tierra

Procedimiento:

- Anotar el procedimiento realizado en el respectivo cuaderno de trabajo
- Agregar a la tierra una cantidad de inóculo necesaria para infectarla
- Dejar en reposo la tierra con el inóculo durante 24 horas con el fin de que la tierra absorba la levadura y posteriormente sembrar los almendros
- Observar durante 4 meses. Si ocurre algún cambio se procesarán los almendros afectados, como se describe abajo

 INSTITUTO NACIONAL DE SALUD	PROCESO INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA	MANUAL DE TÉCNICAS CONVENCIONALES PARA EL ESTUDIO DE LA ECOLOGÍA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DE HONGOS DE IMPORTANCIA CLÍNICA	Versión: 04
		MNL-R03.3150-001	2025-01-17
			Página 38 de 82

11.5.6.4. Infección de la raíz

Para llevar a cabo este experimento se van a probar 2 procedimientos con la tierra, uno con tierra esterilizadas en autoclave durante 30 minutos a 15 libras de presión y suplementada con la solución de Hoagland y otro con tierra normal.

Procedimiento:

- Anotar el procedimiento realizado en el respectivo cuaderno de trabajo
- Colocar 200 ml de la solución del inóculo y sumergir la raíz de cada uno de los almendros con los cuales se va a llevar a cabo el experimento durante 24 horas
- Sembrar cada uno de los almendros en la tierra
- Observar durante 4 meses. Si ocurre algún cambio se procesarán los almendros afectados, como se describe abajo

11.5.6.5. Infección en el tallo

Procedimiento:

- Anotar el procedimiento realizado en el respectivo cuaderno de trabajo
- Realizar una incisión en el tallo de cada uno de los almendros que se van a infectar
- Inocular con micropipeta la cantidad y la concentración deseada del inóculo en la incisión
- Dejar que el tallo este seco y cubrir la incisión con parafina
- Observar diariamente durante 2 semanas y procesar una sola planta de las inoculadas, cualquier cambio que ocurra antes de las 2 semanas debe anotarse y la planta debe procesarse como se indica a continuación. En la semana 4 procesar las plantas restantes del experimento

11.5.6.6. Procesamiento de los almendros

Realizar cortes de 1 cm x 1 cm de las hojas (nervadura central, haz foliar y pecíolo), del tallo (uno para corte longitudinal y otro para corte transversal) y raíz y guárdelos en frascos de vidrio con solución fijadora FAA para posteriores estudios histológicos. El resto del almendro se procesará de la siguiente manera:

Procedimiento:

- Anotar el procedimiento realizado en el respectivo cuaderno de trabajo
- Tomar las hojas, tallo y raíz del almendro afectado y macerarlo con agua destilada estéril.
- Sembrar masivamente 100 µl del extracto obtenido de cada una de las partes del almendro en agar ácido cafeico y agar semillas de *Guizotia*
- Incubar las cajas a 27°C durante 1 mes
- Observar las cajas diariamente y si encuentra colonias de color café sugestivas de *C. neoformans* o *C. gattii*, sacarlas con el fin de realizarles las pruebas de identificación

11.5.7. Procesamiento de tallos para hongos endofíticos

El tallo debe ser cortado en fragmentos y la corteza de estos debe ser desinfectada para evitar la presencia de hongos y bacterias contaminantes en el cultivo.

Desinfección de tallos:

Procedimiento:

- Lavar con cepillo y jabón los tallos y enjuagar con abundante agua destilada. Si el tejido es muy frágil lavar solamente con agua para evitar que el jabón penetre en el tejido vegetal interno o, introducir el fragmento del tallo en alcohol antiséptico ó hipoclorito de sodio por 1 minuto
- Introducir el fragmento del tallo en agua destilada estéril por 1 minuto

 INSTITUTO NACIONAL DE SALUD	PROCESO INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA	MANUAL DE TÉCNICAS CONVENCIONALES PARA EL ESTUDIO DE LA ECOLOGÍA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DE HONGOS DE IMPORTANCIA CLÍNICA	Versión: 04
		MNL-R03.3150-001	2025-01-17
			Página 39 de 82

- Secar completamente el fragmento de tallo con papel absorbente estéril
- Cortar los extremos del tronco con una cuchilla estéril
- Remover la corteza con ayuda de la cuchilla

Cultivo de fragmentos de tallo:

Procedimiento:

- Cortar con una cuchilla estéril en forma tangencial ó transversal
- Colocar los fragmentos sobre el agar colocando la parte interna en contacto con el agar o la parte externa (Es posible alternar estos dos tipos de siembra, y observar en cual hay mayor recuperación de hongos)
- Sembrar en medios específicos para el hongo u hongos que se deseen recuperar, pero este medio debe contener cloranfenicol 0,25 –0,5 g/l

11.5.8. Protocolo para la determinación de la virulencia de aislamientos de *Cryptococcus Neoformans* en modelos animales

Materiales:

- Ratones BALB/c de 6 a 7 semanas
- Cámara de Neubauer
- Jeringa de 1 ml con aguja de 26"
- Jeringa de 1 ml con aguja de 28"
- Equipo de disección
- Agar glucosado de Sabouraud
- Caldo glucosado de Sabouraud
- Agar ácido caféico
- Agar semillas de Guizottia
- Solución salina estéril
- Aislamientos a estudiar

Técnica:

- Anotar el procedimiento realizado en el respectivo cuaderno de trabajo
- Resembrar las cepas en agar Sabouraud durante 48 horas a 27°C (si la cepa se encuentra liofilizada o en agua se deben realizar por lo menos dos resiembras antes de utilizarla)
- Realizar un pase a partir de 1 caja de agar Sabouraud a un matraz de 500ml que contenga 100 ml de caldo de Sabouraud. Colocar los matraces en agitación a 180 RPM a 30°C durante 24 horas
- Centrifugar el contenido de los matraces a 3500 RPM durante 10 minutos
- Descartar el sobrenadante y Re suspender el sedimento en solución salina estéril
- Repetir el paso 3 y 4 dos veces
- Resuspender las células en agua destilada estéril y realizar recuento en cámara de Neubauer
- Ajustar el inóculo a una concentración de 1×10^6 células en solución salina
- Para confirmar el recuento en cámara, realizar diluciones hasta obtener una concentración de 1×10^2 UFC/ml y sembrar por duplicado 100 µl en cajas de agar Sabouraud e incubar a 27°C durante 72 horas observando diariamente
- Dependiendo del protocolo se inocula vía intravenosa con 0,2 ml y con aguja de 28" y vía intraperitoneal con 1 ml con aguja de 28"
- Observar por 30 días y registrar el número de muertes día a día
- A los 30 días sacrificar los animales que no hayan muerto y extraer bazo y cerebro

 INSTITUTO NACIONAL DE SALUD	PROCESO INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA	MANUAL DE TECNICAS CONVENCIONALES PARA EL ESTUDIO DE LA ECOLOGÍA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DE HONGOS DE IMPORTANCIA CLÍNICA	Versión: 04
		MNL-R03.3150-001	2025-01-17
			Página 40 de 82

Extracción y procesamiento de órganos:

Procedimiento:

- Con ayuda de unas pinzas y tijeras cortar la piel longitudinalmente separándola de los órganos
- Cortar los órganos con las tijeras en trozos finos y sembrarlos masivamente en medios de agar ácidocafeico y agar semillas de *Guizotia*
- Observar las cajas diariamente y aislar las colonias de color café sospechosas de *C. neoformans* o *C. gatti* y realizar las pruebas de confirmación

11.5.9. Técnica para coloración e identificación de hongos en cortes de tejido vegetal

Procedimiento:

- Anotar el procedimiento realizado en el respectivo cuaderno de trabajo
- Realizar cortes superficiales de aproximadamente 1 x 0,3 cm, en forma tangencial a hojas y tallos
- Clarificar estos cortes poniéndolos en ebullición en lactofenol - etanol (1:2 V/V) durante 10 a 15 minutos
- Dejar en reposo toda la noche a temperatura ambiente
- Teñir una parte de los segmentos clarificados en azul de tripán en lactofenol 0,05% durante 45 minutos en estufa a 60°C
- Teñir el resto de los cortes con fucsina ácida-verde de malaquita y flamear o dejar en reposo 24 horas
- Eliminar el exceso de colorante pasando los segmentos por lactofenol
- Observar directamente al microscopio

11.5.10. Prueba para determinar actividad de la Ligninasa

La celulosa esta químicamente unida a la lignina en plantas y esta a su vez es el segundo polímero natural más abundante. En efecto, los dos polímeros se pueden considerar como un complejo de lignocelulosa. La lignina protege a la celulosa del ataque enzimático y es la mayor barrera a la utilización de la celulosa en los procesos biotecnológicos. Por lo tanto, es importante poder detectar la actividad ligninolítica. La actividad de la ligninasa se restringe a un cierto número de hongos, y a menudo se encuentra en basidiomicetes, particularmente los hongos blancos que causan decaimiento. También se encuentra en ciertas bacterias.

Esta prueba se basa en la biodegradación de un colorante polimérico empleado como sustituto de la lignina

Técnica:

- Inocular el medio de lignina con un único inóculo central
- Incubar las placas a 25°C y buscar zonas claras en el medio

11.5.11. Medio agar semilla de Eucalipto

Es útil para el aislamiento selectivo de *C. neoformans* el cual, a diferencia de otras levaduras, oxida los substratos fenólicos del medio de cultivo gracias a la presencia de la enzima fenoloxidasa, produciendo el pigmento melanina de color café oscuro.

Fórmula:

<i>Eucalyptus camaldulensis</i> (semilla)	50 g
Glucosa	1 g
KH ₂ PO ₄	1 g
Creatinina	1 g

 INSTITUTO NACIONAL DE SALUD	PROCESO INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA	MANUAL DE TECNICAS CONVENCIONALES PARA EL ESTUDIO DE LA ECOLOGÍA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DE HONGOS DE IMPORTANCIA CLÍNICA	Versión: 04
		MNL-R03.3150-001	2025-01-17
			Página 41 de 82

Bacto - agar 15 g
 Agua destilada 1 L

Aditivos:

Para cada 500 ml:

Penicilina G (20U/ml) 0,5 ml
 (0,24 mg/20 ml H₂O)

Gentamicina (80 mg/ml) 0,5 ml

Preparación:

- Triturar las semillas de *Eucalyptus* hasta que éstas estén lo más trituradas posible y adicionar a 1000 ml de agua destilada
- Hervir por 30 minutos, filtrar en papel filtro o gasa y ajustar el volumen a 1000ml
- Adicionar los componentes restantes, excepto el agar, al filtrado y disolver
- Adicionar 15 g de agar
- Adicionar la gentamicina (la penicilina y estreptomina se deben adicionar después de esterilizar el medio) y disolver al calor
- Esterilizar en autoclave 110°C por 20 minutos
- Enfriar a 48°C y adicionar 0,5 ml de penicilina G y estreptomina si no se usó gentamicina en el paso anterior a cada botella de 500 ml
- Mezclar suavemente y servir en cajas de Petri plásticas

Control de esterilidad:

Incubar una caja a 37°C durante 24 horas; descartar el lote si observa algún crecimiento

Técnica

- Anotar el procedimiento realizado en el respectivo cuaderno de trabajo
- Sembrar el aislamiento a evaluar durante 24-48 horas en medio Sabouraud a 27°C
- Realizar la siembra por estría en una caja de agar semillas de eucalipto
- Incubar a 27°C durante 72 horas con lecturas diarias

11.5.12. Medio agar rosa de Bengala – semillas para ave

Es útil para el aislamiento selectivo de *C. neoformans* o *C. gattii* el cual, a diferencia de otras levaduras, oxida los substratos fenólicos del medio de cultivo gracias a la presencia de la enzima fenoloxidasa, produciendo el pigmento melanina de color café oscuro.

Fórmula:

Guizottia abyssinica (semilla) 50 g
 Glucosa 1 g
 KH₂PO₄ 1 g
 Creatinina 1 g
 Rosa de Bengala 50 mg
 Bacto - agar 15 g
 Agua destilada 1 L

Aditivos:

Para cada 500 ml:

Penicilina G (20U/ml) 0,5 ml
 (0,24 mg/20 ml H₂O)

Gentamicina (80 mg/ml) 0,5 ml

 INSTITUTO NACIONAL DE SALUD	PROCESO INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA	MANUAL DE TÉCNICAS CONVENCIONALES PARA EL ESTUDIO DE LA ECOLOGÍA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DE HONGOS DE IMPORTANCIA CLÍNICA	Versión: 04
		MNL-R03.3150-001	2025-01-17
			Página 42 de 82

Preparación:

- Triturar ó licuar las semillas para ave hasta que éstas estén lo mas trituradas posible y adicionar a 1000ml de agua destilada
- Hervir por 30 minutos, filtrar en papel filtro o gasa y ajustar el volumen a 1000ml
- Adicionar los componentes restantes, excepto el agar, al filtrado y disolver
- Adicionar 15 g de agar
- Adicionar la gentamicina (la penicilina y estreptomicina se deben adicionar después de esterilizar el medio) y disolver al calor
- Esterilizar en autoclave 110°C por 20 minutos
- Enfriar a 48°C y adicionar 0,5 ml de penicilina G y estreptomicina si no se usó gentamicina en el paso anterior a cada botella de 500 ml
- Mezclar suavemente y servir en cajas de Petri plásticas

Control de esterilidad:

Incubar una caja a 37°C durante 24 horas; descartar el lote si observa algún crecimiento.

Técnica:

- Anotar el procedimiento realizado en el respectivo cuaderno de trabajo
- Sembrar el aislamiento a evaluar durante 24-48 horas en medio Sabouraud a 27°C
- Realizar la siembra por estría en una caja de agar semillas para ave
- Incubar a 27°C durante 72 horas con lecturas diarias

11.5.13. Medio agar Bifenil – semilla de Eucalipto

Es útil para el aislamiento selectivo de *C. neoformans* o *C. gattii* el cual, a diferencia de otras levaduras, oxida los substratos fenólicos del medio de cultivo gracias a la presencia de la enzima fenoloxidasa, produciendo el pigmento melanina de color café oscuro.

Fórmula:

<i>Eucalyptus camaldulensis</i> (semilla)	50 g
Glucosa	1 g
KH ₂ PO ₄	1 g
Creatinina	1 g
Bifenil(disuelto en 20 ml de alcohol absoluto)	1 g
Bacto - agar	15 g
Agua destilada	1 L

Aditivos:

Para cada 500 ml	
Penicilina G (20U/ml)	0,5 ml
(0,24 mg/20 ml H ₂ O)	
Gentamicina (80 mg/ml)	0,5 ml

Preparación:

- Triturar las semillas de *Eucalyptus* hasta que éstas estén lo mas trituradas posible y adicionar a 1000ml de agua destilada
- Hervir por 30 minutos, filtrar en papel filtro o gasa y ajustar el volumen a 1000ml
- Adicionar los componentes restantes excepto el agar al filtrado y disolver
- Adicionar 15 g de agar
- Adicionar la gentamicina (la penicilina y estreptomicina se deben adicionar después de esterilizar el medio) y disolver al calor

 INSTITUTO NACIONAL DE SALUD	PROCESO INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA	MANUAL DE TÉCNICAS CONVENCIONALES PARA EL ESTUDIO DE LA ECOLOGÍA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DE HONGOS DE IMPORTANCIA CLÍNICA	Versión: 04
		MNL-R03.3150-001	2025-01-17
			Página 43 de 82

- Esterilizar en autoclave 110°C por 20 minutos
- Enfriar a 48°C y adicionar 0,5 ml de penicilina G y estreptomicina si no se usó gentamicina en el paso anterior, a cada botella de 500 ml
- Mezclar suavemente y servir en cajas de Petri plásticas

Control de esterilidad:

Incubar una caja a 37°C durante 24 horas; descartar el lote si observa algún crecimiento

Técnica:

- Anotar el procedimiento realizado en el respectivo cuaderno de trabajo
- Sembrar el aislamiento a evaluar durante 24-48 horas en medio Sabouraud a 27°C
- Realizar la siembra por estría en una caja de agar semillas de eucalipto
- Incubar a 27°C durante 72 horas con lecturas diarias

11.5.14. Medio agar rosa de Bengala – semillas de Eucalipto

Es útil para el aislamiento selectivo de *C. neoformans* o *C. gattii* el cual, a diferencia de otras levaduras, oxida los substratos fenólicos del medio de cultivo gracias a la presencia de la enzima fenoloxidasa, produciendo el pigmento melanina de color café oscuro.

