

Javier Pemán
Estrella Martín-Mazuelos
M^a Carmen Rubio Calvo

Hasta hace un par de décadas, la casi totalidad del diagnóstico micológico que se desarrollaba en la mayoría de los laboratorios de Microbiología de nuestro país estaba relacionado con las micosis superficiales (tiñas, infecciones cutáneo-mucosas, etc.), por lo que la Micología era una disciplina escasamente desarrollada dentro del contexto de la Microbiología general. El comienzo de la pandemia del sida en los años ochenta cambió sustancialmente esta realidad al favorecer la aparición de micosis sistémicas poco habituales hasta entonces (meningitis criptocócicas, candidiasis invasoras, candidiasis mucocutáneas rebeldes al tratamiento, etc.). Pero, sin lugar a dudas, ha sido el avance de la medicina moderna, con las técnicas de trasplantes de órganos y las nuevas terapias anticancerosas a la cabeza, el que ha ampliado notablemente el número de enfermos con factores de riesgo para contraer una infección fúngica invasora.

Este nuevo escenario, donde las micosis profundas son una de las principales causas de morbimortalidad en los enfermos inmunodeprimidos, ha obligado a un proceso de adaptación y aprendizaje por parte de los microbiólogos clínicos para dar respuesta a esta situación, cuyos instrumentos diagnósticos difieren mucho de los empleados habitualmente en Bacteriología. Día a día las situaciones clínicas exigen una mayor precisión y rapidez diagnóstica. Además, el aislamiento de géneros o especies fúngicas resistentes a determinados antifúngicos y el desarrollo de resistencias por especies previamente sensibles, obliga a la realización de pruebas de sensibilidad *in vitro* a la mayoría de los agentes etiológicos de micosis invasoras aislados en el laboratorio.

Hasta la fecha, la Micología Médica ha sido espléndidamente desarrollada en tratados generales por autores de renombrado prestigio [1-28]. Sin embargo, en nuestro país no existía ninguna Guía Práctica que recogiera de una forma directa y detallada todos los aspectos que son necesarios para un correcto diagnóstico micológico.

Consciente de esta doble realidad, una prevalencia cada vez mayor de las infecciones fúngicas invasoras en nuestro entorno y la carencia de tratados prácticos y actualizados que ayuden al microbiólogo clínico en el diagnóstico micológico, la Sección de Micología Médica de la Asociación Española de Micología (AEM) se planteó hace dos años la elaboración de un Manual, eminentemente práctico, que recogiera de forma clara y detallada todos los pasos que comprenden el diagnóstico micológico, desde la recogida de la muestra hasta la redacción del informe con el resultado final. Así nació la **Guía Práctica de Identificación y**

Diagnóstico en Micología Clínica. Para su elaboración hemos contado con la colaboración entusiasta de la mayoría de los miembros de la Sección, el respaldo institucional de la AEM y el apoyo incondicional de Pfizer S.A. que, desde el primer momento, se comprometió a hacer realidad este proyecto editorial.

La redacción de cada capítulo ha sido realizada por microbiólogos con reconocida experiencia en Micología Clínica o expertos en el tema concreto abordado. En estos Capítulos se han plasmado, más allá de los conocimientos teóricos, los aspectos prácticos y las dificultades que el procesamiento de cada muestra puede originar en el laboratorio, resaltando los consejos que sólo aquel que está familiarizado con una técnica puede dar basándose en su experiencia personal.

Los Capítulos que constituyen esta primera edición de la Guía, se agrupan en seis bloques bien diferenciados:

- i) *Introducción y generalidades* (Capítulos 2 y 3), donde se describen las micosis más frecuentes en nuestro país y los fundamentos del diagnóstico micológico;
- ii) *Procesamiento de cada muestra según su origen anatómico* (Capítulos 4 a 10), en ellos se describe, con todo detalle, el procesamiento de cada muestra desde su obtención hasta la objetivación de crecimiento en el medio de cultivo;
- iii) *Identificación del agente causal* (Capítulos 11 a 13), donde se detallan las técnicas más útiles para identificar las levaduras y los hongos filamentosos;
- iv) *Técnicas diagnósticas alternativas al cultivo* (Capítulo 14), en él se especifican las pruebas serológicas y de detección de componentes fúngicos, antigénicos y no antigénicos, disponibles para el diagnóstico micológico;
- v) *Pruebas de sensibilidad antifúngica* (Capítulos 15 y 16), en ellos se detallan las pruebas, tanto las estandarizadas como las comercializadas, para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos;
- vi) *Seguridad, control de calidad y bioseguridad ambiental* (Capítulos 17 a 19), donde se describen las normas de seguridad necesarias en un laboratorio de Micología, el control de calidad en el mismo y los controles ambientales de bioseguridad fúngica.

Además de estos Capítulos, se incorporan tres apéndices. El Apéndice I es el índice alfabético de todas las materias, técnicas y nombres propios que aparecen en la Guía. En el Apéndice II se incluyen a todos los fabricantes y distribuidores en España de

los productos, reactivos y técnicas citados en la Guía (con sus direcciones y teléfonos). Finalmente, el Apéndice III es el *Buzón de Sugerencias*, mediante el cual se pueden enviar los comentarios y aportaciones para mejorar las futuras ediciones de la Guía. Sin lugar a dudas, la utilidad práctica ha sido uno de los principales objetivos a cumplir en la elaboración de esta Guía y, para ello, hemos querido que el diseño de la misma también facilite su uso en el mismo banco de trabajo del laboratorio.

El estuche con la carpeta de anillas permite extraer fácilmente las páginas con la técnica deseada y tenerlas a la vista mientras se realiza la misma. Además, este diseño permite una sencilla y rápida actualización de la Guía en el futuro, otro de los objetivos planteados desde su concepción: que permitiera una fácil puesta al día de las nuevas técnicas según fueran apareciendo en el mercado. Gracias a este sistema, está previsto que periódicamente se incorporen nuevas técnicas o procedimientos que complementen o sustituyan a los ahora publicados, así como nuevos capítulos que completen los huecos existentes en esta primera edición (Micología Veterinaria, técnicas diagnósticas moleculares, etc.) que debido a la premura de tiempo no se han podido incorporar en este momento. Esta peculiaridad de diseño también permite una fácil y rápida incorporación a la Guía de cualquier sugerencia, aportación o crítica de los lectores basada en su propia experiencia que facilitará su mejora y enriquecimiento en futuras ediciones, por lo que, desde estas líneas, invitamos a todos los lectores a ejercer esa prerrogativa enviando las críticas y comentarios al *Buzón de Sugerencias*, tal y como se indica en el Apéndice III.

Queremos agradecer sinceramente a todos los autores su entusiasta y generosa participación porque somos conscientes de las horas y desvelos que ha supuesto la elaboración de cada Capítulo, muchas de ellas robadas a su familia y su propio descanso. Sin su esfuerzo, esta obra no habría visto la luz. Gracias también a la AEM que, desde que tuvo conocimiento de este proyecto, lo ha asumido y avalado como instrumento de formación en Micología, respaldándolo editorialmente.

En todo proceso editorial hay labores que, no por realizarse en la sombra, son menos importantes; siendo imprescindibles para que el resultado final sea el deseado. Por este motivo agradecemos a las doctoras Pilar Ezkurra (asistente de redacción) y Elena González-Miranda (diseño gráfico) su eficaz e incansable labor mediante la cual se ha conseguido una obra gráfica de la que sus promotores están orgullosos. Y nuestro más sincero agradecimiento a Pfizer, S.A. y, en particular, a Rosa Bardón, *Product Manager* de antifúngicos, por no escatimar esfuerzos de tipografía y edición para que esta Guía llegue a los lectores tal y como fue concebida por sus editores.

Además, somos conscientes de que en nuestro país trabajan experimentados micólogos que no han podido colaborar en esta primera edición de la Guía, pero esperamos poder contar con ellos en las próximas ediciones de la misma. La premura del tiempo, y no el olvido, ha sido la causa de esas ausencias. Con sus futuras aportaciones, conseguiremos alcanzar el último de los objetivos planteados con esta obra, el de conseguir...

...una Guía de todos y para todos.