Fórmula:

<i>Eucalyptus camaldulensis</i> (semilla)	50 g
Glucosa	1 g
KH ₂ PO ₄	1 g
Creatinina	1 g
Rosa de Bengala	50 mg
Bacto - agar	15 g
Agua destilada	1 L

Aditivos:

Para cada 500 ml

Penicilina G (20U/ml) 0,5 ml
(0,24 mg/20 ml H₂O)

Gentamicina (80 mg/ml) 0,5 ml

Preparación:

- Triturar ó licuar las semillas de *Eucalyptus* hasta que éstas estén lo más trituradas posible y adicionar a 1000ml de agua destilada
- Hervir por 30 minutos, filtrar en papel filtro o gasa y ajustar el volumen a 1000ml
- Adicionar los componentes restantes excepto el agar al filtrado y disolver
- Adicionar 15 g de agar
- Adicionar la gentamicina (la penicilina y estreptomicina se deben adicionar después de esterilizar el medio) y disolver al calor
- Esterilizar en autoclave 110°C por 20 minutos
- Enfriar a 48°C y adicionar 0,5 ml de penicilina G y estreptomicina si no se usó gentamicina en el paso anterior, a cada botella de 500 ml
- Mezclar suavemente y servir en cajas de Petri plásticas

Control de esterilidad:

Incubar una caja a 37°C durante 24 horas; descartar el lote si observa algún crecimiento.

 INSTITUTO NACIONAL DE SALUD	PROCESO INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA	MANUAL DE TECNICAS CONVENCIONALES PARA EL ESTUDIO DE LA ECOLOGÍA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DE HONGOS DE IMPORTANCIA CLÍNICA	Versión: 04
		MNL-R03.3150-001	2025-01-17
			Página 44 de 82

Técnica:

- Anotar el procedimiento realizado en el respectivo cuaderno de trabajo
- Sembrar el aislamiento a evaluar durante 24-48 horas en medio Sabouraud a 27°C
- Realizar la siembra por estría en una caja de agar semillas de eucalipto
- Incubar a 27°C durante 72 horas con lecturas diarias

11.5.15. Agar extracto de suelos

Suelo filtrado	1000 ml - 100 g tierra
Glucosa	2 g
Extracto de levadura	0,5 g
KH ₂ PO ₄	0,5 g
Agar	15 g

Procedimiento:

- Pesar 100 g de tierra y diluirlos en 1000 ml de agua destilada
- Filtrar por medio de una gasa y luego con papel filtro hasta obtener el extracto
- Medir el volumen del extracto y completarlo a 1000 ml
- Luego adicionar los demás reactivos al medio, y ajustar el pH a 7.0 antes de esterilizar por autoclave a 121°C por 15 minutos

11.5.16. Agar extracto de *Eucalyptus*

Filtrado de <i>Eucalyptus</i> *	1000 ml - 100 g de hojas
Glucosa	2 g
Extracto de levadura	0,5 g
KH ₂ PO ₄	0,5 g
Agar	15 g

Procedimiento:

- Pesar 100 g de hojas de *Eucalyptus* y diluirlos en 1000 ml de agua destilada
- Filtrar por medio de una gasa y luego con papel filtro hasta obtener el extracto
- Medir el volumen del extracto y completarlo a 1000 ml
- Adicionar los demás reactivos al medio, y ajustar el pH a 7.0 antes de esterilizar por autoclave a 121°C por 15 minutos

11.5.17. Agar extracto de almendros

Filtrado de almendro	1000 ml - 100 g de hojas
Glucosa	2 g
Extracto de levadura	0,5 g
KH ₂ PO ₄	0,5 g
Agar	15 g

Procedimiento:

- Pesar 100 g de hojas de almendro y diluirlos en 1000 ml de agua destilada
- Filtrar por medio de una gasa y luego con papel filtro hasta obtener el extracto
- Medir el volumen del extracto y completarlo a 1000 ml
- Adicionar los demás reactivos, y ajustar el pH a 7,0 antes de esterilizar por autoclave a 121°C por 15 minutos

 INSTITUTO NACIONAL DE SALUD	PROCESO INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA	MANUAL DE TÉCNICAS CONVENCIONALES PARA EL ESTUDIO DE LA ECOLOGÍA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DE HONGOS DE IMPORTANCIA CLÍNICA	Versión: 04
		MNL-R03.3150-001	2025-01-17
			Página 45 de 82

11.5.18. Troncos de *Eucalyptus* y almendros

Procedimiento:

- Cortar los troncos en pedazos pequeños y desinfectarlos con hipoclorito de sodio al 0,2% durante 5 minutos
- Lavarlos muy bien con agua destilada y esterilizarlos en autoclave a 121°C durante 15 minutos

11.5.19. Medio de Alfamel

Alfamel	20 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1 g
KH ₂ PO ₄	1,5 g
NaNO ₃	1 g
Extracto de levadura	0,5 g
Agar	15 g
Agua	1 L

Procedimiento:

- Disolver al calor.
- Esterilizar en autoclave a 121°C por 15 minutos

11.5.20. Técnicas para el estudio de la interacción entre *C. Neoformans* y amebas de vida libre

Para estudiar esta interacción en las muestras naturalmente colonizadas con *C. neoformans* o *C. gattii*, es necesario procesar las muestras, e inocular el medio solución salina de Page con estas muestras.

11.5.20.1. Procesamiento de las muestras de suelos y de excrementos de aves

Estas muestras se procesan usando el método tradicional con una sola modificación: la suspensión de la muestra se realizará usando solución salina de Page, en vez de PBS (ver protocolo de procesamiento de tierras de este manual).

Solución salina para amebas de Page

NaCl	120 mg
MgSO ₄ • 7 H ₂ O	4 mg
CaCl ₂ • 2 H ₂ O	4 mg
Na ₂ PO ₄	142 mg
KH ₂ PO ₄	136 mg

Preparación:

- Disolver y llevar a un volumen de 1000 ml con agua destilada
- Esterilizar por autoclave a 15 libras de presión y a 121°C durante 15 minutos
- Refrigerar. La solución puede ser usada por 6 meses

11.5.20.2. Medio xénico (con bacterias) usado en el aislamiento de amebas oportunistas de vida libre

Preparación del medio (15%)

Solución salina de Page	1 L
Agar	1,5 g

 INSTITUTO NACIONAL DE SALUD	PROCESO INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA	MANUAL DE TECNICAS CONVENCIONALES PARA EL ESTUDIO DE LA ECOLOGÍA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DE HONGOS DE IMPORTANCIA CLÍNICA	Versión: 04
		MNL-R03.3150-001	2025-01-17
			Página 46 de 82

Preparación:

- Disolver al calor 1,5 g de agar en 1000 ml de solución salina para amebas de Page
- Esterilizar en autoclave a 15 libras de presión y 121°C durante 15 minutos
- Enfriar el medio a 60°C y servir en cajas de Petri
- Refrigerar a 4°C

Nota: el medio se puede mantener hasta por 3 meses. Antes de utilizar las cajas, éstas debenser incubadas a 37°C durante 30 minutos.

Preparación del inóculo bacteriano

Materiales:

- Asas estériles
- Pipetas Pasteur estériles
- Cultivo inclinado en BHI de *Escherichia coli* o *Enterobacter aerogenes* de 18 a 24 horas

Técnica:

- Anotar el procedimiento realizado en el respectivo cuaderno de trabajo
- Adicionar 0,5 ml de solución salina para amebas de Page a un cultivo inclinado de *Escherichia coli* o *Enterobacter aerogenes* de 18 a 24 horas (en BHI)
- Distribuir la sobre la superficie del cultivo usando un asa estéril
- Con una pipeta Pasteur, tomar 2 a 3 gotas de esta suspensión y colocarlas en el centro de una caja de agar previamente incubada a 37°C
- Esparcir la suspensión sobre la superficie usando un asa

11.5.20.3. Inoculación del medio con muestras de suelo

Técnica:

- Colocar varias gotas de suspensión de la muestra ambiental en la caja con agar
- Incubar a 37°C

11.5.20.4. Aislamiento de amebas de vida libre de muestras ambientales

Técnica:

- Examinar las cajas diariamente y durante una semana, usando el objetivo 10X. Bajo el microscopio, las amebas se observan como pequeñas manchas
- Si se encuentran amebas, transferir una pequeña porción del agar y colocarlo de forma invertida sobre una nueva caja precubierta con bacterias
- Continuar la transferencia hasta obtener las amebas puras
- Almacenar las amebas en un medio xénico como el medio proteosa-peptona-extracto de levadura-glucosa o el medio de Neilson

11.5.20.5. Identificación de amebas de vida libre

Esta se hace con base en características morfológicas de los trofozoitos y los quistes, en su patrón de locomoción y en si presentan o no un estado flagelado (pruebas de enflagelación) (Ash & Orihel, 1987; Murray et al., 2003). La clave para identificación de amebas de agua y suelo de Page es la más utilizada (Page F.C. 1976. *An Illustrated key to freshwater and soil amoebae*).

 INSTITUTO NACIONAL DE SALUD	PROCESO INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA	MANUAL DE TÉCNICAS CONVENCIONALES PARA EL ESTUDIO DE LA ECOLOGÍA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DE HONGOS DE IMPORTANCIA CLÍNICA	Versión: 04
		MNL-R03.3150-001	2025-01-17
			Página 47 de 82

11.6. Otras técnicas

11.6.1. Prueba de Benomil

Fundamento: se emplea para determinar la actividad del fungicida benomil sobre hongos de importancia médica, debido a su actividad diferencial sobre éstos.

Materiales:

- Benomil Acetona Sabouraud agar
- Incubadora 25°C

Técnica:

- Anotar el procedimiento realizado en el respectivo cuaderno de trabajo
- Realizar una suspensión de 1 mg de benomil en 1 ml de acetona
- Preparar por cada 4 cepas a probar 4 fiolas con 25 ml de Sabouraud y esterilizar en autoclave
- Adicionar 5µl, 10 µl y 25 µl de la suspensión de benomil a 3 de las fiolas y la fiola 4 no adicionar benomil. Así tendremos Sabouraud más 2, 4, y 10 µg/ml de benomil, y un control sin fungicida
- Servir en cajas de Petri pequeñas, aproximadamente 6 ml
- Dejar solidificar
- Inocular el aislamiento en las 3 concentraciones de benomil y en Sabouraud sin antifúngico, en el centro de la caja
- Incubar a 25°C por 7 días

Deben emplearse controles para esta técnica (ver tabla).

Interpretación:

Los hongos susceptibles a este fungicida no crecen en los medios con benomil

Nota: algunos de los hongos resistentes y susceptibles se muestran en la tabla.

Susceptibilidad de algunos hongos a benomil:

Microorganismo	Concentración de benomil que causa inhibición en más del 50% de crecimiento
<i>Alternaria alternaria</i>	>10
<i>Curvularia</i>	>10
<i>Scedosporium prolificans</i>	>10
<i>Geotrichum candidum</i>	>10
<i>Scopulariopsis sp.</i>	>10
BASIDIOMYCOTA	
<i>Schizophyllum commune</i>	>10
<i>Rizoctonia</i>	>10
<i>Aerobasidium pulullans</i>	2
<i>Cladosporium herbarum</i>	2
<i>Exophiala sp</i>	2
<i>Penicillium canescens</i>	2
<i>Penicillium chrysogenum</i>	2
<i>Penicillium citreonigrum</i>	2
<i>Penicillium griseofulvum</i>	2

 INSTITUTO NACIONAL DE SALUD	PROCESO INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA	MANUAL DE TÉCNICAS CONVENCIONALES PARA EL ESTUDIO DE LA ECOLOGÍA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DE HONGOS DE IMPORTANCIA CLÍNICA	Versión: 04
		MNL-R03.3150-001	2025-01-17
			Página 48 de 82

11.6.2. Técnica de decontaminación con ácido clorhídrico

Fundamento: se emplea para la eliminación del crecimiento bacteriano en cepas fúngicas.

Materiales:

- (HCl) 1 N
- Caldo Sabouraud
- Agar Sabouraud
- Agar sangre

Técnica:

- Anotar el procedimiento realizado en el respectivo cuaderno de trabajo
- Sembrar el aislamiento por agotamiento en agar sangre a 25°C durante 24 horas
- Inocular una colonia en 5 ml de caldo Sabouraud
- Adicionar 2 gotas de HCl 1 N
- Incubar a 25°C durante 24 horas
- Realizar un subcultivo por agotamiento con 0,1 ml del crecimiento en caldo de Sabouraud en agar Sabouraud
- Incubar a 25°C durante 24 horas

11.6.3. Conteo de levaduras en cámara de Neubauer

Fundamento: se emplea para la estandarización del inóculo de células levaduriformes.

Técnica (montaje de la cámara):

- Tomar la cámara y colocar sobre ella la laminilla de cuarzo
- Con una pipeta Pasteur o micropipeta, coloque la suspensión celular hasta que el área de la cuadrícula quede cubierta, teniendo en cuenta que en los bordes no quede solución. Si esto llega a ocurrir, limpie la cámara y repita todo el procedimiento. No intente remover el exceso de líquido
- Enfocar con aumento de 10X y localizar el primer cuadrante del lado izquierdo de la cámara
- Enfocar en 40X y empezar el conteo de las células siguiendo el orden mostrado en la **Figura 4**

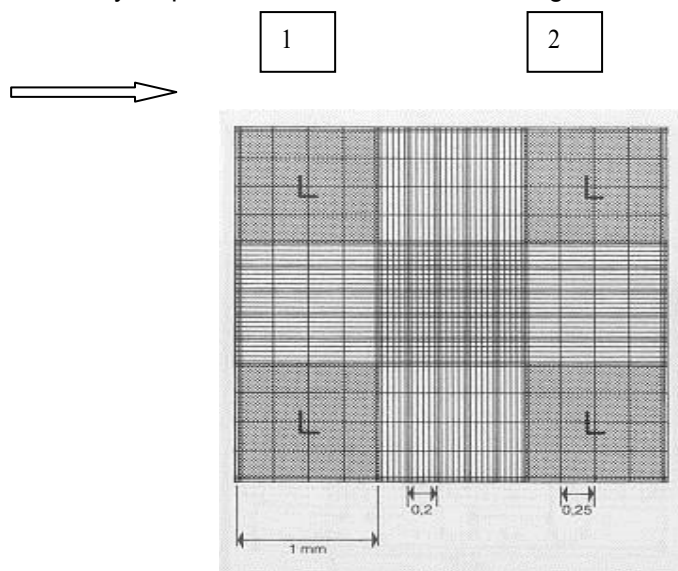


Figura 4. Conteo de células

 INSTITUTO NACIONAL DE SALUD	PROCESO INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA	MANUAL DE TECNICAS CONVENCIONALES PARA EL ESTUDIO DE LA ECOLOGÍA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DE HONGOS DE IMPORTANCIA CLÍNICA	Versión: 04
		MNL-R03.3150-001	2025-01-17
			Página 49 de 82

- Repetir el procedimiento anterior en los cuadrantes dos, tres y cuatro. Algunas células pueden estar fuera de los bordes, en este caso, contar solo aquellas que se encuentren tocando los bordes que presentan triple raya
- Determinar el promedio de células por cada cuadrante (1 al 4) y aplicar la siguiente fórmula: células/ml= (promedio de células por cuadrante) x 10⁴ ml x 1 dilución

11.7. PROTOCOLOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

11.7.1. Extracción de ADN genómico

11.7.1.1. Protocolo de extracción con nitrógeno líquido

Fundamento: se emplea para la extracción del ADN a ser utilizado en la PCR huella digital

Materiales:

- Cultivo de *C. neoformans* de 48 horas
- Agua desionizada estéril
- Ácido triisopropilnaftaleno sulfónico (TNS) SERVA
- Ácido 4-para aminosalicico (PAS)
- Buffer de extracción: Tris-HCl 1M, NaCl 1,25 M, EDTA pH 8,0 0,25 M
- Fenol + TES saturado con 8-hidroxiquinolona
- Nitrógeno líquido
- Cloroformo
- Fenol-cloroformo-alcohol isoamílico 25:24:1
- Acetato de amonio 3 M pH 5,2
- Etanol al 96% frío
- Etanol al 70% frío
- Eppendorf
- Homogeneizador pequeño
- Puntas Pipetas (1000µl-200µl, 0,5µl – 10µl)
- Pipeteador
- Tubos Falcon de 50 mL
- Hipoclorito
- Microcentrífuga
- Revco – 20°C
- Baño María

Técnica:

La extracción de ADN de alto peso molecular se realiza de acuerdo con la técnica previamente publicada por Meyer y Mitchell. 1995. *Polymerase Chain reaction fingerprinting in using single primers specific to minisatélites and simple repetitive DNA sequences: strain variation in Cryptococcus neoformans. Electrophoresis*. 16: 1648-56.

- Anotar el procedimiento realizado en el respectivo cuaderno de trabajo
- Tomar una asada del cultivo puro de células a partir de agar Sabouraud dextrosa y mezclar con 900 µl de agua desionizada en un tubo eppendorf. Centrifugar durante 5 minutos a 10.000 rpm a temperatura ambiente
- Descartar el sobrenadante en hipoclorito de sodio
- Sumergir en cada botón de células el homogeneizador y congelar cada tubo en nitrógeno líquido (usar tapabocas). Macerar las células fuertemente teniendo cuidado de no dejar descongelar (para tal fin colocar frecuentemente el tubo en nitrógeno líquido, debido a que las DNAsas pueden

 INSTITUTO NACIONAL DE SALUD	PROCESO INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA	MANUAL DE TECNICAS CONVENCIONALES PARA EL ESTUDIO DE LA ECOLOGÍA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DE HONGOS DE IMPORTANCIA CLÍNICA	Versión: 04
		MNL-R03.3150-001	2025-01-17
			Página 50 de 82

- destruir el DNA)
- Colocar todos los tubos en el congelador hasta continuar el siguiente paso
- La solución de extracción debe ser preparada el mismo día para cada una de las extracciones: disolver 100 mg de TNS y 600 mg de PAS en 10 ml de agua desionizada, agregar 2,5 ml de buffer de extracción y 7,5 ml de fenol. Esta solución es precalentada a 55°C
- Adicionar tubo por tubo 700 µl de la solución de extracción e incubar a 55°C durante 2 minutos, mezclando periódicamente
- Adicionar a cada tubo 500 µl de cloroformo e incubar a 55°C durante 2 minutos mezclándolo ocasionalmente
- Centrifugar los tubos durante 10 minutos a 14.000 rpm para separar las fases de la solución
- Transferir la fase acuosa a un nuevo eppendorf y el remanente se descarta
- Adicionar 500 µl de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) y mezclar los tubos por 2 minutos a temperatura ambiente
- Centrifugar los tubos durante 10 minutos a 14.000 rpm. Transferir la fase acuosa a un nuevo eppendorf y el remanente se descarta
- Adicionar 500 µl de cloroformo a cada tubo y mezclar continuamente durante 2 minutos a temperatura ambiente
- Centrifugar los tubos durante 10 minutos a 14.000 rpm. Transferir la fase acuosa a un nuevo eppendorf y el remanente se descarta
- Ver anexo c para determinar la cantidad de acetato de sodio 3 M pH 5,2 y etanol al 96% frío que debe ser adicionado según el volumen de ADN presente en el tubo. Mezclar muy bien e incubar los tubos a -20°C durante una hora o durante toda la noche para precipitar el ADN genómico
- Centrifugar los tubos durante 30 minutos a 14.000 rpm para sedimentar el ADN
- Descartar el sobrenadante y lavar el botón con 50 µl de etanol al 70% frío y centrifugar durante 10 minutos a 14.000 rpm
- Secar completamente el botón de ADN al aire, Re suspender en 200 µl de agua desionizada y mantener a temperatura ambiente durante 5 minutos agitando el tubo ocasionalmente, luego almacenar a 4°C durante toda la noche
- Determinar la concentración de ADN final con la siguiente fórmula: Concentración = D.O. 260 nm x 50 x factor dilución
- Ajustar a la concentración deseada

Observaciones:

- Si llega a tocar el eppendorf con la punta, descártela
- Se deben utilizar un juego de pipetas para la extracción y la siembra de los productos de PCR y uno diferente para el PCR
- Se debe evitar la contaminación durante el proceso de maceración de las células

11.7.1.2. Protocolo de extracción con perlas de vidrio

Este es el protocolo que se emplea actualmente para realizar PCR huella digital y PCR del gen *URA5*.

Materiales:

- Cultivo de *C. neoformans* o *C. gattii* de 48 horas en agar YEPD
- TENTS (Tris 10 mM, pH 7,5, EDTA 1 mM, pH 8,0, NaCl 200 mM, triton 2%, SDS 1%)
- Fenol equilibrado – Cloroformo
- Etanol 100% frío
- Etanol 70% frío
- TE pH 8,0
- Rnasa ANaCl 5M
- Asas 10 µl estériles nuevas
- Perlas de vidrio (0,2 mm)

 INSTITUTO NACIONAL DE SALUD	PROCESO INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA	MANUAL DE TÉCNICAS CONVENCIONALES PARA EL ESTUDIO DE LA ECOLOGÍA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DE HONGOS DE IMPORTANCIA CLÍNICA	Versión: 04
		MNL-R03.3150-001	2025-01-17
			Página 51 de 82

- Vortex
- Microcentrífuga
- Puntas Pipetas (1000 µl, 200 µl, 0,5-10 µl)
- Eppendorf
- Puntas estériles nuevas
- Congelador -20°C
- Incubadora
- 37mL Hipoclorito

Técnica:

- Anotar el procedimiento realizado en el respectivo cuaderno de trabajo
- Sembrar cada aislamiento en agar YEPD (extracto de levadura 1%, peptona 1%, glucosa 2%, agar 1,5%) durante 48 horas. Colocar dos asadas del aislamiento a estudiar en 0,5 ml de TENTS
- Adicionar 0,2 g de perlas de vidrio (0,2 mm) y 0,5 ml de fenol:cloroformo (25:24) y agitar constantemente en vortex durante 2 minutos (el fenol debe estar equilibrado según el anexo y la mezcla fenol: cloroformo debe descongelarse y mezclar antes de usar)
- Centrifugar durante 10 minutos a 14.000 rpm y transferir la fase acuosa a un nuevo eppendorf
- Adicionar 1 volumen de etanol 100% y colocar las muestras a -20°C durante una hora
- Centrifugar a 14.000 rpm durante 30 minutos y lavar con 200 ml de etanol al 70%, centrifugando a 14.000 rpm durante 10 minutos
- Descartar el sobrenadante y resuspender el ADN en 0,5 ml de TE, pH 8,0 que contenga 50 mg/ml de Rnasa A e incubar a 37°C durante 30 minutos
- Extraer el ADN nuevamente con 500 µl de fenol: cloroformo, centrifugar a 14.000 rpm durante 10 minutos y transferir la fase acuosa a un nuevo eppendorf
- Reprecipitar con 20 µl de NaCl 5M y 1 volumen de etanol 100%. Almacenar a -20°C durante 1 hora
- Centrifugar a 14.000 rpm durante 30 minutos, descartar el sobrenadante y lavar con 200 µl de etanol al 70% centrifugando a 14.000 rpm durante 10 minutos
- Descartar el sobrenadante y secar el ADN en bloque a 37°C (tener precaución de que no quede ni una gota en el tubo) y resuspender en 100 µl de TE
- Almacenar a 4°C durante toda la noche para resuspender el ADN
- Determinar la concentración de ADN final con la siguiente fórmula: Concentración = D.O. 260 nm x 50 x factor dilución
- Ajustar a la concentración deseada

10.7.1.3. Protocolo de extracción de ADN para cultivos fúngicos por choque térmico (modificado de Ferrer C. et al; JCM 2001)

Medios de cultivo y soluciones:

- Agar YEPD (extracto de levadura 1%, peptona 1%, glucosa 2%, agar 1,5%)
- Buffer de lisis 100ml solución (0,5g SDS, 1,4g NaCl, 0,73g EDTA, 20ml Tris-HCl 1M)
- Fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (v:v:v 25:24:1)
- Isopropanol
- Etanol 70%
- Agua destilada o buffer TE pH 8,0 (Tris HCl pH 8,0 10 mM, EDTA pH 8,0 1 mM, Agua destilada estéril 500ml), Esterilizar a 115°C por 15 min

Metodología:

- Resembrar el aislamiento en agar YEPD (C. neoformans/ C. gattii) o agar Sabouraud
- Tomar una asada del aislamiento previamente sembrado durante 48 hrs en agar YEPD o agar Sabouraud, y transferirla a un tubo Eppendorf, almacenar a -20 °C durante por los menos 30 minutos o preferiblemente toda la noche

 INSTITUTO NACIONAL DE SALUD	PROCESO INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA	MANUAL DE TECNICAS CONVENCIONALES PARA EL ESTUDIO DE LA ECOLOGÍA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DE HONGOS DE IMPORTANCIA CLÍNICA	Versión: 04
		MNL-R03.3150-001	2025-01-17
			Página 52 de 82

- Adicionar 500 µl de buffer de lisis
- Agitar vigorosamente en vortex
- Incubar a 65 °C durante 1 hora (agitar en vortex por lo menos una vez durante la incubación)
- Adicionar 500 µl fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (v:v:v 25:24:1) y mezclar en vortex durante 2 minutos para obtener una suspensión homogénea
- Centrifugar a 14000 rpm por 15 minutos
- Remover la fase de arriba y mezclar con un volumen igual de isopropanol. Precipitar el sobrenadante a -20 °C durante 1 hora (la precipitación toda la noche mejora la eficiencia de la extracción)
- Centrifugar a 14000 rpm a 4 °C durante 15 minutos y descartar el sobrenadante
- Lavar el pellet con 500 µl de una solución de etanol 70%
- Centrifugar a 14000 rpm durante 15 minutos
- Descartar el sobrenadante
- Secar el pellet
- Resuspender el ADN en 50-100 µl de agua destilada estéril o TE para mejor conservación
- Determinar la concentración de ADN y diluir según sea necesario

11.7.2. PCR – huella digital

Materiales:

- ADN genómico 0,5 ng/µl
- PCR buffer (Tris-HCl 10mM pH 8.3, KCl 50Mm) (Invitrogen) 1X
- Deoxinucleotidos (dNTPs): 0, 2 mM de cada uno (dATP, dTTP, dCTP, dGTP (Promega)
- MgCl₂ 2,0 mM
- Acetato de sodio (Sigma) 3,0 mM
- Iniciador: M13, (GACA)₄ ó (GTG)₅ 0,8 ng/ µl
- Albumina Sérica Bovina (BSA) 2X
- Amplitaq (Invitrogen) 0,05 U
- Agua para PCR

Técnica:

La PCR se realiza con 3 iniciadores diferentes para asegurar que los resultados obtenidos con cada uno sean reproducibles. M13 es un iniciador específico minisatélite derivado a partir de la secuencia core del fago M13 (5'GAGGGTGGCGTTCT 3'), mientras que (GACA)₄ y (GTG)₅ son oligonucleótidos microsatélite específicos; éstas secuencias pueden ser usadas como iniciadores únicos en la PCR de *C. neoformans* y *C. gattii* (Meyer et al 1993).

Cada reacción de PCR se realiza en un tubo de 0,5 mL con un volumen final de 50 µl que contiene:

31,5µl de agua desionizada estéril

2,5 µl de ADN (10 ng/µl) 16 µl de la mezcla master:

5 µl de buffer de PCR 10 X

0,5 µl de dNTPS

3 µl de acetato de sodio (50 mM)

4 µl de iniciador (10 ng/µl)

2 µl de cloruro de magnesio (50 mM)

1 µl de BSA

0,5 µl de Amplitaq

 INSTITUTO NACIONAL DE SALUD	PROCESO INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA	MANUAL DE TECNICAS CONVENCIONALES PARA EL ESTUDIO DE LA ECOLOGÍA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DE HONGOS DE IMPORTANCIA CLÍNICA	Versión: 04
		MNL-R03.3150-001	2025-01-17
			Página 53 de 82

Nota: para realizar la PCR con el iniciador (GACA)₄ se deben emplear 8 ml del iniciador

Las condiciones de la PCR son:

Denaturación inicial		94°C durante	1 minuto
	30 ciclos		
Denaturación		94°C durante	20 segundos
Anillamiento		50°C durante	1 minuto
Extensión		72°C durante	20 segundos
1 ciclo final de extensión		72°C durante	6 minutos
Ciclos de enfriamiento		4°C durante	24 horas

Se tiene estandarizado que los productos de (GACA)₄ se corren durante 4 horas a 80 V. Los productos de M13 y (GTG)₅ se corren durante 14,5 horas a 80 V. Los productos de (GTG)₅ se corren durante 3 horas a 80 V.

Los productos de PCR se visualizan en un gel de agarosa al 1,4%.

Notas:

- En la optimización del procedimiento de PCR (Meyer et al 1993) se encontró empíricamente que suplementando las reacciones con acetato de magnesio o sodio se incrementa la reproducibilidad de los patrones obtenidos por amplificación de ADN fúngico
- Todos los ADN y los reactivos son mantenidos en hielo durante la preparación de las reacciones para reducir el riesgo de la degradación de ADN, inactividad de la enzima o amplificaciones no específicas
- Para minimizar los riesgos de contaminación, todas las reacciones fueron preparadas en un sitio de trabajo especializado utilizando un control negativo el cual contiene los mismos reactivos de la reacción de PCR pero adicionamos agua en lugar de ADN. Cuando los productos de PCR se separan en el gel, el control negativo no debe presentar ningún tipo de banda lo que indica que no hay contaminación
- Hay que tener cuidado de asegurar que siempre se use el mismo termociclador para todos los procedimientos de PCR. Diferentes marcas y modelos de termocicladores pueden afectar la amplificación del ADN debido a diferencias en los bloques de calentamiento

11.7.3. Visualización de los productos de PCR por electroforesis en gel de agarosa

Materiales:

- Sodio dodecil sulfato (SDS)
- Agarosa
- Agua MiliQ Estéril
- Buffer Tris Borato EDTA 1x (TBE): 10,8 g/L de tris-base, 5,5 g/L de ácido bórico, 4,0 ml/L de EDTA 0,5 M pH 8,0
- Bromuro de etidio (10 mg/ml) (Sigma)
- Buffer de carga: glicerol al 30% en agua, xylencianol FF 0,25%, azul de bromofenol 0,25% Marcador de peso molecular de 1 KB (Gibco-BRL): buffer de carga: Stock marcador (1:5)
- Cámara de electroforesis (Maxicell EC360M ó Gel ProCurtin Mathenson Scientific) Tamaño del gel 20 x 30 cm

 INSTITUTO NACIONAL DE SALUD	PROCESO INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA	MANUAL DE TÉCNICAS CONVENCIONALES PARA EL ESTUDIO DE LA ECOLOGÍA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DE HONGOS DE IMPORTANCIA CLÍNICA	Versión: 04
		MNL-R03.3150-001	2025-01-17
			Página 54 de 82

Fotodocumentador para captura de la imagen

Notas:

- Los reactivos y soluciones que se emplean en la electroforesis deben ser preparados con agua MiliQ
- La cámara de electroforesis debe lavarse con una solución de SDS al 0,1% preparada en agua MiliQ, mientras que la cama en la que se prepara el gel se debe lavar en SDS al 1%. Estos lavados deben ser de por lo menos 6 horas, después de lo cual la cámara debe lavarse con agua y secarse al ambiente
- El TBE 1X empleado en cada corrida debe ser nuevo

Técnica:

- Anotar el procedimiento realizado en el respectivo cuaderno de trabajo
- Separar los productos de PCR obtenidos en un gel de agarosa al 1,4% (disolver 2,38 g de agarosa en 170 ml de buffer TBE 1X por calor, y enfriar a 60°C)
- Dejar solidificar el gel durante 1 hora a temperatura ambiente
- Tomar 30 µl del producto de PCR y mezclar con 8 µl de buffer de carga
- Sembrar el producto de PCR y sembrar 7 µl de marcador de 1 Kb en varios pozos en el gel
- Correr el gel con aproximadamente 2 L de buffer TBE 1X a 80 voltios durante 14,5 horas
- Colorear el gel con una solución de bromuro de etidio 0,4 µg/ml durante 30 minutos tapándolo con papel aluminio
- Lavar el gel con agua MiliQ estéril durante 30 minutos
- Visualizar las bandas en el gel usando un fotodocumentador

Notas:

Hay que asegurarse que los geles se corran con las condiciones estandarizadas y en la misma cámara de electroforesis. Los pozos de la peinilla deben tener la misma profundidad para cada gel. La misma concentración y volumen del gel debe ser usado en cada caso con el mismo volumen del buffer de electroforesis TBE. Los geles deben ser corridos con el mismo voltaje y tiempo

11.7.4. Extracción de ADN de *Cryptococcus Neoformans* y *Cryptococcus gattii* a partir de muestras de tierras

Técnica:

- Anotar el procedimiento realizado en el respectivo cuaderno de trabajo
- Pesar en un eppendorf 30 mg de tierra y adicionarle 180 µl de EDTA 0,125 M (**Anexo 1**, el cual quela los iones presentes en la muestra) y 180 µl de buffer de extracción No 1 (Anexo b). Tapar muy bien los eppendorf con parafilm
- Dejar en agitación toda la noche a 200 rpm en el shaker a temperatura ambiente
- Dejar en reposo durante ½ o 1 hora (para formar botón)
- Separar el sobrenadante vaciando el eppendorf completamente y centrifugar este sobrenadante a 3300 rpm durante 30 minutos a 4°C
- Descartar todo el sobrenadante con ayuda de una punta y empezar a trabajar con el botón
- Este eppendorf que contiene el botón se congela en nitrógeno líquido y se procede a macerar con ayuda de un "miniature pestle" sin que el contenido del eppendorf se vaya a descongelar en ningún momento, debido a que las DNAsas pueden destruir el ADN que se está extrayendo. Se macera muy bien esto. Inmediatamente llevar el tubo a -20°C mientras se procesan las otras muestras
- Preparar una solución de extracción fresca, en el instante en que se va utilizar, que contiene:
 - 100 mg de ácido sulfónico triisopropilnaftaleno (TNS)
 - 600 mg de ácido para-aminosalicílico
 - 10 mL de agua desionizada estéril
 - 2,5 mL de buffer de extracción (Tris HCl 1 M, NaCl 1,25 M y EDTA 0,25 M pH 8,0)

 INSTITUTO NACIONAL DE SALUD	PROCESO INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA	MANUAL DE TECNICAS CONVENCIONALES PARA EL ESTUDIO DE LA ECOLOGÍA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DE HONGOS DE IMPORTANCIA CLÍNICA	Versión: 04
		MNL-R03.3150-001	2025-01-17
			Página 55 de 82

7,5 mL de fenol saturado con tris-EDTA

- Esta solución debe ser precalentada a 55°C en baño María
- Adicionar 700 µl de la solución anterior a cada tubo, sacando uno a uno los tubos de la nevera de -20°C. Nunca debe permitirse la descongelación del tubo que contiene el ADN
- Incubar durante 2 minutos a 55°C, mezclando ocasionalmente
- Agregar 500 µl de cloroformo a cada tubo. Mezclar fuertemente e incubar por 2 minutos a 55°C
- Centrifugar los tubos a 14.000 rpm durante 10 minutos
- Transferir la fase acuosa a un nuevo eppendorf y el remanente se descarta
- Adicionar 500 µl de la mezcla de fenol: cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) y mezclar los tubos durante 2 minutos a temperatura ambiente
- Centrifugar los tubos a 14.000 rpm durante 10 minutos
- Transferir la fase acuosa a un nuevo eppendorf teniendo cuidado de no tocar la fase que sigue y el remanente se descarta
- Adicionar 500 µl de cloroformo a cada tubo y mezclar continuamente durante 2 minutos a temperatura ambiente
- Centrifugar los tubos a 14.000 rpm durante 10 minutos
- Transferir la fase acuosa a un nuevo eppendorf teniendo cuidado de no tocar la fase que sigue y el remanente se descarta
- Medir el volumen final de la fase acuosa y hacer los cálculos para adicionar 0,03 volúmenes de acetato de sodio 3 M pH 5,2 y 2,5 volúmenes de etanol al 96% frío, mezclar muy bien manualmente (no utilizar vortex) y dejar los tubos a -20°C durante una hora o durante toda la noche para precipitar el ADN (anexo 3)
- Centrifugar los tubos durante 30 minutos a 14.000 rpm para sedimentar el ADN. Descartar el sobrenadante
- Lavar el botón con 100 µl de etanol al 70% frío y centrifugar durante 10 minutos a 14.000 rpm
- Secar completamente el botón de ADN, volteando el tubo completamente sobre una toalla de papel a temperatura ambiente o a 27°C
- Cuando el botón se seque completamente, sin una sola gota de etanol, Re suspender el botón en 100 µl de agua o buffer TE pH 8,0 (anexo 4) y mantener a temperatura ambiente durante 5 minutos agitando el tubo ocasionalmente
- Almacenar el tubo a 4°C durante toda la noche
- Medir la concentración de ADN en el espectrofotómetro con una densidad óptica de 260-280 nm. Se hace una dilución 1:10 ó 1:100 y se corrige el resultado con la siguiente fórmula: Concentración = D.O. 260 nm x Dilución x 50 (cada D.O tiene 50 ng /µl)
- Cortar una jeringa de tuberculina con ayuda de un bisturí caliente cada 3 mm aproximadamente y limar muy bien los bordes de la jeringa para evitar después que se dañe la agarosa. Uno de estos bordes se sella con papel parafilm muy bien
- Dispensar 80 µl de agarosa de bajo punto de fusión (1,5% disuelta en buffer TE pH 8,0) y con esta misma punta agregar 80 µl de la muestra, mezclar muy bien con ayuda de la punta
- Dejar solidificar 1 minuto a temperatura ambiente y posteriormente llevar a -20°C durante 10 minutos
- Colocar cada uno de los bloques de agarosa muy cuidadosamente con ayuda de un palito estéril en un tubo falcón de 15 mL y llenar el tubo hasta el borde con el buffer TE pH 8,0. Dejar en reposo durante 24 horas a temperatura ambiente
- Al otro día descartar el buffer TE pH 8,0 sin destapar todo el tubo para evitar que el bloque se pierda y agregar el mismo volumen del día anterior deslizándolo por las paredes cuidadosamente para no dañar el bloque de agarosa. Dejar el tubo a temperatura ambiente
- A las 48 horas descartar nuevamente el buffer y colocar el bloque de agarosa en un eppendorf y calentar a 60°C para disolver el bloque
- El ADN finalmente estará listo para colocar 1 µl en un tubo para PCR
- Estos bloques de agarosa se pueden guardar a -20°C para seguir utilizándolos

 INSTITUTO NACIONAL DE SALUD	PROCESO INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA	MANUAL DE TÉCNICAS CONVENCIONALES PARA EL ESTUDIO DE LA ECOLOGÍA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DE HONGOS DE IMPORTANCIA CLÍNICA	Versión: 04
		MNL-R03.3150-001	2025-01-17
			Página 56 de 82

El principio para utilizar ADN embebido en bloques de agarosa de bajo punto de fusión es para eliminar todos los inhibidores de la taq polimerasa presentes en la muestra. El ADN por ser una molécula grande va a quedar atrapado en la agarosa, mientras que los inhibidores que son generalmente sustancias pequeñas van a salir gracias a la difusión que se logra con los grandes volúmenes de buffer TE.

11.7.5. PCR para *Cryptococcus Neoformans* y *Cryptococcus gattii* a partir de muestras de tierra

Materiales:

- ADN genómico (25 ng/μl procedente del cultivo o 1 μl del ADN extraído de las muestras)
- Buffer de PCR 10X (5 μl): Tris-HCl 10 mM pH 8,3, cloruro de potasio 50 mM (Perkin Elmer)
- Cloruro de magnesio 25 mM (3 μl) (Perkin Elmer)
- Mezcla de deoxinucleótidos (dNTPs) (1 μl): 100 mM (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) (Promega)
- Acetato de magnesio 50 mM (3 μl) (Sigma)
- Iniciadores (10 pg/μl):
 CN4 5' ATAC ACC TTC CCA CTA ACA CAT T 3'
 CN5 5' GAA FFF CAT GCC TGT TTG AGA G 3'
- Taq polimerasa 5U (1 μl) (Perkin Elmer)

Técnica:

Cada reacción de PCR se realiza en un tubo de 0,5 mL con un volumen de 50 μl que contiene:

Agua para PCR
ADN
Mezcla master

Las reacciones de PCR se realizan en un termociclador con las siguientes condiciones:

Denaturación inicial	95°C durante	5 minutos
30 ciclos		
Denaturación	95°C durante	30 segundos
Anillamiento	58°C durante	30 segundos
Extensión	72°C durante	30 segundos
1 ciclo final de extensión	72°C durante	5 minutos
Ciclos de enfriamiento	4°C durante	24 horas

Los productos de PCR se visualizan en un gel de agarosa 2% con 0,3 μg/ml de bromuro de etidio y se corre a 100 V durante 1 hora.

Controles:

- Positivo: *C. neoformans* o *C. gattii*
- Negativo: *C. laurentii*, *C. albidus*, *P. brasiliensis*
muestras de suelos no contaminados

11.7.6. Amplificación y digestión del Gen Orotidin Monofosfato Pirofosforilasa (OMPasa) llamado también URA5 mediante la técnica de RFLP

Materiales:

- ADN 50 ng/ μl
- PCR buffer (Tris-HCl 10mM pH 8.3, KCl 50mM) (Invitrogen) 1X
- MgCl₂ 4.5mM
- dATP, dCTP, dGTP and dTTP (Promega) 0.2 mM de cada uno

 INSTITUTO NACIONAL DE SALUD	PROCESO INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA	MANUAL DE TÉCNICAS CONVENCIONALES PARA EL ESTUDIO DE LA ECOLOGÍA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DE HONGOS DE IMPORTANCIA CLÍNICA	Versión: 04
		MNL-R03.3150-001	2025-01-17
			Página 57 de 82

- Iniciador URA5 (5' ATGTCCTCCCAAGCCCTCGACTCCG 3') 50 ng/ µl
- SJ01 (5' TTAAGACCTCTGAACACCGTACTC 3')
- Amplitaq (Invitrogen) 0,03 U
- Agua para PCR

Técnica:

Cada reacción de PCR se realiza en un tubo de 0,5 mL con un volumen de 50 µl que contiene:

- 24,7 µl de agua desionizada estéril
- 5 µl de ADN (10 ng/µl)
- 20,3 µl de la mezcla master:
- 4,5 µl MgCl₂ (50 mM)
- 5 µl de buffer de PCR 10 X
- 0,5 µl de dNTPS (20 mM)
- 5 µl de iniciador URA 5 (10 ng/µl)
- 5 µl de iniciador SJ 01 (10 ng/µl)
- 0,3 µl de Amplitaq

Las reacciones de PCR se realizan en un termociclador LabLine con las condiciones mostradas en la tabla

Condiciones PCR *URA5*

Denaturación inicial	94°C durante	3 minutos
35 ciclos		
Denaturación	94°C durante	45 segundos
Anillamiento	62°C durante	1 minuto
Extensión	72°C durante	2 minutos
1 ciclo final de extensión	72°C durante	6 minutos
Ciclos de enfriamiento	4°C durante	24 horas

Los productos de PCR se visualizan en un gel de agarosa 1,4% y se corre a 100 V durante 1 hora.

Notas:

- Todos los ADN y los reactivos deben ser mantenidos en hielo durante la preparación de las reacciones para reducir el riesgo de la degradación de ADN, inactividad de la enzima o amplificaciones no específicas
- Hay que tener cuidado de asegurar que siempre se use el mismo termociclador para todos los procedimientos de PCR. Diferentes marcas y modelos de termocicladores pueden afectar la amplificación del ADN debido a diferencias en los bloques de calentamiento

Materiales:

- Producto de PCR
- Sau96I (100U/µl)
- HhaI (400U/µl)
- buffer
- NeBa (1X)
- BSA (1X)
- Agua para PCR

Técnica:

Las condiciones de la mezcla para la restricción con un volumen final de 50 µl son:

 INSTITUTO NACIONAL DE SALUD	PROCESO INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA	MANUAL DE TECNICAS CONVENCIONALES PARA EL ESTUDIO DE LA ECOLOGÍA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DE HONGOS DE IMPORTANCIA CLÍNICA	Versión: 04
		MNL-R03.3150-001	2025-01-17
			Página 58 de 82

30 µl de producto de PCR
 1,0 µl Sau96I (5,000 U/ml)
 1,0 µl HhaI (20000 U/ml)
 5,0 µl de buffer NeBa (10X)
 0,5 µl BSA (100X)
 12,5 µl agua

Restricción:

- La restricción se realiza a 37°C toda la noche en baño de María
- Los productos de amplificación se corren en geles de agarosa al 2,5% con 20µl de bromuro de etidio (0,5mg/ml). El gel se corre a 80 V durante 2,5 horas.

11.7.7. Ultra Clean DNA Soil

Catálogo No 12800-100-s MO-BIO Laboratorios

Fundamento: se emplea para el aislamiento de ADN de muestras de suelo, éste estuche es solo para propósitos de investigación únicamente, no para uso diagnóstico.

Materiales:

- Microcentrífuga (10.000x g)
- Pipeta (volúmenes de 50-500 ml)
- Vórtex

Contenido del estuche (para 2 muestras):

Solución con perlas (550 ml de solución)	Solución	2 ml
S1		120 ml
Solución IRS		400 ml
Solución S2		500 ml
Solución S3		2 ml
Solución S4		600 ml
Solución S5		100 ml

- Unidades filtradoras en tubos de 1,9 ml
- Tubos ependorf (1,9 ml)

Almacenamiento del estuche: temperatura ambiente.