Bibliografía

- Arenas R. Micología médica ilustrada. México DF, Interamericana-MacGraw-Hill, 1996.
- Arora DK, Ajello L, Mukerji KG (Eds.) Handbook of applied mycology. New York, Marcel Dekker Inc., 1991.
- Calderone RA (Ed.) *Candida* and candidiasis. Washington DC, American Society for Microbiology, 2002. *En prensa*.
- de Hoog GS, Guarro J, Figueras MJ, Gené J. Atlas of clinical fungi, 2nd ed. Baarn / Reus, Centraalbureau voor Schimmelcultures / Universitat Rovira i Virgili, 2000.
- Emmons CW, Binford CH, Utz JP, Kwon-Chung KJ. Medical mycology. Philadelphia, Lea & Febiger, 1977.
- Evans EGV, Richardson MD. Medical mycology; a practical approach. Oxford, IRL Press, 1989.
- Herrera T, Ulloa M. El reino de los hongos. México DF, Universidad Nacional Autónoma de México, 1990.
- Isenberg HD. Clinical microbiology procedures handbook. Washington DC, American Society for Microbiology, 1992.
- Kibbler CC, Mackenzie DWR, Odds FC (Eds.). Principles and practice of clinical mycology. Chichester, John Wiley & Sons, 1996.
- Koenig H. Guide de micologie médicale. Paris, Ellipses, 1995.
- Koneman EW, Roberts GD. Practical laboratory mycology, 2nd ed. Baltimore, The Williams & Wilkins Co., 1978.
- Kreger-van Rij NJW. The yeast, 3rd ed. Amsterdam, Elsevier Science Publisher, 1984.
- Kushwaha RKS, Guarro J (Eds.). Biology of dermatophytes and other keratinophilic fungi. Bilbao, Revista Iberoamericana de Micología, 2000.
- Kwon-Chung KJ, Bennett JE. Medical mycology, Philadelphia, Lea and Febiger, 1992.
- Lacaz CS, Porto E, Heins-Vaccari EM, Melo NT. Guia para identificação: fungos, actinomicetos, algas de interesse médico. São Paulo, Sarvier, 1998.
- Larone DH. Medically important fungi, 3rd ed. Washington DC, American Society for Microbiology, 1995.
- Mandell GM, Douglas RG, Bennett JE. Principles and practice of infectious diseases, 5th ed. New York, Churchill Livingstone, 2000.
- McGinnis MR. Laboratory handbook of medical mycology. New York, Academic Press, 1980.
- Murray PR, Baron JO, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH. Manual of clinical microbiology, 7th ed. Washington DC, American Society for Microbiology, 1999.
- Negróni R. Lecciones de clínica micológica. Buenos Aires, La Agenda, 1997.
- Odds FC. *Candida* and candidosis. London, Bailliere Tindall, 1988.
- Peña-Yañez J. Micología clínica. Madrid, Editorial Ciencia 3, 1983.
- Polonelli L, Ajello L, Morace G. Micologia medica. Bologna, Esculapio, 1993.
- Rippon JW. Medical mycology: the pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes, 3rd ed. Philadelphia, WB Saunders Co., 1988.
- Sutton DA, Fothergill AW, Rinaldi MG. Guide to clinically significant fungi. Baltimore, Williams and Wilkins, 1998.
- Samaranayake LP, MacFarlane TW. Oral candidosis. London, Wright-Butterworth & Co., 1990.
- Torres-Rodríguez JM, del Palacio-Herranz A, Guarro-Artigas J, Negróni-Briz R, Pereiro-Miguens M (Eds.) Micología médica. Barcelona, Masson, 1993.
- Zapater RC. Introducción a la micología médica. Buenos Aires, El Ateneo, 1965.

M^a Carmen Rubio Calvo
 Joaquina Gil Tomás
 Rafael Benito Ruesca
 Inmaculada Ramírez de Ocáriz Landaberea
 Margarita Navarro Lucía

Una forma habitual de clasificar las micosis ha sido atendiendo a su localización anatomoclínica, tanto sea en el huésped inmunocompetente como en el inmunodeprimido, y agrupando, en algunas ocasiones, diversos agentes etiológicos. De acuerdo a ese criterio podemos clasificar las micosis en Superficiales, Cutáneas, Subcutáneas, Profundas o Sistémicas.

2.1. Micosis superficiales

Son las micosis que afectan la capa córnea de la piel y la porción suprafolicular del pelo. La pitiriasis versicolor es la micosis superficial más frecuente, siendo las demás muy raras en nuestro medio.

2.1.1. Pitiriasis versicolor

Es una infección superficial crónica, no irritativa del estrato córneo producida por especies del género *Malassezia*: *M. furfur*, *M. globosa*, *M. obtusa*, *M. restricta*, *M. slooffiae* y *M. sympodialis* [1].

Malassezia spp. es una levadura lipofílica que coloniza la epidermis de forma epiparasítica, por lo que la respuesta inflamatoria del huésped es mínima. Origina máculas serpiginosas separadas, hiper o hipo pigmentadas en la piel del tórax, parte superior de la espalda y brazos. Las lesiones parecen parches maculares de piel despigmentada indoloros, no pruriginosos y que causan más problema estético que patológico (Figura 2.1). La piel afectada no se broncea bien y las lesiones resultan más evidentes, por lo cual la consulta médica es más frecuente en verano.

La pitiriasis versicolor es una micosis muy frecuente y ampliamente distribuida entre la población mundial, aunque su incidencia aumenta en los climas húmedos y cálidos, existiendo una predisposición individual a padecerla. Su aparición se relaciona con la presencia de ciertos aminoácidos y compuestos hidrófobos en la piel, así como con la disminución del recambio epitelial en el estrato córneo.

Además de la pitiriasis versicolor, las especies del género *Malassezia* están implicadas como agentes causales de otros cuadros clínicos:

- **Dermatitis seborreica y caspa (pitiriasis capitis):** Áreas de piel enrojecida e inflamada, recubierta de escamas grasientas de color amarillo, generalmente en cuero cabelludo, cara y tórax. Tienen una evolución crónica y recurrente. En los pacientes con sida o síndrome relacionado puede localizarse en las axilas con un cuadro muy florido de diagnóstico complejo.
- **Foliculitis en pacientes inmunocomprometidos:** Constituida por pápulas foliculares pruriginosas y pustulosas en espalda, tórax y parte superior de los brazos.
- **Fungemia:** En pacientes sometidos a nutrición parenteral con emulsiones lipídicas (lactantes prematuros).
- **Síndrome de Gougerot-Carteaud:** Es una papiomatosis confluyente reticular con pápulas de color gris-marrón localizadas en la región

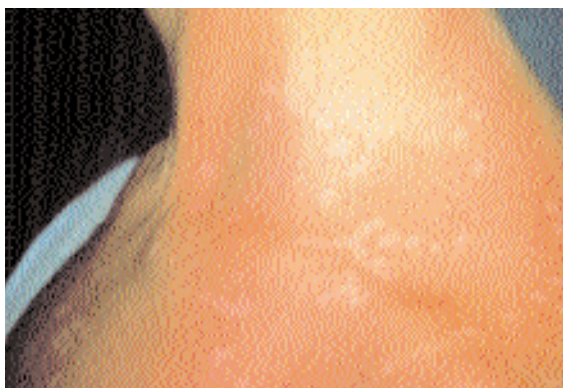


Figura 2.1. Pitiriasis versicolor. Paciente con lesiones discrómicas.

intermamaria, interescapular, cuello o abdomen [2].

Diagnóstico

Aplicando la luz de Wood, las lesiones presentan fluorescencia blanco-amarillenta. En visión microscópica directa de las escamas parasitadas destacan los acúmulos de levaduras e hifas (Figura 2.2). Para su aislamiento deben utilizarse medios de culti-

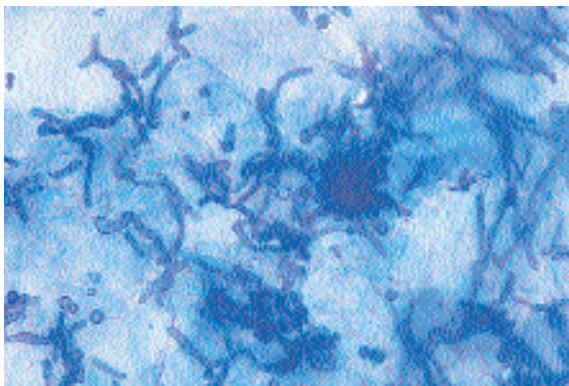


Figura 2.2. Visión directa de escamas con hifas y formas levaduriformes de *Malassezia* spp.

vo enriquecidos con lípidos, como el de Leeming, Dixon o añadiendo aceite de oliva a los medios de cultivo habituales (Capítulo 3).

2.1.2. Tiña negra palmar

Es una infección crónica y asintomática del estrato córneo causada por la levadura dematiácea *Phaeoannellomyces werneckii* (antes *Exophiala werneckii*), dimórfica y de hábitat saprofita.

La lesión consiste en una mácula solitaria de límites definidos que se disemina por expansión en palmas. Puede tener color marrón en la periferia y, en algunos casos, semejar un melanoma. En ocasiones puede afectar a los dedos de la mano y a la cara, siempre en zonas sin pelo [3].

2.1.3. Piedra negra y piedra blanca

Las piedras son infecciones fúngicas de la porción extrafolicular del pelo, caracterizadas por la presencia de nódulos duros e irregulares compuestos por agregados fúngicos.

La piedra negra, nódulos de consistencia pétrea de 1-5 mm, está producida por el ascomiceto *Piedraia hortae*. No sólo no causa molestias sino que, en las zonas endémicas, se considera a este parasitismo un signo externo de belleza y distinción.

La piedra blanca es producida por la colonización de diversas especies de *Tichosporon*: *T. asteroides*, *T. beigeli/cutaneum*, *T. inkin*, *T. mucoides*, *T. ovoides* y *T. pullulans* [4] y da lugar a la presencia de nódulos de color blanquecino-marrón de 0,5-3 mm, blandos, esponjosos y no fluorescentes con luz de Wood, localizados en cejas, bigote o pelo escrotal.

2.2. Micosis cutáneas

Las infecciones cutáneas en el ser humano incluyen una amplia variedad de procesos en los que pueden estar afectados la piel y sus anejos (pelos y uñas). El término dermatomicosis se refiere a cualquier proceso micótico de la piel, y el de dermatofitosis, al causado por hongos dermatofitos [3,5].

Además de las infecciones primarias, en la piel también pueden encontrarse lesiones granulomatosas o de otro tipo, como expresión de las metástasis de una micosis sistémica.