Precauciones:

- Use guantes
- Evite el contacto directo con todos los reactivos
- Si existe contacto con ojos o piel, lave con abundante agua
- Asegúrese de que los tubos con la solución de perlas roten libremente en la centrífuga, evitando roces
- CUIDADO, la solución S4 contiene etanol, el cual es inflamable

Técnica:

(No olvide utilizar guantes)

- Anotar el procedimiento realizado en el respectivo cuaderno de trabajo
- En la solución de 2 ml de perlas provistos por el estuche, añadir 0,25 g de la muestra de suelo

 INSTITUTO NACIONAL DE SALUD	PROCESO INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA	MANUAL DE TÉCNICAS CONVENCIONALES PARA EL ESTUDIO DE LA ECOLOGÍA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DE HONGOS DE IMPORTANCIA CLÍNICA	Versión: 04
		MNL-R03.3150-001	2025-01-17
			Página 59 de 82

(para muestras más grandes la cantidad puede aumentar hasta 10 gramos utilizando el estuche Mega Prep., No catálogo 12900-10)

- Agitar suavemente en vortex
- Añadir 60 ml de la solución S1 y mezclar por inversión una sola vez
- Añadir 200 ml de la solución IRS (solución removedora de inhibidores). Solamente se requiere si el DNA va a ser usado para PCR
- Asegurar los tubos horizontalmente sobre un soporte plano con tapa y agitar con vortex a su máxima velocidad durante 20 minutos. Alternativamente, se puede usar un agitador de perlas. Nota: Si se usa un agitador de perlas, revise el tiempo con las instrucciones del fabricante. Alternativamente, después de la adición de S1, agite en vortex de 3 a 4 segundos, luego caliente a 70°C por 5 minutos. Agite nuevamente de 3 a 4 segundos en vortex, repita esta operación 2 veces
- Asegurarse que los tubos con 2 ml de solución roten libremente en su centrífuga, evitando el roce. Centrifugue estos tubos a 10.000 x g (7.000 rpm) durante 30 segundos. **CAUTION** asegurarse de no exceder los 10.000 x g o los tubos pueden romperse
- Transferir el sobrenadante en un tubo de microcentrífuga limpio (proporcionado por el estuche). Nota: Con 0,25 g de suelo y dependiendo del tipo, se esperan 400 a 450 ml de sobrenadante. Este sobrenadante puede incluir algunas partículas de suelo
- Añadir 250 ml de la solución S2, agitar en vortex durante 5 minutos. Incubar a 4°C por 5 minutos
- Centrifugar los tubos por 1 minuto a 10.000 g
- Evitando el botón, transferir 450 ml del sobrenadante a un tubo de microcentrífuga limpio proporcionado por el estuche)
- Añadir 900 ml de la solución S3 al sobrenadante y agitar por vortex durante 5 segundos.
- Cargar aproximadamente 700 ml en la unidad filtradora y centrifugue a 10.0xg durante 1 minuto. Descartar lo filtrado y repetir este paso. Nota: Se requiere un total de dos cargas por muestra procesada
- Añadir suavemente 300 ml de la solución S4 y centrifugar por 30 segundos a 10.000xg.
- Descartar el filtrado (no el filtro)
- Centrifugar de nuevo por 1 minuto
- Cuidadosamente colocar la unidad filtradora en un tubo limpio (provisto por el estuche)
- Añadir suavemente 50 ml de la solución S5 al centro de la membrana
- Centrifugar 30 segundos o Descartar la unidad filtradora. El ADN en el tubo está listo para su uso. Ningún otro paso es requerido
- Se recomienda almacenar el ADN congelado (-20°C). La solución S5 no contiene EDTA

Guía de problemas

Concentrando el ADN

Su volumen final será de 50 ml. Si está muy diluido para sus propósitos, añada 1 ml de NaCl 5M y mezcle. Luego añada 100 ml de etanol glacial 100%. Mezcle. Centrifugue a 10.000xg por 5 minutos. Decante todo el contenido. Deje secar el etanol restante a temperatura ambiente o en un desecador. Resuspenda el ADN precipitado en el volumen deseado.

11.7.8. Fenol saturado con Tris-EDTA

Materiales:

- Fenol en cristales
- Tris-HCl 0,5M pH 8,0
- Tris-HCl 0,2M pH 8,0
- m-mercaptoetanol
- Pipetas de 10 ml
- Pipeteador
- Baño de María

 INSTITUTO NACIONAL DE SALUD	PROCESO INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA	MANUAL DE TÉCNICAS CONVENCIONALES PARA EL ESTUDIO DE LA ECOLOGÍA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DE HONGOS DE IMPORTANCIA CLÍNICA	Versión: 04
		MNL-R03.3150-001	2025-01-17
			Página 60 de 82

- Agitador magnético

El fenol es altamente corrosivo y puede causar quemaduras severas. Usted necesita protegerse con guantes, ropa especial y gafas de seguridad cuando manipule el fenol. Todas las manipulaciones deber llevarse a cabo en cabinas de extracción. Si en algún momento tiene contacto con el fenol, puede lavar con grandes cantidades de agua y agua con jabón y agua. Nunca utilice etanol

Técnica:

- Equilibrio del fenol: el fenol debe equilibrarse a un pH > 7,8 antes de ser utilizado porque encaso contrario el ADN podría romperse en la fase orgánica a un pH ácido
- Si el fenol viene sólido, disuélvalo completamente en baño María a 68°C
- Verificar que el fenol esté en fase líquida (color claro o transparente). Si el fenol es de color rosado, no debe ser usado para la extracción
- Adicione un volumen igual de buffer (Tris HCl 0,5 M pH 8,0). Ponga a disolver muy bien esta mezcla usando agitador magnético, por lo menos 1 hora
- Apagar el agitador. Cuando las dos fases se hallan separado, aspirar la mayor cantidad posible de la fase superior (acuosa) que corresponde al buffer
- Adicionar un volumen igual de Tris HCl 0,1 M pH 8,0 al fenol. Mezclar con un agitador magnético durante 15 minutos. Retirar del agitador. Cuando las dos fases se hallan separado, retirar la fase superior como se describe en el paso 5. Repetir este procedimiento hasta que el pH de la fase fenólica sea 7,8
- Una vez se halla equilibrado el fenol y la fase acuosa final halla sido removida, adicionar 0,1 volúmenes de Tris HCl 0,1 M pH 8,0 que contiene 0,2% de m-mercaptoetanol
- El fenol debe almacenarse bajo estas condiciones: en Tris HCl 0,1 M pH 8,0 en un frasco oscuro, a 4°C durante un período máximo de un mes

11.7.9. Determinación de la pareja sexual mediante PCR

Anotar el procedimiento realizado en el respectivo cuaderno de trabajo

Materiales:

- ADN genómico (3 ul) éste ADN puede ser extraído por el método de las perlas de vidrio o por ebullición
- Buffer de PCR 1X: Tris-HCl 10 mM pH 8,3, cloruro de potasio 50 mM (Corpogen)
- Cloruro de magnesio 3 mM (Corpogen)
- Deoxinucleotidos (dNTPs): 0,2 mM de cada uno (dATP, dTTP, dCTP, dGTP (Promega)
- Iniciadores (0,2 uM): MfaU: TTCACTGCCATCTTCACCACC
- MFaL: TCTAGGCGATGACACAAAGGG
- MFa2U 5': ACACCGCCTGTTACAATGGA C-3'
- MFa2L 5' CAGCGTTTGAAGATGGACTT T-3'
- Amplitaq DNA polimerasa (2,5 U/ul) (Corpogen)
- Agua de PCR

Cepas control:

INS H0058-1962 (CBS 884, serotipo A, pareja sexual "α") INS H0058-1971 (CBS 6989, serotipo B, pareja sexual "a") INS H0058-1127 (JEC20, serotipo D, pareja sexual "a")

INS H0058-1128 (JEC21, serotipo D, pareja sexual "α")

Estas cepas fueron suministradas por Dee Carter de la Universidad de Sydney Australia.

Técnica:

Se realiza una PCR para determinar cada pareja sexual

 INSTITUTO NACIONAL DE SALUD	PROCESO INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA	MANUAL DE TECNICAS CONVENCIONALES PARA EL ESTUDIO DE LA ECOLOGÍA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DE HONGOS DE IMPORTANCIA CLÍNICA	Versión: 04
		MNL-R03.3150-001	2025-01-17
			Página 61 de 82

PCR pareja sexual “α”

Cada reacción de PCR se realiza en un tubo de 0,5 mL con un volumen final de 50 µl quien contiene:16,28 µl de la mezcla máster que contenga:

Reactivo	Cantidad x1
Buffer de PCR 10 X	5 µl
dNTPS	5 µl
MgCl ₂	3 µl
MfaU	1,2 µl
MFaL	1,58 µl
Taq	0,5 µl
Agua desionizada estéril	30,72 µl
ADN	3 µl

PCR pareja sexual “a”

Cada reacción de PCR se realiza en un tubo de 0,5 mL con un volumen final de 50 µl que contiene:22 µl de la mezcla master que contenga:

Reactivo	Cantidad x1
Buffer de PCR 10 X	5 µl
dNTPS	5 µl
MgCl ₂	1,5 µl
Mfa2U	5 µl
Mfa2L	5 µl
Taq	0,5 µl
Agua desionizada estéril	27 µl
ADN	1 µl

Las reacciones de PCR para la pareja sexual “alfa” y “a” se realizan en un termociclador LabLine

<i>Denaturación inicial</i>	<i>94°C durante</i>	<i>5 minutos</i>
<i>30 ciclos</i>		
<i>Denaturación</i>	<i>94°C durante</i>	<i>1 minuto</i>
<i>Anillamiento</i>	<i>55°C durante</i>	<i>1 minuto</i>
<i>Extensión</i>	<i>72°C durante</i>	<i>1 minuto</i>
<i>1 ciclo final de extensión</i>	<i>72°C durante</i>	<i>7 minutos</i>
<i>Ciclos de enfriamiento</i>	<i>4°C durante</i>	<i>24 horas</i>

Los productos de PCR se visualizan en un gel de agarosa 2,5% y se corre a 100 V durante 1 hora

11.7.10. Extracción de ADN de levaduras y hongos filamentosos a partir de cultivos puros

 INSTITUTO NACIONAL DE SALUD	PROCESO INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA	MANUAL DE TECNICAS CONVENCIONALES PARA EL ESTUDIO DE LA ECOLOGÍA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DE HONGOS DE IMPORTANCIA CLÍNICA	Versión: 04
		MNL-R03.3150-001	2025-01-17
			Página 62 de 82

(VELGRAKI/MEYER)

Materiales:

- Buffer de lisis SDS 100 ml:(SDS 0,5 g, NaCl 1,4g, EDTA 0,73 g, Tris-HCl 1M 20 ml)
- Fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (v:v:v 25:24:1)
- Cloroformo: alcohol isoamílico (v:v 24:1)
- Isopropanol
- Etanol 70%
- Agua estéril

Técnica:

- Anotar el procedimiento realizado en el respectivo cuaderno de trabajo
- Transferir una pequeña cantidad de células levaduriformes o micelio y biomasa de esporas (*) a un tubo eppendorf con 500 ml de agua estéril
- Centrifugar a 14,000 rpm durante 10 minutos
- Descartar el sobrenadante
- Macerar el sedimento en nitrógeno líquido
- Adicionar 500 ml de tampón SDS e incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente (ta) con agitación constante
- Adicionar 500 ml de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (v:v:v: 25:24:1) y mezclar uniformemente durante 2 minutos hasta obtener una suspensión homogénea
- Centrifugar a 10,500 rpm a 4°C durante 20-30 minutos
- Remover la fase acuosa superior y mezclarla con un volumen igual de cloroformo o con un volumen igual de cloroformo: alcohol isoamílico (v:v 24:1)
- Centrifugar a ta durante 15 minutos a 14,000 rpm
- Precipitar el sobrenadante con un volumen igual de isopropanol a -20°C durante 15 a 30 minutos (la precipitación del ADN durante toda la noche a -20°C da mejores resultados)¹
- Centrifugar a 14,000 rpm durante 15 minutos a ta
- Lavar el sedimento con 70% de una solución acuosa de etanol
- Centrifugar a 14,000 rpm durante 15 minutos
- Descartar el sobrenadante
- Secar el sedimento
- Resuspender el ADN en 100 ml de agua destilada estéril
- Determinar la concentración de ADN y diluir según sea necesario

Nota:

Usar un asa estándar de 10 ml. Para los hongos filamentosos, adicionar 500 ml de agua destilada estéril y raspar la superficie con el asa para recuperar las hifas y las esporas de la superficie del agar, evitando tomar trozos de agar y transferir este material a un tubo de vidrio para ajustar la concentración según la escala de McFarland 1-2. Transferir a un tubo eppendorf y continuar con el procedimiento desde el paso 2.

¹ No siempre se requiere

11.7.11. PCR para identificación de especies de *Candida*

Anotar el procedimiento realizado en el respectivo cuaderno de trabajo

Estuche para la identificación de *Candida albicans*, *C.dubliniensis*, *C.glabrata*, *C.parapsilosis* (subtipos 1, 2, 3), *C.krusei*, *C.tropicalis*

Materiales:

- Tubo 1 Mezcla master 66
- Tubo 2 Mezcla master 29
- Tubo 3 Agua estéril

 INSTITUTO NACIONAL DE SALUD	PROCESO INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA	MANUAL DE TÉCNICAS CONVENCIONALES PARA EL ESTUDIO DE LA ECOLOGÍA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DE HONGOS DE IMPORTANCIA CLÍNICA	Versión: 04
		MNL-R03.3150-001	2025-01-17
			Página 63 de 82

- Tubo 4 Agua estéril

Técnica:

11.7.11.1. Preparación del ADN de los aislamientos

- Resuspender 1 asada de células de levaduras en 100 µl de TE
- Congelar la mezcla de levaduras a -20 °C durante 10 minutos
- Dejar descongelar y usar 5 mL para la reacción de PCR

11.7.11.2. Preparar mezcla máster y usar para cada reacción

- 11 µl mezcla master 66 ó 29
- 5 µl ADN o suspensión celular
- 0,25 µl Ampli Taq Gold TM polimerasa
- 33 µl agua estéril

La mezcla master contiene suficiente cantidad para evaluar 50 muestras con cada mezcla

11.7.11.3. Condiciones de PCR

Denaturación inicial	95°C durante	15 minutos
35 ciclos		
Denaturación	95°C durante	30 segundos
Anillamiento	55°C durante	30 segundos
Extensión	72°C durante	30 segundos
Ciclos de enfriamiento	4°C durante	24 horas

11.7.11.4. Electroforesis en gel de Agarosa

Procedimiento:

- Preparar un gel al 3%
- Adicionar a cada pozo 10 µl de cada muestra e incluir un marcador de peso molecular de 50pb
- Para determinar cuál especie de levadura fue identificada, comparar los fragmentos amplificados por PCR con el marcador de peso molecular (Tabla). En cada caso el fragmento de control interno de 923 pb indica si las condiciones de la PCR fueron óptimas para la amplificación del ADN
- Peso molecular de las especies de *Candida* identificadas mediante la PCR

Especie identificada	Master Mix 66	Master Mix 29
<i>C.albicans</i>	168 pb	
<i>C.dubliniensis</i>	200 pb	
<i>C.tropicalis</i>	298 pb	
<i>C.krusei</i>	496 pb	
<i>C.parapsilosisII</i>		403 pb
<i>C.parapsilosis I</i>		151 pb
<i>C.parapsilosis III</i>		330 pb
<i>C.glabrata</i>		248 pb
Control interno	923 pb	923 pb

11.7.12. PCR para la detección del gen de la Fosfolipasa B

Materiales:

- ADN genómico (3,75 µl) este ADN puede ser extraído por el método de las perlas de vidrio
- Buffer de PCR 10X: Tris-HCl 10 mM pH 8,3, cloruro de potasio 50 mM (Corpogen)

 INSTITUTO NACIONAL DE SALUD	PROCESO INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA	MANUAL DE TÉCNICAS CONVENCIONALES PARA EL ESTUDIO DE LA ECOLOGÍA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DE HONGOS DE IMPORTANCIA CLÍNICA	Versión: 04
		MNL-R03.3150-001	2025-01-17
			Página 64 de 82

- Cloruro de magnesio 25 mM (Corpogen)
- Acetato de magnesio (50mM)
- Deoxinucleótidos (dNTPs): 2 mM de cada uno (dATP, dTTP, dCTP, dGTP (Promega)
- Iniciadores (0,2 uM): PLB1CNR: 5_ GATTTGGCGTTGGTTTCAGT3_
PLB1CNF: 5_ CTTTCAGGCGGAGAGAGGTTT 3_
- Amplitaq DNA polimerasa (2,5 U/μl) (Corpogen)
- Agua de PCR

Cepas control:

- INS H0058-1106 (WM148, serotipo A, patrón molecular VNI)
- Estas cepas fueron donadas por el Laboratorio de investigación en micología molecular de la Universidadde Sydney, Australia.

Técnica:

Se realiza una PCR para determinar cada pareja sexual.