2.2.1. Dermatofitosis

Así se denomina a la infección de los tejidos queratinizados (piel, pelos y uñas) ocasionada por un grupo de hongos queratinofílicos, taxonómicamente relacionados, a los que se ha denominado dermatofitos. La infección puede estar limitada a la capa córnea o llegar a estratos más profundos, sin invasión linfática.

Estas micosis cutáneas se encuentran entre las infecciones de mayor prevalencia en el mundo y, dado que producen lesiones fácilmente observables, su presencia en el ser humano está documentada a lo largo de la historia [6].

Los agentes etiológicos se clasifican en tres géneros diferentes: *Microsporum* (Gruby, 1843), *Trichophyton* (Malmsten, 1845) y *Epidermophyton* (Sabouraud, 1907). La descripción de los géneros se basa en la morfología de las conidias y organelos accesorios (Capítulo 12).

Hábitat y patogenia

Estos hongos parasitan las zonas cornificadas y tienen dificultad para multiplicarse intracelularmente. Las artroconidias se adhieren específicamente a los corneocitos (no a células endoteliales), germinan y penetran en el estrato córneo formando ramificaciones de hifas como un auténtico micelio. La invasión del estrato córneo está favorecida por las condiciones específicas de este hábitat: células muertas, temperatura inferior a 37 °C, humedad adecuada y aporte suficiente de hierro y otros nutrientes. Los dermatofitos poseen potentes queratinasas capaces de hidrolizar diversos tipos de queratina, proteína de elevado peso molecular con gran cantidad de puentes disulfuro. No todas las queratinas son iguales, incluso dentro de un mismo individuo existen diferencias según sean de

piel, pelo o uñas. La queratina del pelo es rica en cisteína, mientras que la de la piel lo es en metionina. Estas diferencias podrían ser una de las explicaciones del distinto tropismo que presentan ciertas especies por colonizar determinados tejidos.

Epidemiología

La incidencia de estas micosis varía notablemente de unos países a otros y también las especies que las producen. Los hongos dermatofitos pueden clasificarse en especies antropofílicas, zoofílicas y geofílicas, según cual sea su hábitat preferente: el ser humano, los animales o el suelo. En el ser humano las especies antropofílicas suelen producir cuadros más crónicos que las zoofílicas y geofílicas. *T. mentagrophytes* es una especie zoofílica que parasita un elevado número de especies animales (conejos, caballos, cerdos, gallinas, etc.) por lo que la infección en el medio rural es más frecuente que en el urbano. *M. canis* parasita a perros y gatos que son animales de compañía en las ciudades y, juntamente a *T. mentagrophytes*, son los más abundantes en Aragón [7,8]. *T. verrucosum* infecta el ganado bovino por lo que su incidencia es alta en la provincia de Salamanca [9], donde existe ganadería de reses bravas y en nuestro medio da lugar a procesos supurados granulomatosos en el antebrazo. La especie *T. rubrum* produce habitualmente *tinea unguium* en las uñas del pie, cuadro crónico muy resistente al tratamiento.

Cuadros clínicos

Las infecciones por dermatofitos se denominan de acuerdo a la zona anatómica afectada: ***Tinea capitis***, en cuero cabelludo; se presenta en forma de una placa alopecica escamosa (tiña microspórica), pequeñas placas alopecicas escamosas (tiña tricofítica) o lesiones pustulo-foliculares (Kerion) (Figuras 2.3 y 2.4). ***Tinea barbae***, en barba y bigote, con pequeños abscesos foliculares (Figura 2.5). ***Tinea corporis***, en la piel lampiña de tronco, abdomen, extremidades y cara. Son lesiones circulares con borde eritemato-escamoso, pruriginosas, de crecimiento centrífugo (Figura 2.6). Pueden presentarse otras formas inflamatorias y granulomatosas como el granuloma perifolicular de Majocchi. La forma de tiña imbricata es característica de zonas tropicales y está producida por *T. concentricum*. ***Tinea cruris***, región inguinal, placa eritemato-escamosa, pruriginosa con bordes vesiculares, mucho más frecuente en el varón adulto. ***Tinea manum***, palmas de las manos y superficie lateral de los dedos y espacios interdigitales. ***Tinea pedis***, planta y espacios interdigitales de los pies, lesiones descamativas vesiculares pruriginosas con grietas en el fondo del cuarto espacio interdigital; puede haber hiperqueratosis. ***Tinea unguium***, con varias formas

clínicas: a) subungueal distal; hiperqueratosis subungueal en el pie, asociada casi siempre a *T. rubrum*; b) blanca superficial, frecuentemente producida por *T. mentagrophytes* o *E. floccosum*; y c) blanca proximal producida por *T. rubrum*, *M. canis* o *T. megnini*.

2.2.2. Dermatomicosis por

Scytalidium dimidiatum y *S. hyalinum*

Estos hongos son agentes etiológicos de infecciones crónicas cutáneas que afectan a la piel altamente queratinizada de palmas, plantas, uñas y espacios interdigitales. Clínicamente se parecen a *tinea unguium*, *tinea pedis* y *tinea manum* producidas por hongos dermatofitos, por lo que es importante establecer el diagnóstico etiológico ya que el tratamiento es diferente según se trate de una tiña o de una dermatomicosis por *Scytalidium*.

2.2.3. Candidiasis cutánea y de mucosas

Las infecciones por especies del género *Candida* y especialmente por *Candida albicans*, la más patógena, han aumentado notablemente en los últimos 30 años. Su clasificación en dos grupos, el de las cutaneomucosas y el de las sistémico-profundas, facilita su estudio.

Candidiasis cutánea

La zona más frecuentemente afectada son los pliegues cutáneos donde la humedad crea un hábitat adecuado para su supervivencia. Se puede manifestar como:

1. **Intértrigo de grandes pliegues:** localizado en axilas, ingle, surco interglúteo, pliegue submamario (Figura 2.8) y, en personas obesas, en el pliegue suprapúbico. Suele estar favorecido por la diabetes, el alcoholismo o la obesidad.
2. **Erosión interdigital:** infección localizada entre los dedos de las manos o de los pies.
3. **Candidiasis del pañal:** intérrigo del lactante localizado en los pliegues inguinales, suprapúbico e interglúteo (Figura 2.9).
4. **Foliculitis:** infección del folículo piloso en los pacientes VIH positivos (Figura 2.10).
5. **Onicomycosis candidiásica con paroniquia y perionixis:** inflamación periungueal, con dolor y enrojecimiento y, en las fases agudas, exudado purulento. Ésta es la forma más característica de

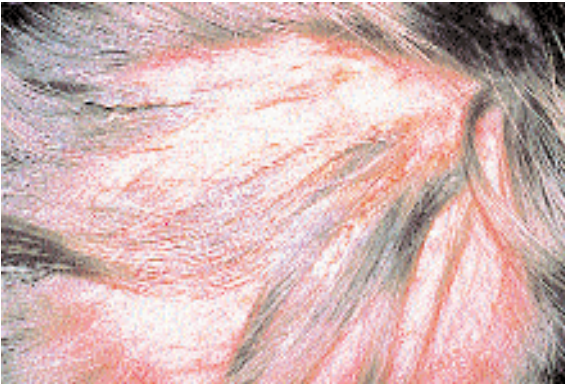


Figura 2.3. Tinea capitis por *Microsporum canis*. Se observan zonas alopécicas descamadas.

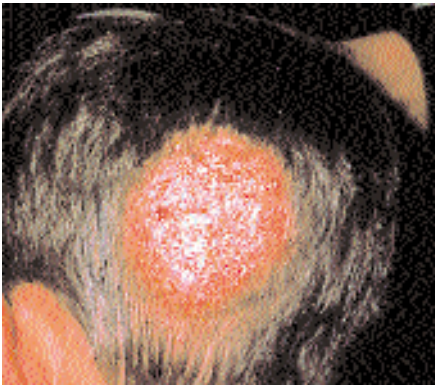


Figura 2.4. Kerion de Celso en cuero cabelludo por *Trichophyton mentagrophytes*.



Figura 2.5. Tinea barbae. Destacan las lesiones pustulosas en la zona pilosa del mentón. Se trata de un Kerion de Celso producido por *Trichophyton mentagrophytes*.

En las onicomicosis pueden aislarse otras especies de hongos diferentes de los dermatofitos, como *Fusarium* o *Aspergillus* (Figura 2.7) que, en ausencia de un hongo dermatofito y aislados tres veces en cultivo puro, podrían considerarse como causantes de la lesión. En caso contrario, sólo puede admitirse que está colonizando una uña previamente lesionada. La onicomicosis negra está producida, casi siempre, por especies del género *Phialophora*. Las onicomicosis en los dedos de las manos con perionixis suelen ser producidas por *C. albicans* [10].



Figura 2.6. Tinea corporis producida por *Microsporum canis*. Las lesiones son de aspecto circinado y crecimiento centrifugo. Para diagnóstico micológico la toma debe realizarse en la periferia de la lesión.



Figura 2.7. Onicomicosis por *Aspergillus candidus*, con afectación ungueal, onicorexis e hiperqueratosis.



Figura 2.8. Intertrigo submamario candidiásico por *Candida albicans*.



Figura 2.11. Onicomiasis por *Candida albicans* con inflamación periungueal (perionixis).



Figura 2.9. Dermatitis del área del pañal por *Candida albicans*.

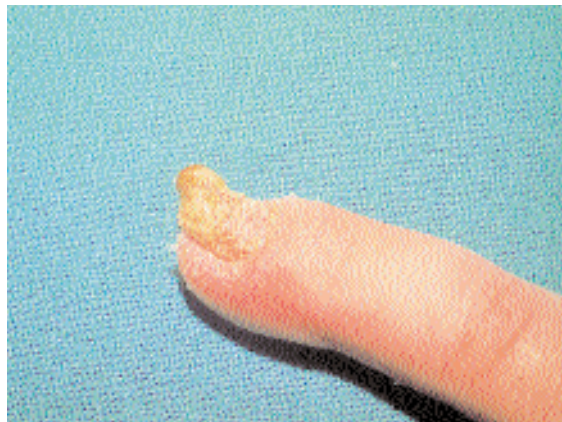


Figura 2.12. Onicomiasis producida por *Candida parapsilosis* y *C. tropicalis*. Hiperqueratosis distal de color blanco-amarillento y onicólisis. No hay perionixis.



Figura 2.10. Foliculitis por *Candida albicans* en paciente VIH positivo, heroinómano. Además de las lesiones pustulosas en la zona folicular pilosa, el paciente también tenía foliculitis en cuero cabelludo y zona pilosa del tórax.

onicomiasis candidiásica, que es más frecuente en la mujer (Figura 2.11). En otros casos la paroniquia es crónica, con una uña engrosada, endurecida, de color pardo, estriada, no friable e invasión de todas las capas de la lámina ungueal. Una tercera forma es la onicólisis candidiásica con despegamiento de la lámina ungueal.

En las lesiones cutáneas el agente causal más frecuentemente aislado es *C. albicans*. Sin embargo, en las onicomiasis, pueden también aislarse *C. parapsilosis* y otras especies (Figura 2.12). Además de la afectación primaria, en la piel también pueden desarrollarse lesiones como expresión metastásica de una candidiasis diseminada. Son lesiones macronodulares y es necesaria la biopsia para su estudio microbiológico.

Infección en las mucosas por *Candida* spp.

1. **Oral o muguet.** Es una infección bucal caracte-

rizada por la aparición de manchas blanco-cremosas en la lengua y en otras superficies de la mucosa bucal como la cara interna de las mejillas o el paladar blando (Figura 2.13). Pueden ser eliminadas dejando una superficie sangrante y dolorosa. Estas placas pseudomembranosas están constituidas por células epiteliales descaamadas, leucocitos, queratina, tejido necrótico, bacterias e incluso, restos alimenticios. El diagnóstico se confirma fácilmente por la visualización de las levaduras gemantes, blastosporadas, incluso con hifas verdaderas, al realizar un examen microscópico en fresco o mediante tinción de Gram.

Dentro de las lesiones candidiásicas orales existen otras formas clínicas:

- a) **Candidiasis atrófica aguda:** atrofia de la lengua como secuela de la previamente descrita pseudomembranosa,
- b) **Candidiasis atrófica crónica:** reacción inflamatoria crónica con engrosamiento epitelial bajo las placas dentales,
- c) **Queilitis angular:** inflamación de las comisuras labiales (Figura 2.14), y
- d) **Lengua pilosa negra:** no siempre debida a *Candida* y caracterizada por hipertrofia de las papilas que pueden alcanzar gran longitud y color negro en la parte central del dorso (Figura 2.15).

La especie causal más frecuente es *C. albicans*, pero en los pacientes tratados con fluconazol puede aislarse *C. glabrata* y *C. krusei*, especies menos sensibles o resistentes a este antifúngico. *C. dubliniensis* es otra especie que se encuentra con relativa frecuencia en la cavidad oral, sobre todo en pacientes con sida, pero puede estar colonizando sin producir lesiones.

2. **Esofagitis.** Esta entidad se suele asociar a procesos malignos hematológicos y al sida. La invasión del esófago suele producirse por diseminación directa de un foco bucal. Los síntomas más comunes son la disfagia y el dolor subesternal. El diagnóstico definitivo se realiza mediante biopsia endoscópica (Figura 9.1) o por cepillado esofágico siendo necesario hacer el diagnóstico diferencial con una infección por herpesvirus, ya que la mayoría de los pacientes son inmunodeprimidos.
3. **Candidiasis de mucosa gastrointestinal, no esofágica.** Se asocia a procesos malignos y suele presentarse como una úlcera o un grupo de ellas, tanto en mucosa gástrica como en intestino delgado o grueso. Al igual que en otras candidiasis mucosas, se pueden observar las típicas placas blanquecino cremosas por endoscopia. Recientemente se está estudiando la candidiasis gástrica y su posible relación con la administración de cimetidina u otros agentes bloqueantes



Figura 2.13. Candidosis oral en paciente VIH positivo por *Candida albicans*.



Figura 2.14. Queilitis angular por *Candida albicans*. Lesiones eritematosas con fisuras localizadas en el pliegue de la comisura bucal.



Figura 2.15. Glositis (lengua negra) por *Candida albicans*. Se aprecia la coloración negruzca de distribución irregular en el dorso de la lengua.



Figura 2.16. Vulvovaginitis por *Candida albicans*. Destaca el intertrigo en los pliegues inguinales.

H₂.

4. **Vulvovaginitis.** Habitualmente cursa con leucorrea y placas pseudomembranosas en la cavidad vaginal, aunque también la vulva, el periné y la región inguinal se afectan con cierta frecuencia (Figura 2.16). Se acompaña de prurito y molestias locales que pueden originar dispareunia y dolor en la micción. Se observa con más frecuencia en pacientes diabéticas, gestantes o sometidas a terapia antibiótica. *C. albicans* es la especie más frecuentemente aislada seguida por *C. glabrata*.
5. **Balanitis.** Suele iniciarse con vesículas en el pene que evolucionan, en los casos intensos, a placas pseudomembranosas, erosiones o pústulas superficiales en el glande y en el surco balano-prepucial. Las lesiones pueden extenderse a escroto y pliegues, acompañándose de prurito y escozor intenso. *C. albicans* es la especie aislada con mayor frecuencia.

Candidiasis mucocutánea crónica

Con esta denominación se engloban un conjunto heterogéneo de infecciones causadas, sobre todo, por *C. albicans* en piel, mucosas, pelos o uñas y que presentan una evolución pertinaz a pesar de la terapia antifúngica convencional. Es un proceso poco frecuente que se asocia a alteraciones inmunológicas en el huésped y suele coincidir con otras infecciones; afecta con más frecuencia a niños, pero puede manifestarse durante toda la vida. Los pacientes suelen presentar anergia, con falta de capacidad de respuesta a los mitógenos, déficit de linfoquinas, hipoparatiroidismo, deficiencia en el metabolismo del hierro o avitaminosis A.

2.3. Micosis subcutáneas

Son infecciones del tejido subcutáneo asociado a dermis y epidermis, causadas por hongos saprofitos cuyo hábitat es el suelo y las plantas. La puerta de entrada es la inoculación traumática de material contaminado: astillas, espinas u otros objetos punzantes, por lo que también se denominan micosis de implantación. Esta circunstancia permite agrupar a un conjunto heterogéneo de infecciones causadas por hongos taxonómicamente muy diversos y cuyo denominador común es la puerta de entrada en el huésped. En nuestro país la micosis subcutánea más importante es la esporotricosis, seguida de la feohifomicosis subcutánea. En la Tabla 2.1 figuran las características más destacables de las micosis subcutáneas.

2.3.1. Esporotricosis

La inoculación traumática de *Sporothrix schenckii*, tras un periodo de incubación de 15-30 días, produce una infección crónica caracterizada por lesiones nodulares en el tejido cutáneo y subcutáneo acompañada de linfangitis del área afectada.

Tabla 2.1. Características más destacables de las micosis subcutáneas. Modificado de Rubio *et al.* [12].

	Pus	Granuloma	Fibrosis	Necrosis	Otras características
Esporotricosis	+	+	+	+	Cuerpos asteroides
Lobomicosis	—	+	±	—	Levaduras unidas
Rinosporidiosis	—	+	—	—	Esporangios
Feohifomicosis	— / ±	+	—	—	Hifas septadas pigmentadas
Cromomicosis	—	+	+	—	Cuerpos esclerociales
Micetoma	+	+	+	+	Supuración con gránulos
Conidiobolomicosis	—	+	+	—	Esporóforos elongados
Basidiobolomicosis	+	+	—	+	Esporóforos cortos

Hábitat y epidemiología

S. schenckii vive en la naturaleza asociado a la vegetación, plantas o restos vegetales en el suelo, por lo que la incidencia de la esporotricosis es mayor en trabajadores agrícolas y personas que operan en zonas abiertas. Se considera una enfermedad profesional de guardabosques, horticultores, jardineros y personal agrícola en general. La epidemia mejor documentada es la que tuvo lugar en las minas de oro de Transvaal, donde enfermaron más de 3.000 personas por contaminación, mediante el roce, con vigas de madera parasitadas por el hongo.