PCR

Cada reacción de PCR se realiza en un tubo de 0,5 ml con un volumen final de 25 μl que contiene:8,25 μl de la mezcla máster que contenga:

Reactivo	Cantidad x1
Buffer de PCR 10 X	2,5 μl
dNTPS	0,25 μl
MgAc	1,5 μl
MgCl ₂	0,75 μl
PLB1CNR	1,5 μl
PLB1CNF	1,5 μl
Taq	0,5 μl

11.7.12.1. Electroforesis en gel de Agarosa

Procedimiento:

- Preparar un gel al 1,4% en TBE 1X
- Adicionar a cada pozo 25 μl de cada muestra e incluir un marcador de peso molecular de 1Kb
- Correr el gel a 100 voltios por 1 hora
- En cada caso el fragmento a encontrar debe ser de 674pb

11.8. Protocolos para el estudio en modelo animal

11.8.1. Preparación del inóculo de *Cryptococcus Neoformans* o *Cryptococcus gattii* para pruebas de virulencia en ratones

Materiales:

- Aislamientos de *Cryptococcus neoformans* o *Cryptococcus gattii*
- Solución salina estéril
- Agar glucosado de Sabouraud
- Jeringas para tuberculina con aguja calibre 27
- Cámara de Neubauer

Técnica:

- Anotar el procedimiento realizado en el respectivo cuaderno de trabajo
- Sembrar, 48 horas antes de iniciar el procedimiento, en cajas de agar glucosado de Sabouraud el

 INSTITUTO NACIONAL DE SALUD	PROCESO INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA	MANUAL DE TECNICAS CONVENCIONALES PARA EL ESTUDIO DE LA ECOLOGÍA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DE HONGOS DE IMPORTANCIA CLÍNICA	Versión: 04
		MNL-R03.3150-001	2025-01-17
			Página 65 de 82

aislamiento que se va a inocular

- Ajustar la concentración del inóculo a 5×10^6 : para esto debe tomar $\frac{1}{4}$ de asada del aislamiento de la caja y diluirlo en 10ml de solución salina estéril, llevar una alícuota (10ul) de esta solución a la cámara de Neubauer y realizar el recuento de los cuatro
- Una vez se obtenga este valor, calcular el promedio de los cuatro cuadrantes, el resultado debe multiplicarse por el factor de dilución de la cámara que equivale a 10^4 . Los cálculos para determinar la concentración del inóculo se realizan partiendo del valor obtenido anteriormente y teniendo en cuenta la siguiente Fórmula:

Volumen inicial x concentración inicial = volumen final x concentración final

Para este caso particular:

Volumen inicial = (Volumen final x Conc. final) / Conc. inicial

- El valor que se obtenga será equivalente al volumen que se debe tomar del tubo del que se tomó la alícuota para la lectura
- Para confirmar el recuento en cámara, realice diluciones seriadas de la solución final hasta alcanza una dilución de 5×10^2 (aprox. 50 células), siembre 100ul de dicha dilución en cajas de agar glucosado de Sabouraud e incube a 27 °C durante 72 horas
- Cuente las colonias que hay en las cajas y multiplique el valor por el factor de dilución, este valor debe coincidir con el que usted calculó para preparar el inóculo inicialmente

11.8.2. Inoculación de ratones Balb/C vía intravenosa con *Cryptococcus Neoformans* o *Cryptococcus gattii*

Materiales:

- Ratones hembra Balb/C de seis semanas
- Jeringas para tuberculina con aguja calibre 27
- Inmovilizador de animales
- Alcohol
- Gasa estéril
- Calentador de ambiente

Técnica:

- Anotar el procedimiento realizado en el respectivo cuaderno de trabajo
- Registrar el peso de los animales a trabajar (5 por cada aislamiento)
- Colocar el calentador de ambiente cerca de las jaulas de los animales 15 minutos antes de comenzar con el procedimiento. El calentador se emplea para dilatar las venas de la cola del animal y facilitar la inoculación. En este procedimiento se recomienda inocular en alguna de las venas laterales de la cola, pues al dilatarse son más visibles que la superior y la inferior
- Colocar el ratón en el inmovilizador dejando la cola libre
- Una vez el ratón se haya colocado en el inmovilizador, girar la cola hasta visualizar la vena lateral, limpiar el área con alcohol y una gasa estéril e incida la piel de manera tangencial hasta alcanzar la vena (la incisión debe hacerse a una distancia de máximo 5mm de la raíz de la cola) y presionar el embolo hasta haber inoculado por completo el contenido (100ul). Una señal del éxito del procedimiento es la aparición de una o dos gotas de sangre luego de retirar la aguja del animal
- Una vez terminado el procedimiento volver a limpiar el área de la cola con alcohol y gasa estéril haciendo un poco de presión hasta que el sangrado desaparezca

Nota: Cuando se ha inoculado el animal, el seguimiento y observación debe hacerse a diariodurante el tiempo del estudio (70 días).

 INSTITUTO NACIONAL DE SALUD	PROCESO INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA	MANUAL DE TÉCNICAS CONVENCIONALES PARA EL ESTUDIO DE LA ECOLOGÍA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DE HONGOS DE IMPORTANCIA CLÍNICA	Versión: 04
		MNL-R03.3150-001	2025-01-17
			Página 66 de 82

11.8.3. Procesamiento de muestras de órganos a partir de ratones

Materiales:

- Órganos (pulmón, cerebro, hígado, bazo)
- Solución salina estéril
- Pipetas de 5ml
- Balanza
- Asas estériles
- Tubos tapa rosca de 20ml
- Equipo de disección
- Homogenizador de tejidos
- Cajas de agar glucosado de Sabouraud
- Cámara de eutanasia
- Solución de formaldehído al 10% tamponada (suministrada por el Laboratorio de Patología del INS)

Técnica:

Este procedimiento puede realizarse en dos ocasiones:

- Cuando el animal muestre síntomas de enfermedad, caso en el que se practicará eutanasia en cámara de CO₂
- Una vez haya muerto el animal

EUTANASIA

Para practicar la eutanasia a algún animal, es necesario que éste muestre síntomas de enfermedad, en este caso los síntomas que deben expresarse son:

- Inapetencia
- Arritmia
- Adinamia
- Pérdida de peso
- Erizamiento
- Indiferencia frente al medio

Si uno de los animales completa estos síntomas, debe practicarse eutanasia en cámara de CO₂ según los parámetros establecidos por el bioterio del Instituto Nacional de Salud (INS).

Obtención y procesamiento de los órganos:

- Una vez haya muerto el animal, se obtiene el pulmón, cerebro, hígado y bazo (los dos últimos, sólo en caso de presentar alteraciones visibles en tamaño o lesiones) mediante la práctica de la necropsia en la sala de máxima seguridad del bioterio del INS
- Procedimiento de necropsia
- Tomar al animal muerto y fijarlo por las patas, con agujas calibre 26, boca arriba a la superficie de disección
- Lavar toda la piel con alcohol
- Cortar con tijeras, en sentido longitudinal, la piel del ratón para descubrir los órganos y retirarla por completo
- Cortar cada uno de los órganos (pulmón, hígado y bazo), pesarlos y colocarlos separados en cajas de Petri vacías
- Para extraer el cerebro debe soltar al animal, colocarlo boca abajo y cortar con las tijeras la piel de la cabeza
- Cortar con tijeras la separación de los ojos y el espacio entre los ojos y las orejas, levante la cubierta ósea del cráneo empleando una pinza plana, y retirar el cerebro
- Registrar el peso y guarde el órgano en una caja de Petri vacía. Recuerde tomar 50% del órgano para recuento de unidades formadoras de colonia y 50% para estudio histopatológico

 INSTITUTO NACIONAL DE SALUD	PROCESO INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA	MANUAL DE TECNICAS CONVENCIONALES PARA EL ESTUDIO DE LA ECOLOGÍA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DE HONGOS DE IMPORTANCIA CLÍNICA	Versión: 04
		MNL-R03.3150-001	2025-01-17
			Página 67 de 82

Recuperación de unidades formadoras de colonia (UFC):

- Tomar el 50% del órgano y homogenizarlo en 10ml de solución salina estéril
- Preparar tres diluciones 10^0 , 10^2 y 10^4 del homogenizado y sembrar 100ul de cada una en cajas de agar glucosado de Sabouraud e incubar a 27 °C por 72 horas

Luego de este tiempo verificar la cantidad de UFC de cada órgano por recuento directo en lascas y expresar el resultado en términos de UFC/g de la siguiente manera:

Para hacer los cálculos tenga en cuenta lo siguiente:

- ✓ Si su recuento en caja se hizo a partir de la dilución 10^4 , multiplicar el valor por 10^5
- ✓ Si su recuento en caja se hizo a partir de la dilución 10^2 , multiplicar el valor por 10^3
- ✓ Si su recuento en caja se hizo a partir de la dilución 10^0 , multiplicar el valor por 10^1

Por ejemplo:

Peso del órgano: 0.5g

Recuento en caja: 15 UFC en la caja en que sembró la dilución 10^4 $15 \times 10^6 = 15'000.000$ UFC

Ahora con una regla de tres, si en 0.5g hay 15×10^6 UFC ¿cuántas habrá en 1g?

0,05g 15×10^6

1g x

X = UFC/gramo del órgano

Envío de muestras al laboratorio de patología:

Colocar el 50% de cada órgano en un tubo con suficiente solución de formaldehído al 10% tamponado y remitir al Laboratorio de Patología del INS con resumen de historia clínica que tenga los siguientes datos:

- Fecha
- Tipo y cantidad de inóculo
- Tipo de inmunosupresión
- Edad y sexo del animal

11.8.4. Inmunosupresión de ratones Balb/C con Triamcinolona (KENACORT® – LAB. SQIBB) durante 70 días

Materiales:

- Ratones hembra Balb/C de seis semanas (Kenacort® – Lab. Sqibb)
- Solución salina estéril
- Colorante de Wright y buffer para el colorante
- Reactivo de Turk
- Cámara de Neubauer
- Rejilla para ratones
- Jeringas para tuberculina con aguja calibre 27 o 26
- Agujas calibre 22
- Alcohol Gasa estéril
- Solución de iodine
- Calentador de ambiente
- Láminas portaobjetos
- Frascos ámbar de 5ml
- Tubos eppendorf

 INSTITUTO NACIONAL DE SALUD	PROCESO INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA	MANUAL DE TÉCNICAS CONVENCIONALES PARA EL ESTUDIO DE LA ECOLOGÍA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DE HONGOS DE IMPORTANCIA CLÍNICA	Versión: 04
		MNL-R03.3150-001	2025-01-17
			Página 68 de 82

Técnica:

Este procedimiento consta de varias partes que se describen a continuación.

Preparación del inmunosupresor:

El Kenacort viene en presentación de suspensión en frasco de 5ml (10mg/ml) por lo tanto hay que diluir esta preparación para lograr tomar las cantidades equivalentes pues la dosis de trabajo es 2mg/kg.

Solución A: Suspender, en un frasco ámbar de 5ml, 500ul de Kenacort en 4500ul de solución salina estéril, esta solución de 5ml quedará con una concentración de (1mg/ml), tape el frasco con el tapón correspondiente y almacene a temperatura ambiente.

Inoculación del inmunosupresor (Debe realizarse cada 8 días):

Registrar el peso del animal antes de iniciar, de acuerdo con este dato tomará la cantidad de inóculo correspondiente, por ejemplo:

El animal pesa 19,6g, en este caso la dosis sería de:

2mg - 1000gX -19.6g

$X = (19.6 \times 2) / 1000$

$X = 39.2 / 1000$

$X = 0.0392\text{mg}$

Significa que debe tomar en la jeringa para tuberculina 0,392ml de la solución A, como el valor es inexacto, aproxime al siguiente decimal, es decir deberá tomar 0,4ml de la solución A.

Tomar la rejilla para ratones y ubicar al animal sobre ella, siga los pasos que indica la **Figura 5** para preparar al animal e inocularlo.

La inoculación debe hacerse en la zona inferior izquierda o derecha del abdomen, paralela a la piel de manera que el inóculo se ubique justo bajo ella.

La señal que indica el éxito del procedimiento es la formación de una “burbuja” en el lugar donde se inyectó al animal.



Figura 5. Diagrama de inoculación

Seguimiento y control de la inmunosupresión:

- Colocar el calentador de ambiente cerca de las jaulas 15 minutos antes de comenzar, tomar el animal y colóquelo sobre la rejilla, levantar la cola y localizar la vena inferior de la cola, limpiar el área cercana a la raíz de la cola (aprox. 5mm hacia abajo) con alcohol y una gasa estéril.
- Tomar la aguja calibre 22 y realizar una punción sobre la vena (con esta punción logrará obtener

 INSTITUTO NACIONAL DE SALUD	PROCESO INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA	MANUAL DE TECNICAS CONVENCIONALES PARA EL ESTUDIO DE LA ECOLOGÍA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DE HONGOS DE IMPORTANCIA CLÍNICA	Versión: 04
		MNL-R03.3150-001	2025-01-17
			Página 69 de 82

aproximadamente 3 a 4 gotas de sangre), con una pipeta graduada, tomar 20ul de sangre y mezclar en un tubo eppendorf con 380ul de reactivo de Turk y agitar la mezcla.

- En una lámina portaobjetos colocar una gota de sangre y con otra lámina extienda la sangre como se muestra en la **Figura 6**.

Lectura e interpretación de las láminas:

Una vez haya tomado las muestras, deben procesarse y leerse de acuerdo con los siguientes criterios.

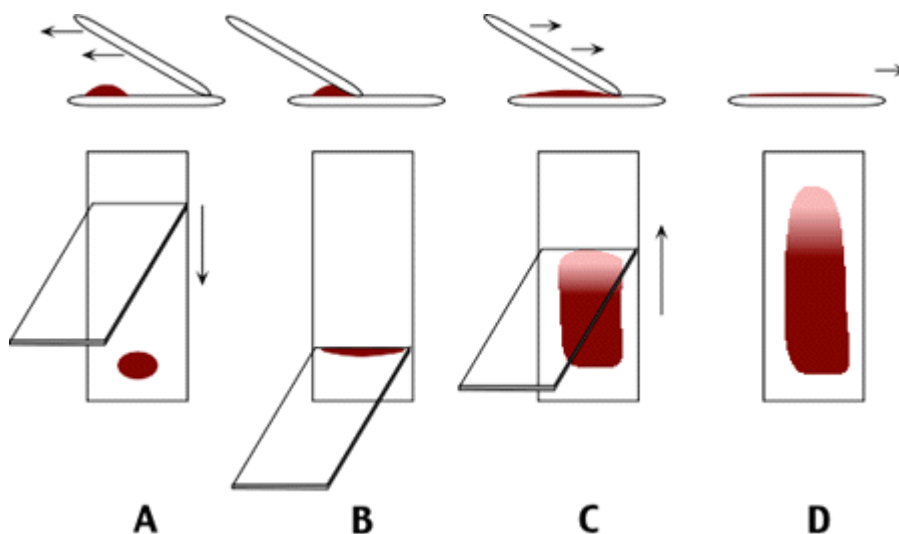


Figura 6. Diagrama para la realización de un extendido de sangre

Muestra con reactivo de Turk:

- Tomar una alícuota (10 – 15ul) del tubo que contiene la mezcla de sangre y reactivo de Turk y hacer el recuento en los cuatro cuadrantes de la cámara de Neubauer.
- Una vez registrado el valor obtenido en cada uno de los cuadrantes, sumar los cuatro valores y multiplicar el resultado por cincuenta:

$$\text{Recuento total de células blancas} = (C1 + C2 + C3 + C4) \times 50$$

El valor normal para un recuento total en sangre de ratón debe estar entre 7500 y 9500 células.

Extendido de sangre:

- Una vez tomada la muestra, colorearla con reactivo de Wright; cubrirla con el colorante durante 3min.
- Añadir algunas gotas de buffer Wright y soplar sobre las muestras durante 5 min, debe aparecer sobre las láminas un brillo metálico, lavar la lámina con agua y dejarla secar a temperatura ambiente, una vez haya secado, limpiar la parte posterior de la lámina y leerla el microscopio a 100X.