Formas clínicas de la esporotricosis

1. **Esporotricosis linfocutánea.** Representa más del 75% de las distintas formas clínicas. La primera lesión aparece en piel o tejido subcutáneo y de forma progresiva compromete los vasos linfáticos drenantes. La pápula inicial se infiltra, dando lugar a un nódulo con tendencia a necrosarse y ulcerarse. El fondo de la úlcera es rojo, granulomatoso y con frecuencia se cubre de una costra serohemática. Al cabo de unas dos semanas aparecen otros nódulos a lo largo del trayecto linfático principal. El primer chancro cura pero los nódulos secundarios a lo largo del trayecto linfático suelen drenar espontáneamente (Figura 2.17). La evolución dependerá de la inmunorespuesta del huésped, virulencia de la cepa, tamaño del inóculo y de la profundidad de la lesión.
2. **Esporotricosis fija o dermoepidérmica:** sólo hay una lesión. La infección es limitada y menos progresiva. Los vasos linfáticos no suelen estar afectados y es más común en áreas endémicas.
3. **Otras formas clínicas:**

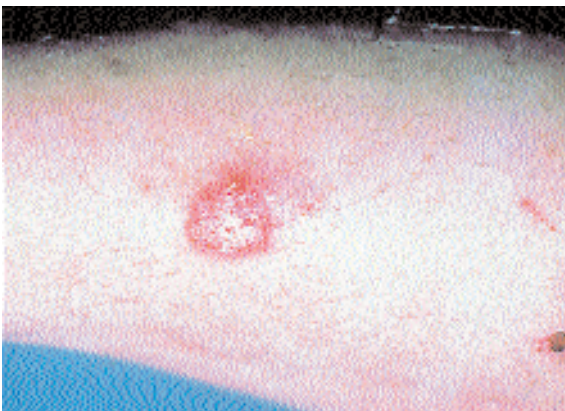


Figura 2.17. Esporotricosis linfocutánea. Se muestra una lesión primaria grande, infiltrada y de color eritematoso que sigue el trayecto linfático y otra lesión más pequeña.

- a) **Pulmonar primaria:** se observa en pacientes inmunodeprimidos, se adquiere por inhalación y simula una tuberculosis cavitaria.
- b) **Pulmonar metastásica:** es infrecuente.
- c) **Osteoarticular:** forma diseminada en huesos y articulaciones.
- d) **Invasión generalizada:** es rara, aunque se han descrito formas meníngeas y oculares en pacientes inmunodeprimidos.

2.3.2. Cromomicosis

Así se denomina al conjunto de micosis producidas por *Fonsecaea pedrosoi*, *Fonsecaea compacta*, *Phialophora verrucosa*, *Cladosporium carrionii* y *Rhinocladiella aquaspersa*. Es más frecuente en los climas tropicales, siendo excepcional en áreas templadas y frías.

Las lesiones son de evolución crónica y pueden presentar las siguientes formas clínicas: plana, costrosa o vegetante verrucosa. En los cortes histológicos la dermis presenta un infiltrado inflamatorio con linfocitos, leucocitos, células epitelioides, células gigantes de Langhans, acantosis e hiperplasia pseudoepiteliomatosa. Entre el infiltrado inflamatorio destacan los cuerpos fúngicos tabicados en red, dip-tioseptados o esclerociales.

2.3.3. Feohifomicosis cutánea

Es una infección cutánea o subcutánea producida por implante traumático de hongo dematiáceo, en cuya lesión se observan hifas pigmentadas y no cuerpos esclerociales. El término feohifomicosis

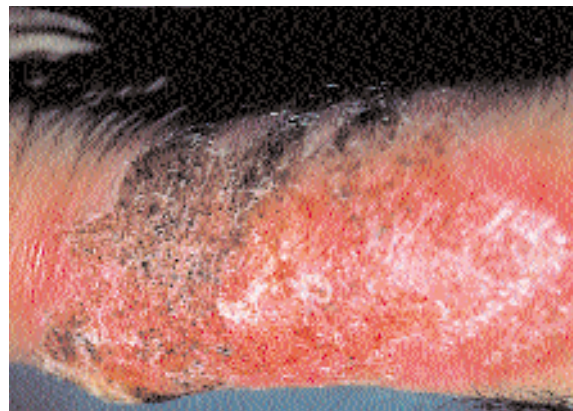


Figura 2.18. Lesiones pustulosas y eritemato-escamosas formando una placa de bordes difusos, producidas por *Botryomyces caespitosus*.

también engloba micosis sistémicas por hongos dematiáceos, patógenos oportunistas cuyas especies se describen en el apartado correspondiente.

Los agentes que producen lesiones cutáneas con mayor frecuencia son: *Alternaria alternata*, *Bipolaris spicifera*, *Curvularia geniculata*, *Exophiala jeanselmei*, *Exophiala moniliae*, *Wangiella dermatitidis* y *Phialophora richardsiae*. En ocasiones, alguna especie, como *Botryomyces caespitosus* [11], puede producir cuadros semejantes a una cromomicosis leve (Figura 2.18).

2.3.4. Micetoma

Clínicamente se caracteriza por un cuadro localizado en tejido subcutáneo, que se inicia con nódulos persistentes los cuales terminan fistulizando en la piel. Progresan por contigüidad, formando nuevas lesiones semejantes a la primera. El conjunto aumenta de tamaño y aparecen zonas leñosas e induradas, junto a fistulas que drenan abundante pus con gránulos blancos o negros (si se encuentran hongos dematiáceos).

Los hongos implicados con mayor frecuencia son *Madurella mycetomatis* y *Exophiala* spp., pero también se encuentran bacterias actinomicetales de los géneros *Streptomyces*, *Nocardia* y *Nocardiosis*.



Figura 2.19. Características morfológicas diferenciales de las especies de hongos dimórficos térmicos productores de micosis endémicas.

2.4. Micosis profundas

Bajo la denominación de micosis profundas se incluyen las siguientes infecciones fúngicas: blastomicosis, coccidioidomicosis, histoplasmosis, paracoccidioidomicosis y criptococosis.

Las cuatro primeras están producidas por otras tantas especies de hongos dimórficos térmicos, con crecimiento filamentosos a temperatura ambiente y en su estado saprofita, en el suelo, y en forma levaduriforme o esferular al parasitar al ser humano o en cultivo a 37 °C, con CO₂ en medio rico en aminoácidos (Figura 2.19). Las especies productoras son, respectivamente: *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum* y *Paracoccidioides brasiliensis*. Son especies con una distribución restringida a zonas geográficas muy concretas y todas ellas se adquieren por inhalación de las propágulas que el hongo elimina en su hábitat natural, el suelo. Una vez inhaladas, inducen cuadros clínicos diversos, según el estado inmunológico del huésped, que oscilan entre cuadros asintomáticos inespecíficos a procesos pulmonares

granulomatosos y, en el huésped inmunocomprometido, se manifiestan de forma generalizada.

La criptococosis es una micosis producida por la levadura capsulada *Cryptococcus neoformans*. Aunque es considerada como un patógeno oportunista, su aislamiento en el laboratorio es significativo de enfermedad. Por ello se incluye entre las micosis profundas, ya que el significado clínico de este hongo es mayor, por su patogenicidad, que el de los típicos hongos oportunistas, aunque este criterio no es compartido por algunos autores.

2.4.1. Histoplasmosis

La histoplasmosis humana está causada por dos variedades de *Histoplasma capsulatum* (Darling 1906), *H. capsulatum* var. *capsulatum* e *H. capsulatum* var. *duboisii*, indistinguibles en su forma micelial o saprofita pero diferentes en su forma parasítica. Ambas variedades comparten la misma

forma teleomorfa: *Ajellomyces capsulatus* (Kwon-Chung y McGinnis, 1979).

Hábitat y epidemiología

Aunque, teóricamente, la distribución de *H. capsulatum* es mundial, habitualmente sólo se encuentra en determinados hábitats: cuevas de murciélagos, posaderos de aves, gallineros y palomares de cualquier parte del mundo, con alta pluviosidad y clima templado o tropical. Predomina en América, desde el Sur de Canadá hasta Argentina, aunque las zonas mejor estudiadas son las cuencas de los ríos Mississippi, Ohio, Missouri, Río de la Plata y la región Serrado do Mar, en Brasil. Además, también existen focos de infección en algunas ciudades, lo que permitiría hablar de una histoplasmosis urbana.

Clínica

En la mayoría de las personas (aproximadamente 95%) la infección no se manifiesta clínicamente y sólo puede constatarse con la prueba de la histoplasmina (intradermoreacción con un dializado de cultivo), considerándose positiva la induración de 5 mm a las 48 h. La resolución espontánea de la primoinfección parece conferir cierta inmunidad a la reinfección. En la forma aguda, los síntomas varían desde un cuadro pseudogripal a cuadros más com-

Tabla 2.2. Formas clínicas de la histoplasmosis. Modificado de Mitchell [13].

Forma	Aguda	Crónica
Pulmonar	Asintomática Leve Moderada Grave	Neumónica o cavitada
Diseminada	Leve	Progesiva mucocutánea

plejos con imágenes radiológicas en forma de calcificaciones diseminadas y otros que asemejan una tuberculosis. La forma crónica corresponde a la evolución de la anterior, suele haber antecedentes de enfermedad pulmonar obstructiva crónica y afecta más a varones mayores de 50 años; cursa con tos y expectoración siendo difícil aislar *H. capsulatum* del esputo. En las formas diseminadas crónicas, el compromiso de las mucosas es muy característico, sobre todo lesiones ulcerogranulomatosas en mucosa bucal, lengua, tabique nasal o laringe. Por último,

en la forma diseminada aguda, que suelen padecer enfermos con sida, puede presentarse meningoencefalitis y focos de osteolisis en las metáfisis de los huesos largos. En la [Tabla 2.2](#) se resumen las diferentes formas clínicas de la histoplasmosis.