Valores de linfocitos, monocitos, eosinófilos y neutrófilos de diferentes especies de mamíferos:

 INSTITUTO NACIONAL DE SALUD	PROCESO INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA	MANUAL DE TECNICAS CONVENCIONALES PARA EL ESTUDIO DE LA ECOLOGÍA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DE HONGOS DE IMPORTANCIA CLÍNICA	Versión: 04
		MNL-R03.3150-001	2025-01-17
			Página 70 de 82

Diferencial. (%)	Cobayo	Hámster	Rata	Ratón
Neutrófilos	28-44	17-30	10-30	10-40
Linfocitos	39-72	50-81	65-85	55-95
Monocitos	2-6	0-3	0-5	1-4
Eosinófilos	0-5	0-4	0-6	0-4
Basófilos	0-3	0-1	0-1	0-1
Plaquetas (x1000)	250-850	200-500	500-1300	160-410

El registro semanal de los datos y la comparación con las tablas le ayudaran a monitorear el estado inmunológico de los animales.

11.9. Procesamiento de muestras ambientales para el aislamiento de *Candida auris*

Este procedimiento se emplea para el procesamiento de muestras recolectadas en el ambiente hospitalario

11.9.1 Preparación de caldo selectivo Sabouraud-dextrosa-salino

Formula

Caldo Sabouraud dextrosa	30 g
Cloruro de Sodio (NaCl)	100 g
Cloranfenicol	50 mg
Gentamicina	50 mg
Agua destilada	1000 ml

Preparación:

- Disolver los 30 gramos de caldo Sabouraud dextrosa y 100 gramos de NaCl en 1000 ml de agua destilada. Adicionar la gentamicina y el cloranfenicol (50 mg/L concentración final). Mezclar bien, ajustar a pH 5,6 y filtrar a través de filtro con poro de 0,2 µl
- Alternativamente: disolver 30 gramos de caldo Sabouraud dextrosa y 100 gramos de NaCl en 1000 ml de agua destilada. Mezclar bien, distribuir en frascos con barras magnéticas, esterilizar por autoclave, enfriar a 50 °C y adicionar gentamicina y cloranfenicol (50 mg/L concentración final), mezclar y ajustar pH a 5,6
- Nota: si no se dispone de gentamicina, se puede emplear penicilina (50 mg)

11.9.2. Protocolo para la toma de muestras ambientales de superficie para el aislamiento de *Candida auris*

- Establecer una ruta de muestreo de acuerdo con la previa revisión de las historias clínicas de los pacientes involucrados, con el fin de determinar aquellas áreas en las cuales ha habido circulación de pacientes colonizados o infectados
- Para cada área de muestreo establecida, se dividió el ambiente en 4 zonas: zona 1, la más próxima al paciente (cama, colchón, almohadas, ropa cama, celular); zona 2, equipos médicos (bombas, estetoscopio, monitores, etc); zona 3, elementos cercanos al paciente (sillas, escalerillas, mesas, closet, etc); zona 4, zona más aislada del paciente (baño, puerta)
- Realizar el muestreo en cada zona con la ayuda de esponjas (3M Sponge sticks, ver **Figura 7**), frotándola en todas las direcciones sobre la superficie

 INSTITUTO NACIONAL DE SALUD	PROCESO INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA	MANUAL DE TECNICAS CONVENCIONALES PARA EL ESTUDIO DE LA ECOLOGÍA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DE HONGOS DE IMPORTANCIA CLÍNICA	Versión: 04
		MNL-R03.3150-001	2025-01-17
			Página 71 de 82



Figura 7. Esponjas 3M para muestreo ambiental

- Las muestras de los contactos pueden ser tomadas con los escobillones de medios de transporte como el Cary Blair; se recomienda tomar muestra de axilas, fosas nasales, oídos, boca, ingle y manos.
- Una vez las muestras sean transportadas al laboratorio se recomienda conservarlas a 4 °C hasta su procesamiento.

11.9.3 Procesamiento de muestras recolectadas en el ambiente hospitalario

Materiales:

- PBS 1X
- Tubos Falcon 50 ml
- Caldo Sabouraud dextrosa salino
- Asas 10 µl
- Puntas 200 µl
- Pipetas 200 µl

Técnica:

- Desprender cada esponja de su soporte; adicionar 30 ml de PBS 1X a la bolsa que contiene la esponja y sellar nuevamente
- Agitar la bolsa vigorosamente (con la ayuda de un equipo Stomacher) durante mínimo 3 minutos
- Transferir el sobrenadante a un tubo Falcon de 50 ml y centrifugar a 13000 RPM durante 15 minutos
- A un tubo que contenga 7 ml de caldo Sabouraud + 10% de NaCl + antibióticos, asegurando que en el tubo quede un 80% del volumen en aire, adicionar 1 ml del precipitado resultante del paso anterior
- Incubar a 40 °C, 200 rpm, por un tiempo mínimo de 48 horas (se recomienda dejar los tubos hasta por 7 días en este paso).
- En aquellos tubos donde se observe turbidez, sembrar 100 µl en una caja de agar Sabouraud + 10% de NaCl + antibióticos, e incubar a 30 °C durante 7 días
- Las muestras tomadas a partir de los contactos se procesan de la misma manera descrita para las muestras ambientales, y adicionalmente se siembra el escobillón directamente en una placa de

 INSTITUTO NACIONAL DE SALUD	PROCESO INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA	MANUAL DE TÉCNICAS CONVENCIONALES PARA EL ESTUDIO DE LA ECOLOGÍA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DE HONGOS DE IMPORTANCIA CLÍNICA	Versión: 04
		MNL-R03.3150-001	2025-01-17
			Página 72 de 82

agar Sabouraud + 10% de NaCl + antibióticos

11.10. PCR convencional para la identificación de *Candida auris*

Este procedimiento se emplea para realizar la identificación molecular de *Candida auris* a través de la técnica Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) convencional.

Materiales:

- Erlenmeyer o botellas de 250 mL o de 500 mL
- Asas bacteriológicas desechables de 10 uL
- Marcador permanente de punta fina
- Toallas de papel
- Puntas Azules de 100 µl - 1000 µl
- Puntas amarillas de 0,5 µl - 200 µl
- Puntas blancas de 0,5 µl - 20 µl
- Tubos de PCR de 0,2 ml y 1,5 ml
- Gradilla para tubos de 0,2 ml y 1,5 ml
- Rack flotante para tubos de PCR
- Guantes desechables de nitrilo
- Mascara de seguridad para químico

Reactivos:

- Agar Sabouraud
- Agua calidad molecular
- Buffer de Lisis (60mM de Bicarbonato de sodio NaHCO₃, Cloruro de potasio KCL 250mM y Tris 50mM), pH 9,5
- Fenol-Cloroformo-alcohol isoamílico
- Isopropanol
- Etanol al 70%
- Buffer de PCR
- MgCl₂ 50mM
- Taq polimerasa 5U / µL
- Iniciadores CauF, CauR
- dNTPs 20mM (ver **Anexo 1**)
- Marcador de peso molecular de 100pb
- Agarosa ultrapura Invitrogen
- Buffer TBE 1X
- Bromuro de etidio 0,5 µg/ml
- Buffer de carga
- Marcador de peso molecular (MPM)
- Controles y materiales de referencia
- Primers específicos para *Candida auris* Kordalewska, 2017
CauF 10 µM 5' CGCACATTGCGCCTTGGGGTA-3'
CauR 10 µM 5' GTAGTCCTACCTGATTTGAGGCGAC-3'

Cepas control:

- Control Positivo: GMR-OM236 – 2016
- Control Negativo: Cepa de *Candida* no *auris*

 INSTITUTO NACIONAL DE SALUD	PROCESO INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA	MANUAL DE TÉCNICAS CONVENCIONALES PARA EL ESTUDIO DE LA ECOLOGÍA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DE HONGOS DE IMPORTANCIA CLÍNICA	Versión: 04
		MNL-R03.3150-001	2025-01-17
			Página 73 de 82

Técnica:

11.10.1. Cultivo para aislamiento

- Sembrar el aislamiento en Agar Sabouraud por aislamiento, e incubar la muestra sembrada con una condición atmosférica $27\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$, donde se observa un crecimiento a las 24h
- Del cultivo anterior tomar una colonia y resiembra de la misma forma, incubar 24h y tomar una asada de 10 μL para realizar la extracción

11.10.2. Extracción de ADN

- Limpiar cabina de bioseguridad clase II para cultivos (extracción ADN), con etanol al 70% y alistar el material necesario para la extracción: asas de 10 μL , tubos para PCR, marcador permanente, guantes de nitrilo, gradilla para tubos PCR, rack flotante para tubos de PCR, puntas azules de 100 μL - 1000 μL
- Encender la lámpara UV de la Cabina de bioseguridad clase I por 15 minutos
- Dejar 5 minutos abierta la cabina para circulación de aire y colocar las cajas con los aislamientos para la extracción
- Marcar los tubos de PCR con el número interno correspondiente a la cepa a identificar
- Tomar colonias aisladas del microorganismo en estudio con un asa calibrada de 10 μL (una asada y eliminar los restos de los bordes)
- Colocar el aislamiento en la pared del tubo de PCR previamente marcado
- Llevar los tubos de PCR al congelador $-20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ dejar durante 1 hora (si no realiza la extracción el mismo día, se pueden dejar almacenados los aislamientos a esa temperatura hasta por 24 horas, luego retomar la extracción)
- Retirar los tubos del congelador y llevar a temperatura ambiente ($15\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante el tiempo de adición del buffer de lisis), en cabina adicionar 500 μL de Buffer de Lisis a cada tubo
- Homogenizar en vórtex durante 1 minuto (verificar que esté completamente homogenizado)
- Incubar los barcos con los tubos de PCR en el baño serológico a $64\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 minutos aproximadamente
- Repetir pasos anteriores 1 vez más para terminar de lisar la pared de la levadura (desde homogenizar en vórtex hasta incubar en baño serológico durante otros 30 minutos)
- Sacar los tubos de PCR del baño serológico
- Adicionar a cada tubo 500 μL de fenol-Cloroformo-alcohol isoamílico
- Homogenizar en vórtex durante 2 minutos (verificar que esté completamente homogenizado)
- Centrifugar 15 minutos en la centrifuga previamente encendida a 14000rpm
- Transferir el sobrenadante del tubo de PCR a un tubo nuevo de PCR de 1,5ml debidamente marcado
- Adicionar 500 μL de Isopropanol (adicionar cantidades iguales al sobrenadante)
- Homogenizar, llevar los tubos de PCR al congelador de $-20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 1 hora (si no se puede continuar la extracción el mismo día dejar almacenados los aislamientos ahí en $-20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ máximo durante 24h, luego retomar la extracción)
- Centrifugar 15 minutos a 14000rpm
- Descartar el sobrenadante de los tubos de PCR
- Adicionar 500 μL de Etanol 70%
- Descartar el sobrenadante completamente
- Colocar los tubos de PCR boca abajo para dejar secar en la cabina de bioseguridad clase I o a temperatura ambiente durante 1 hora
- Adicionar 50 μL de TE para resuspender el ADN
- Almacenar en Nevera con tolerancia de $5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ los tubos de PCR

11.10.3. Cuantificación del ADN

 INSTITUTO NACIONAL DE SALUD	PROCESO INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA	MANUAL DE TECNICAS CONVENCIONALES PARA EL ESTUDIO DE LA ECOLOGÍA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DE HONGOS DE IMPORTANCIA CLÍNICA	Versión: 04
		MNL-R03.3150-001	2025-01-17
			Página 74 de 82

- En el *NanoDrop* realizar un ciclo de blanqueo, colocar con ayuda de micropipeta, 1 µl a 2 µl de solución blanco (agua tipo II) en el pedestal inferior del equipo, luego baje el brazo, para verificar que los pedestales estén bien limpios
- Dar clic en blanco y espere que termine la medición para saber la cantidad de ADN
- Después de cada medición, limpiar ambos pedestales con una toalla nueva para evitar la acumulación de residuos
- Colocar con ayuda de micropipeta, 1 µl a 2 µl de ADN a cuantificar, bajar el brazo y dar clic en medición
- Cuando termine la medición de la muestra, aparece el espectro y los valores proporcionados
- Cuando termine de cuantificar las muestras, dar clic en finalizar experimento

11.10.4. Ajuste del ADN

- Ajustar concentración de ADN a 10 ng/µl con agua grado molecular estéril (agua tipo I)
- Tomar el valor inicial de lectura del *Nanodrop* de cada aislamiento, pasar a una concentración de 500 ng/µl y luego ajustar la concentración de ADN a 10 ng/µl
- Si la concentración de ADN esta menor de 10 ng/µl se recomienda repetir el proceso de extracción ya que la concentración no es la indicada para el procedimiento de amplificación
- Almacenar los ADN en nevera con tolerancia de 5 °C ± 3 °C mientras se realiza la mezcla para la identificación específica para *Candida auris* o hasta por 72 horas, si no se continua con el proceso el mismo día

11.10.5. Preparación del máster mix

- Empleando la siguiente tabla, determine la cantidad de tubos a utilizar dependiendo del número de aislamientos a ensayar, tenga en cuenta los controles positivos
- Limpiar cabina de bioseguridad clase II (preparación de máster mix), con etanol al 70%, alistar el material: agua calidad molecular estéril, guantes de nitrilo, puntas con barrera y tubos de PCR 0,2mL estériles para colocar el producto en el termociclador y tubos de PCR de 1,5 mL o 2 mL estériles para colocar la mezcla de la master mix, colocar en luz UV por 15 minutos
- Marcar los tubos de PCR con el número que le corresponde a cada muestra, control positivo, control negativo y muestras a identificar
- Cinco minutos después de que finalice la luz UV, llevar los reactivos para la preparación del máster mix en un módulo de enfriamiento
- Dentro de la cabina preparar el máster mix, dispensando los reactivos en un tubo estéril de microcentrifuga en el siguiente orden: agua calidad molecular, buffer, MgCl₂, dNTPs, iniciadores y Taq polimerasa. Tener en cuenta las cantidades descritas en la tabla siguiente. En esta tabla se describe la cantidad de reactivo por reacción, por lo tanto, según el número de reacciones a preparar multiplique las cantidades
- Mezclar usando vortex
- Para concentrar el contenido del máster mix, dar un pulso en la microcentrifuga
- Dispensar 7,1 µL de agua calidad molecular a cada microtubo de 0,1 ml previamente marcado
- Adicionar 5,9 µL de la máster mix a cada microtubo

Mezcla para identificación específica para *Candida auris*:

Componentes PCR	1 reacción (µl)
Buffer 10 X	3 µL
MgCl ₂ 50mM	1,5 µL
dNTPs 20mM	0,3 µL
CauF 10 µM	0,5 µL

 INSTITUTO NACIONAL DE SALUD	PROCESO INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA	MANUAL DE TECNICAS CONVENCIONALES PARA EL ESTUDIO DE LA ECOLOGÍA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DE HONGOS DE IMPORTANCIA CLÍNICA	Versión: 04
		MNL-R03.3150-001	2025-01-17
			Página 75 de 82

CauR 10 µM	0,5 µL
Taq 5U / µL	0,12 µL
ADN	2 µL
Volumen final	15,0 µL

11.10.6. Adición de ADN

- Sacar los ADN de la nevera con tolerancia de 5 °C ± 3 °C
- Limpiar la cabina con etanol al 70% y disponga los materiales para la adición de ADN a las mezclas: puntas estériles, guantes de nitrilo libre de talco y marcador permanente. Colocar en luz ultravioleta (UV) por 15 minutos
- Cinco minutos después de que finalice la luz UV, llevar las mezclas en módulo de enfriamiento o hielo
- Llevar los ADN incluyendo el control positivo y negativo, agitar por 5 segundos aproximadamente y tomar 2 µL de cada muestra y dispensarlos en el tubo de PCR correspondiente
- Dar un spin en microcentrífuga a los tubos y cerrarlos bien
- Al finalizar el trabajo limpiar con etanol al 70% y colocar luz UV. 12.7

11.10.7. Amplificación del ADN

- Encender el termociclador
- Seleccionar el protocolo a utilizar, almacenado en la carpeta *C. auris*
- Al seleccionar el programa el equipo le pedirá confirmar el volumen final de la reacción (15 µl), oprima "OK"
- Iniciar el programa oprimiendo "RUN"
- Cuando finalice el protocolo de cancelar, sacar los tubos de PCR y apague el equipo

Nota: en caso de requerir configurar los programas en otros equipos, tenga en cuenta el manual del equipo para realizar el proceso

Temperaturas, tiempos y ciclos para *Candida auris*:

Programa termociclador <i>C. auris</i>	
95 °C 3 min	
95 °C 20 seg	
68 °C 20 seg	30 ciclos
72 °C 20 seg	
12 °C ∞	

 INSTITUTO NACIONAL DE SALUD	PROCESO INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA	MANUAL DE TÉCNICAS CONVENCIONALES PARA EL ESTUDIO DE LA ECOLOGÍA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DE HONGOS DE IMPORTANCIA CLÍNICA	Versión: 04
		MNL-R03.3150-001	2025-01-17
			Página 76 de 82

12. DOCUMENTOS DE REFERENCIA

- ✚ Manual de bioseguridad en el laboratorio. Organización Mundial de la Salud (OMS). Tercera Edición. Ginebra.2005
- ✚ Evaluation of a modified Wickerham medium for identifying medically important yeast. Adams E. and Cooper B. Amer J Med Techno 1974; 40: 377-88
- ✚ Laboratory handbook of medical mycology. McGinnis MR. Academic press 1980
- ✚ Rapid method for determining nitrate utilization by yeasts. Hopkins J. and Land G. J Clin Microbiol 1977; 5: 497-500
- ✚ Medical Mycology. Kwon-Chung K. and Bennett, J. Lea and Febiger Ed. Pennsylvania, EEUU. 1992 p. 816. Improved diagnostic medium for separation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (serotypes A and D) and *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* (serotypes B y C). Kwon-Chung K, Polacheck I and Bennet J. J Clin Microbiol 1982; 15: 535-7
- ✚ Use of D-proline assimilation and CGB medium for screening Brazilian *Cryptococcus neoformans* isolates. Nishikawa M and Santana O. Journal of Medical and Veterinary Mycology 1996; 34: 365-6
- ✚ Antigenic characterization of *Cryptococcus neoformans* serotypes and its applications to serotyping of clinical isolates. Ikeda R, Shinoda T and Fukazawa Y. J Clin Microbiol 1982; 16: 22-9
- ✚ Turbidity standard for inolumun preparation. En NCCLS Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Orgensen J, Cleeland R, Craig W, Doren G, Ferraro M, Finegold S, Hansen S, Jenkins S, Novick W, Pfaller M, Preston D, Reller L and Swenson J. Fith edition 1993; 13:24
- ✚ A new species of *Filobasidiella*, the sexual state of *Cryptococcus neoformans* B and C serotypes. Kwon Chung K. Mycologia 1976; 68: 942
- ✚ Microevolution of a Standard Strain of *Cryptococcus neoformans* Resulting in Differences in Virulence and Other Phenotypes. Franzot S, Mukherjee J, Chermiak R, Chen L, Hamdam J and Casadevall. Infect. Immun 1998; 66: 89-97
- ✚ Variants of a *Cryptococcus neoformans* Strain Elicit Different Inflammataory Responses In Mice. Chen L and Casadevall A. Cinical and Diagnostic Laboratory Immunology 1999; 6: 266-8
- ✚ Serial isolates of *Cryptococcus neoformans* from patients with AIDS differ in virulence for mice. Fries B and Casadevall A. J Infect Dis 1998; 178: 1761-6
- ✚ Phenotypic switching in the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformas* is associated with changes in virulence and pulmonary inflammatory response in rodents. Idman D, Fries B, Franzot S, Montella L and Casadevall A. Proc Natl Acad Sci USA 1998; 95:14967-72
- ✚ Intra-strain variability of *Cryptococcus neoformans* can be detected on Phloxin B medium. Kucsera J, Yarita K, Takeo K, Yoshida S, Gacser A, Hamai Z, Avasi Z, Kevei F. J Basic Microbiol 2002; 42:111-9
- ✚ Relationship between protease production and capsule size in *Cryptococcus neoformans*. Leone R, Cabeli P. J Med Mycol 1999; 9: 42-4
- ✚ Meyer W, Castañeda A, Jackson S, et al. Molecular typing of IberoAmerican *Cryptococcus neoformans* isolates. Emerg Infect Dis 2003; 9: 189-95
- ✚ Escandón P, Sánchez A, Martínez M, et al. Molecular epidemiology of clinical and environmental isolates of the *Cryptococcus neoformans* species complex reveals a high genetic diversity and the presence of the molecular type VGII mating type a in Colombia. FEMS Yeast Res 2006; 6: 625-35
- ✚ Kordalewska, M., Zhao, Y., Lockhart, S. R., Chowdhary, A., Berrio, I., & Perlin, D. S. (2017). Rapid and accurate molecular identification of the emerging multidrug-resistant pathogen *Candida auris*. Journal of clinical microbiology, 55(8), 2445-2452

 INSTITUTO NACIONAL DE SALUD	PROCESO INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA	MANUAL DE TÉCNICAS CONVENCIONALES PARA EL ESTUDIO DE LA ECOLOGÍA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DE HONGOS DE IMPORTANCIA CLÍNICA	Versión: 04
		MNL-R03.3150-001	2025-01-17
			Página 77 de 82

13. CONTROL DE CAMBIOS

VERSION	FECHA APROBACION			DESCRIPCIÓN
	AA	MM	DD	
00	2011	08	05	Creación de documento
01	2014	09	29	Se cambio el título del documento. Se reemplazo la palabra <i>Cryptococcus neoformans</i> por <i>Cryptococcus neoformans/ Cryptococcus gattii</i> . Descripción detallada de materiales requeridos en diferentes técnicas. Inclusión de Protocolo de extracción de ADN para cultivos fúngicos por choque térmico. Cambios en las condiciones y materiales de las técnicas, incluyendo switching fenotípico, PCR – Huella digital, aplicación del gen <i>oritidin</i> .
02	2019	10	11	Se realizó la actualización del documento a plantilla vigente. Se adicionó en el ítem 8 buenas prácticas de laboratorio, el cumplimiento de las normas de bioseguridad del manual de bioseguridad.
03	2024	10	11	1... Se eliminó el numeral 11.2.2 Serotipificación de <i>Cryptococcus neoformans</i> con el estuche Crypto Check IATRON
				Se eliminó la frase “Estos protocolos se pueden registrar en el REG-R03-000-3050-012” del numeral 11.4
				Se eliminó el numeral 11.4.12 ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EXTRACELULAR MÉTODO DEL API ZIM (BIÓ-MERIEUX)
				Se eliminó del numeral 11.5 ECOLOGIA, la frase “Estos procedimientos se pueden registrar en el REG.R03.000.3050-012”
				Se eliminó del numeral 11.7 PROTOCOLOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR, la frase “Estos protocolos pueden registrarse en REG-R03.000.3050-011 o REG-R03.000.3050-012”
				Las referencias del numeral 11.7.2 se movieron al apartado de documentos de referencia
				En el numeral 11.7.3, técnica, se eliminó la viñeta “Tomar una fotografía del gel colocado en el transiluminador usando una cámara Polaroid con una película de 667, con una apertura de 11, y una exposición de 3 segundos. Una segunda fotografía se debe tomar con el empleo de una película de 665 con una apertura de 5,6 y un tiempo de exposición de 35 segundos”
				Las referencias del numeral 11.7.6 se eliminaron
				Se eliminó el numeral 11.7.11 ELECTROFORESIS DE CAMPO PULSADO (PFGE) PARA <i>Candida albicans</i> – KIT GENEPATH GROUP 4 BIORAD
				Se eliminó el numeral 11.7.12 ELECTROFORESIS DE CAMPO PULSADO (PFGE) PARA <i>Cryptococcus neoformans-Cryptococcus gattii</i>
				Se eliminó del numeral 11.8 la frase “Estos procedimientos se pueden registrar en REG-R03.000.3050-012”
				Se eliminaron los numerales 11.8.1 y 11.8.2
				Se incluyó el numeral 11.9 PROCESAMIENTO DE MUESTRAS AMBIENTALES PARA EL AISLAMIENTO DE <i>Candida auris</i> , y el numeral 11.10 PCR CONVENCIONAL PARA LA IDENTIFICACIÓN DE <i>Candida auris</i>
04	2025	01	17	Se ajusta tabla de contenido del manual para que sea más corta y resalte los apartados más importantes del documento técnico

 INSTITUTO NACIONAL DE SALUD	PROCESO INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA	MANUAL DE TECNICAS CONVENCIONALES PARA EL ESTUDIO DE LA ECOLOGÍA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DE HONGOS DE IMPORTANCIA CLÍNICA	Versión: 04
			2025-01-17
		MNL-R03.3150-001	Página 78 de 82

14. ANEXOS

14.1 ANEXO 1. Preparación de medios y soluciones

 INSTITUTO NACIONAL DE SALUD	ELABORO	REVISO	APROBO
	Patricia Luz Escandón Hernández	Oscar Alberto Rojas Sánchez	Patricia Luz Escandón Hernández
	Coordinadora / Grupo de Microbiología DISP	Profesional especializado / Grupo de Microbiología DISP	Coordinadora / Grupo de Microbiología DISP

14.1 ANEXO 1. Preparación de medios y soluciones

🚦 Escala de Mc Farland

Solución de BaCl₂ al 1% en agua destilada Solución de H₂SO₄ al 1% en agua destilada.

Control de calidad:

La densidad correcta de la turbidez del estándar del tubo No. 0,5 se puede verificar en el espectrofotómetro a 625 nm de absorbancia; la cual debe estar entre 0,08 a 0,1.

Técnica:

Se mezclan las soluciones 1 y 2 en las cantidades descritas en la siguiente tabla:

Escala de McFarland

Tubo No.	Concentración de células(10 ⁸ x ml)	Solución	
		1	2
0,5	1	0,05	9,95
1	3	0,1	9,9
2	6	0,2	9,8
3	9	0,3	9,7
4	12	0,4	9,6
5	15	0,5	9,5
6	18	0,6	9,4
7	21	0,7	9,3
8	24	0,8	9,2
9	27	0,9	9,1
10	30	1	9

🚦 Medios de cultivo para la preparación de antígenos

1. Medio de Sabouraud modificado empleado para la preparación del antígeno A:

Neopeptona 1 g
 Glucosa 1 g
 NaCl 2 g
 H₂O 100 ml

Preparación:

- Se disuelve y se ajusta el pH a 5 con HCl 1 N
- Se esteriliza en autoclave a 121°C por 15 minutos
- Para la preparación del medio sólido se agrega agar bacteriológico en concentración del 25 g/lsegún la técnica de Kwon-Chung (comunicación personal)

 INSTITUTO NACIONAL DE SALUD	PROCESO INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA	MANUAL DE TECNICAS CONVENCIONALES PARA EL ESTUDIO DE LA ECOLOGÍA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DE HONGOS DE IMPORTANCIA CLÍNICA	Versión: 04
		MNL-R03.3150-001	2025-01-17
			Página 80 de 82

2. Medio de Sabouraud modificado para la preparación de los antígenos B, C y D

Neopeptona 1 g
 Agar 2,5 g
 Glucosa 1 g
 NaCl 2 g
 Agua 100 mL

Preparación:

- Disolver por calor
- Llevar al autoclave durante 20 minutos a 121°C
- Cuando esté a una temperatura de 50°C agregar 50 mg de cloranfenicol

3. Medio de lignina

KH ₂ PO ₄	0,6 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5 g
K ₂ HPO ₄	0,4 g
(NH ₄) ₂ tartrato	0,22 g
Sorbosa	40,0 g
Poly R-478 colorante (SIGMA)	0,2 g
Agar	15,0 g
Solución de minerales	10,0 ml
Agua destilada	llevar a 1 L

Preparación:

Alterar pH a 4,5 con HCl y esterilizar en autoclave a 10 psi por 10 minutos

 Soluciones de PBS

1. PBS 0,01 M pH 7,4 con formalina 0,3% para la preparación del antígeno A

NaH₂PO₄.H₂O 0,14 g
 Na₂HPO₄ 0,14 g
 NaCl 0,85 g
 Formalina 0,3 g
 Agua 100 ml

Preparación:

- Mezclar los reactivos y ajustar el pH a 7,4
- Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos

2. PBS Stock para la preparación de los antígenos B, C y D. (Solución 10x)

Formaldehído 100 ml
 NaH₂PO₄.H₂O 4 g
 Na₂HPO₄ 6,5 g
 Agua 900 ml

Preparación:

Para preparar la solución de trabajo se debe diluir 1/10 Esterilizar a 121°C durante 15 minutos

Protocolo de inoculación de *Cryptococcus neoformans* serotipo A

Semana	Lunes	Martes	Miércoles	Jueves	Viernes
1	SP-I		I		I
2		I			I
3	I				I
4			I		
5	I		S	S	
6					
7				I	
8			I		
9			I		
13		S			
14		I			
15		S			

SP: Sangría previa **S:** Sangría **I:** Inoculación

Protocolo de inoculación de *Cryptococcus neoformans* serotipos B, C y D

Semana	Lunes	Martes	Miércoles	Jueves	Viernes
1	SP-I	I	I	I	I
2	I	I	I	I	I
3	I	I	I	I	I
4	I	I	I	I	I
5			S	S	
8	I	I	I	I	I
9	I	I	I	I	I
13	I	S-I	I	I	I
14	I	I	I	I	I
15			S		

SP: Sangría previa **S:** Sangría **I:** Inoculación

 Soluciones fijadoras

1. *Solución fijadora FAA*

Formaldehido	10%
Ácido acético	5%
Alcohol	85%

2. *Solución de Hoagland:*

KH ₂ PO ₄ 1M	1 ml
KNO ₃ 1M	5 ml
CaCl 0,5M	2,5 ml
NH ₄ NO ₃ 0,5 M	2,5 ml

 INSTITUTO NACIONAL DE SALUD	PROCESO INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA	MANUAL DE TÉCNICAS CONVENCIONALES PARA EL ESTUDIO DE LA ECOLOGÍA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DE HONGOS DE IMPORTANCIA CLÍNICA	Versión: 04
		MNL-R03.3150-001	2025-01-17
			Página 82 de 82

SO ₄ Mg	2 ml
Solución stock de microelementos	1 ml
Citrato de hierro 0,5%	1 ml
Agua destilada	1000 ml

3. *Solución stock de microelementos:*

H₃BO₃
 MnCl₂ 4H₂O
 ZnSO₄ 7H₂O
 CuSO₄ 5H₂O
 Biotina

4. *Azul de lactofenol:*

Disolver 0,05 gr de cotton blue en agua antes de mezclar con el lactofenol

Lactofenol

Fenol concentrado	20 ml
Ácido Láctico	20 ml
Glicerol	40 ml
Agua destilada	20 ml

5. *Solución de minerales:*

CaCl ₂ .H ₂ O	7,4 g
Citrato férrico	1,2 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,7 g
MnSO ₄ .4H ₂ O	0,5 g
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,1 g
Tiamina HCl	10 mg
Agua destilada	1L

6. *Buffer TE pH 8,0:*

- Tris HCl pH 8,0 10 mM
- EDTA pH 8,0 1 mM
- Agua destilada estéril 500ml
- Esterilizar a 115°C por 15 min

Acetato de amonio y etanol-Extracción DNA

Volúmenes de acetato de amonio y etanol para la extracción de ADN con nitrógeno líquido

Volumen de ADN (µl)	Acetato (µl)	Etanol (µl)
100	3,3	250
150	4,95	375
200	6,6	500
250	8,25	625
300	9,9	750
350	11,55	875
400	13,2	1000
450	14,8	1125
500	16,5	1250