Diagnóstico

Puede hacerse aislando el hongo de la sangre, médula ósea, líquido cefalorraquídeo (LCR) o biopsia del tejido infectado. En la visión directa del producto patológico, teñido con Giemsa, se observan las típicas formas de levadura intracelulares, con un halo alrededor, semejando una pequeña cápsula ([Figura 2.19](#)).

2.4.2. Blastomycosis

La blastomycosis es la infección causada por el hongo *Blastomyces dermatitidis* (Gilchrist y Stokes, 1897), cuya forma teleomórfica es *Ajellomyces dermatitidis* (McDonough y Lewis, 1968).

Hábitat y epidemiología

Las áreas endémicas mejor estudiadas de la blastomycosis son el sur de Canadá, las cuencas del río San Lorenzo y de los Grandes Lagos, los Montes Apalaches y las cuencas de los ríos Mississippi y Ohio. También se han descrito casos autóctonos en Africa Central, India, Arabia Saudí y Polonia. En zonas rurales, agrícolas y ganaderas, se ha aislado *B. dermatitidis* del suelo en gallineros, corrales y establos. Su hábitat natural lo constituyen los terrenos con alto contenido orgánico, abonados con deyecciones de animales, pH ácido y elevada humedad, en zonas de clima templado y abundantes lluvias. En los animales domésticos también puede desarrollarse una blastomycosis que suele ser coincidente, en el espacio y en el tiempo, con la del ser humano.

Clínica

La blastomycosis es una infección casi siempre crónica caracterizada por lesiones granulomatosas y supurativas. La lesión más frecuente es la pulmonar pero se reconocen las siguientes formas clínicas: infección pulmonar aguda, infección pul-

monar crónica, enfermedad extrapulmonar crónica (con participación de piel, huesos y tracto genitourinario), forma aguda fulminante, forma primaria cutánea e infección asintomática. Las formas asintomáticas son también las más comunes, conociéndose su incidencia por las intradermoreacciones realizadas con carácter retrospectivo.

Diagnóstico

Mediante el examen microscópico directo de los tejidos biopsiados o del esputo se pueden observar las típicas formas levaduriformes, con una ancha base de gemación, de *B. dermatitidis* (Figura 2.19). El cultivo, a temperatura ambiente y a 35 °C, de los productos patológicos permite el aislamiento e identificación del agente causal.

2.4.3. Coccidioidomicosis

La coccidioidomicosis es la infección causada por *Coccidioides immitis* (Rixford y Gilchrist, 1896), hongo del que no se conoce su fase teleomorfa.

Epidemiología

Es una micosis propia del continente americano. Las zonas endémicas abarcan desde el sudoeste americano a Centroamérica, Venezuela, Paraguay y hasta la Patagonia argentina. Pero, sin duda, el área mejor estudiada comprende los estados de Arizona, Texas y Nuevo México. El desierto mejicano de Sonora también es un importante reservorio de *C. immitis*.

Clínica

La inhalación de los artroconidios puede producir un cuadro pulmonar con o sin diseminación, pero si las defensas del huésped son capaces de destruirlas dejan un estado de inmunidad, que se pone de manifiesto con la intradermoreacción a la coccidioidina. La coccidioidomicosis primaria puede presentar síntomas de reacción alérgica. Pero las formas secundarias suelen manifestarse como una infección sistémica generalizada, con participación ósea, meníngea y cutánea. Las formas diseminadas se observan mayoritariamente en el huésped inmunodeprimido.

Diagnóstico

Mediante el examen microscópico directo

del esputo o de los tejidos biopsiados pueden observarse las características esférulas repletas de endosporas de *C. immitis* (Figura 2.19). Así mismo, el cultivo, a temperatura ambiente y a 35 °C, de los productos patológicos permite el aislamiento e identificación del agente causal.

2.4.4. Paracoccidioidomicosis

La paracoccidioidomicosis es una micosis granulomatosa subaguda, endémica de América Latina, causada por el hongo *Paracoccidioides brasiliensis* (Esplendore y Almeida, 1930) del que no se conoce su fase teleomorfa.

Epidemiología

Aunque se supone que el suelo es su hábitat natural, éste no se conoce con exactitud. Las zonas endémicas son de clima suave (20-24 °C) y lluvias frecuentes, como las laderas de la selva subtropical donde existen los cafetales. *P. brasiliensis* encuentra un ecosistema adecuado en las zonas boscosas de los grandes ríos y lagos de Brasil, Venezuela, Colombia, Paraguay y norte de Argentina. Se ha comprobado que la enfermedad es más frecuente en el varón que la mujer, habiéndose demostrado que una proteína micelial del hongo se une a los estrógenos y no a la testosterona, por lo que la conversión a levadura, forma patógena, estaría más bloqueada en la mujer que en el hombre.

Clínica

La infección primaria suele ser asintomática y puede resolverse o dejar una lesión residual, en ambos casos la intradermoreacción a la paracoccidioidina es positiva. La enfermedad sintomática es una consecuencia de la relación parásito-huésped, siendo importante la virulencia de cada cepa. Las formas sintomáticas se presentan como una forma juvenil aguda, con participación pulmonar y del sistema reticuloendotelial, con adenopatías, hepatoesplenomegalia y afectación ósea, o como una forma crónica del adulto, que supone un 90% de los casos, con lesiones pulmonares y metástasis en diversos órganos. Destacan las lesiones en mucosa orofaríngea, que simulan amigdalitis crónicas, las lesiones periodontales y las laríngeas, así como lesiones úlcero-vegetativas peribucales. Además, puede haber lesiones cutáneas nodulares, necróticas o de tipo absceso frío subcutáneo.

Diagnóstico

En la visión microscópica directa del esputo

se observan las típicas levaduras multigemantes en forma de rueda de timón, características de *P. brasiliensis* (Figura 2.19).

2.4.5. Criptococosis

Por criptococosis se entiende la infección subaguda o crónica, pulmonar o meníngea, causada por la levadura *Cryptococcus neoformans* (Sanfelice y Vuillemin, 1901). Se han identificado 4 serotipos A, B, C y D de *C. neoformans*. Los serotipos A y D producen el estado teleomorfo *Filobasidiella neoformans* (Kwon-Chung, 1975) y los serotipos B y C producen el teleomorfo originalmente denominado *Filobasidiella bacillispora*, pero que en la actualidad se ha comprobado que es idéntico a *C. neoformans* var. *gatti*, por lo que se ha llegado a la conclusión de que la forma teleomorfa *Filobasidiella neoformans* engloba todos los serotipos [14].

Epidemiología

C. neoformans es una especie ubicua en la naturaleza. La extensión de los casos infectados y subclínicos no se conoce, ya que no se ha desarrollado un antígeno adecuado para la intradermoreacción, necesaria en los estudios de población. Su hábitat es el suelo contaminado con material fecal de aves. El reservorio más importante son las palomas, sobre todo la urbana (*Columbia livia*). El hongo no suele aislarse en deyecciones recientes, pero sí en las acumuladas en aleros de edificios, áticos o balcones de casas abandonadas, donde duermen las palomas. Este hábitat urbano, desecado, alcalino y rico en sales de nitrógeno, es ecológicamente restrictivo, pero muy frecuente en nuestro medio.

Clínica

Las levaduras inhaladas, desecadas y de menor tamaño que las observadas en LCR, llegan a los espacios alveolares y el desarrollo de la infección-enfermedad dependerá de la eficacia fagocítica de los macrófagos, así como de la respuesta inmune celular del huésped. Las formas clínicas pueden ser: pulmonar, del sistema nervioso central (SNC), diseminada y mucocutánea. La forma pulmonar suele

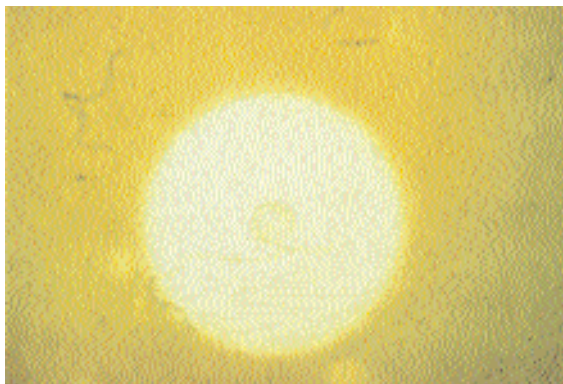


Figura 2.20. Sedimento de líquido cefalorraquídeo observado con tinta china que permite destacar el espesor de la cápsula de *Cryptococcus neoformans* (x100).

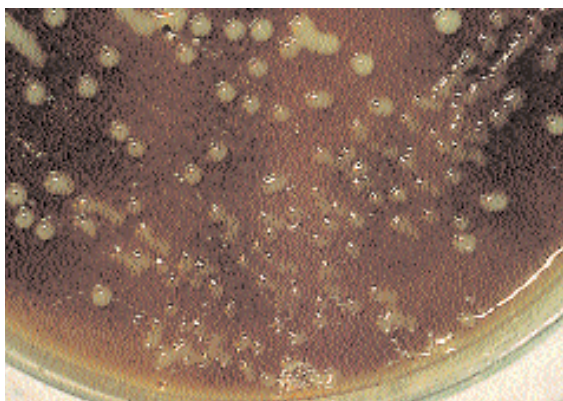


Figura 2.21. Colonias mucoides de *Cryptococcus neoformans* en agar chocolate.

ser asintomática, inespecífica o semejando una tuberculosis aguda con distress respiratorio. La más frecuente es la del SNC, presentándose en forma de meningitis crónica, meningoencefalitis o de granuloma criptocócico cerebral. La forma mucocutánea corresponde a metástasis de la forma diseminada, observándose nódulos subcutáneos en cara y nuca en pacientes VIH positivos o con sida.

Diagnóstico

El LCR es la muestra más adecuada para la observación de las levaduras capsuladas (Capítulo 6) (Figura 2.20) y la determinación del glucuronoxilmanano que forma el polisacárido capsular mediante técnica de látex (Capítulo 14). En la forma diseminada cualquier órgano puede estar afectado. El aislamiento a partir de la sangre fue el método diagnóstico más eficaz en los enfermos con sida antes de la terapia retroviral altamente resolutive. El aislamiento de *C. neoformans* es sencillo pues crece bien en los medios habituales, donde se aprecian las colonias mucoides tan características

(Figura 2.21). En el medio Staib con *Guizzotia abyssinica*, la formación de las colonias marrones ayuda a su identificación (Capítulo 3).

2.5. Micosis sistémicas

Este término se reserva para aquellas micosis invasoras, o que afecten a dos o más órganos no adyacentes, producidas por especies fúngicas patógenas oportunistas. En su etiología están implicadas especies ubicuas, de distribución mundial, que forman parte de la microflora ambiental o son comensales de la piel o mucosas. Habitualmente son eliminadas por los leucocitos polimorfonucleares y macrófagos, pero cuando hay una alteración de la inmunorespuesta del huésped, se ha producido un vacío ecológico por la administración de antibióticos o han tenido lugar circunstancias especiales que afectan a la función del sistema inmune, puede desarrollarse el cuadro clínico que, dadas las características del huésped, suele ser muy grave.

El agente etiológico puede ser cualquier especie fúngica capaz de crecer a 37 °C y cuyos requerimientos nutricionales estén contemplados en los tejidos del huésped: levaduras, hongos miceliares moniliales o dematiáceos, ascomicetos, basidiomicetos y zigomicetos. Siendo los más frecuentes *Candida* spp., *Cryptococcus* spp., *Blastoschizomyces capitatus*, *Trichosporon asahi*, *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Scedosporium* spp., *Mucor* spp., *Rhizopus* spp., así como otros géneros de las familias *Moniliaceae* y *Dematiaceae*.

De todas ellas, las micosis sistémicas más observadas en nuestro medio son las candidiasis, la aspergilosis y la zigomicosis. Su clínica suele ser variada e inespecífica, por lo que el aislamiento en el laboratorio de uno de estos patógenos en un sujeto de riesgo, debe alertar al clínico sobre la existencia de una posible micosis, constituyendo una indicación para la instauración del correspondiente tratamiento antifúngico.

2.5.1. Candidiasis sistémica

La candidiasis sistémica es la micosis sistémica más frecuentemente observada en nuestro medio. Está producida por *C. albicans* y otras especies del mismo género al invadir la sangre u otros órganos profundos.

Epidemiología

Las levaduras del género *Candida* tienen su hábitat natural en la mucosa rectal, vaginal y bucal, por lo que la mayoría de los procesos pueden considerarse de transmisión endógena, aunque también se ha demostrado, mediante tipado molecular, la transmisión interpersonal. La candidemia puede ser el resultado de la contaminación de sondas o catéteres, así como de traumatismos gastrointestinales o, también, del paso a la sangre de una candidiasis ya establecida. La diferenciación entre contaminación por catéter y expresión de una candidiasis sistémica es difícil de establecer, por lo que actualmente se recomienda tratar con antifúngicos cualquier candidemia, independientemente de su origen [15].

Clínica

La sintomatología de una candidemia es similar a la de cualquier sepsis bacteriana, por lo que debe sospecharse clínicamente ante todo paciente de riesgo o inmunodeprimido cuya fiebre no remita a pesar de la terapia antibacteriana. Las infecciones por *Candida* pueden adoptar diversas formas (sepsis, neumonía, endocarditis, artritis, osteomielitis, costochondritis, miositis, peritonitis, meningitis, etc.) y localizaciones (SNC, hígado, bazo, vesícula biliar, ocular, etc.) [3,14,16].

Diagnóstico

A pesar de sus limitaciones, el hemocultivo sigue siendo la mejor técnica para el diagnóstico de una candidemia (Capítulo 6). Por otra parte, desde la perspectiva del laboratorio, también se puede sospechar una candidiasis sistémica cuando exista candiduria en un paciente inmunodeprimido sin sonda uretral. El aislamiento en dos focos de la misma especie de *Candida* también es significativo, así como la presencia de endoftalmitis o de lesiones máculo-nodulares en la piel. El significado clínico de la recuperación de *Candida* en esputo, orina, heces y piel es difícil de valorar ya que puede ser expresión de una invasión o, lo más probable, de una colonización. Por otra parte es de destacar la resistencia a fluconazol de algunas especies como *C. krusei* y *C. glabrata* por lo que la identificación de la especie y, en algunos casos, la determinación de la concentración mínima inhibitoria será de gran utilidad para ayudar al clínico en la correcta terapia de los pacientes con candidiasis sistémica, casi siempre inmunodeprimidos o ingresados en una Unidad de Cuidados Intensivos.

2.5.2. Aspergilosis sistémica

La aspergilosis invasora o sistémica está producida por diversas especies del género *Aspergillus*. *Aspergillus fumigatus* es el agente causal de más del 90% de los casos de aspergilosis invasora, le siguen en frecuencia *A. flavus* y *A. niger*, aunque ésta última especie se asocia más a otomicosis.

Epidemiología

La aspergilosis se transmite por inhalación de las conidias de *Aspergillus* que germinan e invaden los tejidos cuando no son fagocitadas por los macrófagos alveolares ni detenidas por leucocitos polimorfonucleares y el resto del sistema inmune, por lo que los pacientes inmunodeprimidos constituyen el principal grupo de riesgo para adquirir esta grave infección. Los pacientes con neutropenia prolongada y profunda están predispuestos a una neumonía aguda rápidamente progresiva, que se hace sistémica si se mantiene la neutropenia. La aspergilosis pulmonar invasora también es frecuente en pacientes leucémicos y en receptores de órganos. De las diversas metástasis que pueden producirse en una aspergilosis sistémica destaca la del SNC, con infarto cerebral, vasculitis o abscesos cerebrales, según las situaciones.

Clínica

Las diferentes especies de *Aspergillus* pueden colonizar diversas estructuras anatómicas (oidos, senos paranasales, cavidades pulmonares previamente formadas, etc.) o desencadenar cuadros clínicos de tipo alérgico. Pero las infecciones más graves que producen son las debidas a su invasión tisular, bien por inoculación traumática, como las formas oculares, o bien secundarias a la inhalación de sus esporas, como en las formas pulmonares o sinusales.

Diagnóstico

El aislamiento del hongo por cultivo debe acompañarse de la demostración de las hifas en el tejido afectado. La calidad de la muestra es definitiva para la valoración del hallazgo. En esputo, puede corresponder a una colonización, sobre todo si se encuentran las hifas ramificadas y con sus extremos terminales dilatados, indicando que está multiplicándose sobre una materia orgánica, pero no invadiendo como se demuestra con la histopatología. Sin embargo, un cultivo positivo de un esputo en un paciente con neutropenia profunda y leucemia aguda sugiere diagnóstico de aspergilosis invasora [16]. Los hemocultivos suelen ser negativos, por lo que no son útiles para el diagnóstico. Como valiosa alternativa al cultivo convencional, actualmente se dispone de una técnica de ELISA para detectar el

antígeno galactomanano en suero con unos notables índices de sensibilidad y especificidad (Capítulo 14).

2.5.3. Zigomicosis

Mucormicosis ha sido el nombre común que se ha dado a las infecciones por especies del género *Mucor*, pero, como se ha comprobado que otros muchos géneros de los Zygomycetes, pueden causar enfermedad, la denominación debe generalizarse a todos ellos.

Epidemiología

Absidia spp., *Mucor* spp., *Rhizomucor* spp., *Rhizopus* spp., *Cunninghamella* spp., *Mortierella* spp., *Syncephalastrum* spp., *Saksenaea* spp., *Apophysomyces* spp. y *Cokeromyces* spp., entre los Mucorales, y *Conidiobolus* spp. y *Basidiobolus* spp., entre los Entomophthorales, se ha comprobado que pueden actuar como causantes de síndromes clínicos diversos, no siempre sistémicos, sino más frecuentemente subcutáneos. Todos ellos son hongos cosmopolitas, cuyo hábitat natural es la materia orgánica en descomposición.

Clínica

Las formas clínicas más frecuentes de mucormicosis son: rinocerebral, pulmonar, cutánea, intestinal, del SNC, periorbitaria y nasal, afectando paladar duro. En el caso de la entomofthoramicosis, las lesiones más destacadas son en fosas nasales, tejidos paranasales, senos y boca.

Diagnóstico

Como existe invasión vascular y necrosis, la investigación microbiológica debe hacerse de las escaras y exudados negruzcos. El hisopo no es un medio adecuado para obtener la muestra. En el examen microscópico directo se observan las hifas anchas, de 10-20 µm de diámetro, no tabicadas, con ramificaciones en ángulo recto, de anchura variable, como si fuesen cintas medio dobladas (a diferencia de las hifas de *Aspergillus*, *Scedosporium* o *Fusarium* que son más estrechas y uniformes, tabicadas y con ramificaciones en ángulo agudo). El diagnóstico diferencial debe hacerse con la aspergilosis invasora ya que *Aspergillus* también invade los vasos y produce necrosis tisular, para ello el único método definitivo es el cultivo y posterior identificación del agente causal. Sin embargo, aunque estos hongos son muy fáciles de cultivar, su ais-

Referencias

lamiento a partir de las lesiones

1. Guého E, Midgley G, Guillot J. The genus *Malassezia* with description of four new species. *Antonie van Leeuwenhoek* 1996; 69:337-355.
2. Torres-Rodríguez JM, del Palacio-Hernanz A, Guarro-Artigas J, Negróni-Briz R, Pereiro-Miguens M (Eds.) *Micología Médica*. Barcelona, Masson, 1993.
3. Rippon JW. *Medical Mycology*. 3^{ra} Ed. Philadelphia, WB Saunders Company, 1988.
4. de Hoog GS, Guarro J. *Atlas of clinical fungi*. Baarn/Reus, Centraalbureau voor Schimmelcultures/Universitat Rovira i Virgili, 1995.
5. Ajello L, Hay RJ. *Medical Mycology*. Vol. 4. En: Topley and Wilson's *Microbiology and Microbial Infections*. 9^a Ed. London, Arnold, 1998.
6. Rubio Calvo MC, Rezusta A, Gil Tomás J, Benito Ruesca R. Perspectiva micológica de los dermatofitos en el ser humano. *Rev Iberoam Micol* 1999; 16:16-22.
7. Rubio Calvo MC, Rezusta López A, Gil Tomás J, Bueno Ibáñez R, Gómez Lus R. Predominio de las especies zoofílicas en los dermatofitos aislados en Zaragoza. *Rev Iber Micol* 1988; 5:11-20.
8. Rubio Calvo MC, Gil Tomás J, Rezusta López A, Benito Ruesca R. The aetiological agents of tinea capitis in Zaragoza (Spain). *Mycoses* 2001; 43:1-5.
9. Velasco JA, Martín-Pascual A, García A. Epidemiologic study of dermatophytoses in Salamanca (Spain).

que *Aspergillus* spp. Aquéllos producen formas uni-

10. Sabouradía 1979; 17:113-123.
11. Rubio-Calvo MC, Rezusta A, Grasa MP, Salvo S, Gil J, Gómez-Lus R. Micopatología ungueal. Estudio micológico de onicomiosis y *tinea unguium*. *Rev Iber Micol* 1988; 5: 90-99.
12. de Hoog GS, Rubio Calvo MC. A new dematiaceous fungus from human skin. *Sabouradía* 1982; 20: 15-20.
13. Rubio Calvo MC. *Micología general*. Micosis superficiales y cutáneas (Capítulo 40) y Micosis subcutáneas y sistémicas (Capítulo 41). En: García-Rodríguez JA, Picazo JJ (Eds.) *Microbiología Médica*. Madrid, Mosby, 1996.
14. Mitchell TG. *Micología Médica*. En: Joklik WK, Willett HP, Amos B, Wilfert CM. *Zinsser, Microbiología*. 20^a Ed. Buenos Aires, Panamericana, 1994.
15. Kwon-Chung KJ, Bennett JE. *Medical Mycology*. Philadelphia, Lea & Febiger, 1992.
16. Edwards Jr JE, Bodey GP, Bowden A, *et al*. International conference for the development of a consensus on the management and prevention of severe candidal infections. *Clin Infect Dis* 1997; 25: 43-59.
17. Bennett JE. *Mycoses*. En: Mandell, Douglas and Bennett's. *Principles and Practice of Infectious Diseases*, 4^a Ed. New York, Churchill Livingstone, 1995.

resulta particularmente difícil.

celulares en los tejidos mientras que *Aspergillus* spp. no lo hace y se fragmenta muy poco, por lo que los tres primeros tienen más posibilidades de alcanzar los vasos sanguíneos que éste último.

2.5.4. Otros agentes etiológicos

Además de las especies citadas, cualquier otra especie fúngica puede producir un cuadro de micosis sistémica en un huésped inmunodeprimido. La sintomatología que producen es muy inespecífica, obedeciendo más a la enfermedad de base del huésped que a la virulencia de la cepa, por lo que el diagnóstico etiológico se basará exclusivamente en el aislamiento de la especie fúngica correspondiente. *Fusarium* spp., *Scedosporium* spp. y *Acremonium* spp. se aíslan más fácilmente en hemocultivos

Antonio Rezusta López
Aurora Sánchez Sousa
Joaquina Gil Tomás

Para alcanzar el éxito en el diagnóstico micológico es fundamental realizar adecuadamente la recogida de la muestra, su transporte y procesamiento, la siembra de la misma en los medios idóneos y a la temperatura adecuada, así como la identificación e interpretación correcta de los aislamientos.

A la hora de valorar un crecimiento fúngico, hay que tener siempre presente la necesidad de diferenciar un “aislamiento significativo” de otros debidos a hongos contaminantes, ya que no es lo mismo identificar una especie fúngica que diagnosticar una micosis.

En este Capítulo se detallan los fundamentos y recomendaciones básicas del diagnóstico micológico y en los siguientes, las características específicas del procesamiento de cada muestra según el origen anatómico de la misma.

3.1. Recogida de muestras

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

No debe olvidarse la importancia de etiquetar y rellenar adecuadamente el volante de petición, de forma que refleje claramente la sospecha clínica y los factores predisponentes del paciente; destacando, si los hubiera, la existencia de tratamientos que pudieran interferir en el aislamiento del miceto.

3.1.2. Consejos generales para optimizar la recogida de muestras

1. Debe disponerse de un protocolo de recogida de muestras actualizado periódicamente.
2. Es necesario recoger las muestras asépticamente, utilizando contenedores estériles, remitirlas al laboratorio antes de 2 h y sembrarlas lo antes

posible.

3. La muestra debe recogerse antes de instaurar el tratamiento y siempre de la parte activa de la lesión (cuando se sospecha una micosis pulmonar es preferible una muestra respiratoria antes que un hemocultivo).
4. Los hisopos deben ser evitados, siempre que el tipo de lesión lo permita. Pero hay muestras (conducto auditivo, faringe, vagina o cérvix) que no pueden ser recogidas de otra manera.
5. En el caso de heridas abiertas, drenajes o lesiones superficiales, debe limpiarse la zona previamente para evitar contaminaciones.
6. Las muestras de lesiones cerradas y abscesos suelen ser de gran rendimiento. Deben ser aspiradas con jeringa y transferidas a un contenedor estéril, prestando atención a la recogida de gránulos, si los hubiese.
7. El raspado de lesiones de piel y faneras puede realizarse con distintos materiales; los más utilizados son bisturí, moqueta o cepillo.
8. En situaciones que requieran un estudio epidemiológico, debe establecerse la necesidad de una recogida de muestras ambientales, familiares o de animales.

3.2. Transporte de las muestras

Las muestras deben ser transportadas en un recipiente estéril, humidificado y a prueba de vertidos; sin embargo, las muestras dermatológicas pueden transportarse en un recipiente seco (placa de Petri, papel de fotografía negro, entre dos portas, etc.) o, de forma ideal, sembrada directamente sobre el medio de cultivo.

No deben introducirse en medios de transporte, a no ser que sea fácil retirar la muestra del medio.

Los raspados corneales y hemocultivos deben sembrarse directamente en el medio de cultivo adecuado.

Las muestras, una vez obtenidas, deben sembrarse lo antes posible después de la recogida.

Aunque hay pocos estudios sobre el descenso de la viabilidad de los hongos a temperatura ambiente o por la acción del hielo seco, es conocida la dificultad de recuperar *Rhizopus arrhizus* en muestras demoradas y, también, la pérdida de viabilidad de algunos hongos por la desecación, temperatura elevada ($>37^{\circ}\text{C}$) o baja ($<10^{\circ}\text{C}$), sobrecrecimiento bacteriano, presencia de leucocitos, etc. [1].

Las muestras cuyo transporte se prolongue más de 2 h deben almacenarse a 4°C , excepto la sangre y los líquidos estériles ($30\text{--}37^{\circ}\text{C}$) y las muestras dermatológicas ($15\text{--}30^{\circ}\text{C}$) [2].

3.3. Procesamiento de las muestras

En términos generales, los procedimientos utilizados en el laboratorio de bacteriología son adecuados para el cultivo de hongos, pero hay que tener en cuenta que, habitualmente, la carga microbiana es inferior en el caso de los hongos con respecto a las bacterias. Esto obliga a recoger mayor cantidad de muestra para obtener un rendimiento óptimo.

3.3.1. Consejos generales para optimizar el procesamiento de muestras

1. Comprobar que el etiquetado de la muestra es correcto
2. Registrar toda la información necesaria que pudiera afectar a la calidad de la muestra y que represente interés diagnóstico (aspecto, color, olor, consistencia, presencia de coágulos, etc.), así como todo lo relacionado con su recogida, transporte y conservación.
3. Durante el procesamiento, deben seguirse todas las medidas de seguridad necesarias, tanto para el personal como para la muestra.
4. El procesamiento debe llevarse a cabo tan pronto como sea posible para garantizar la viabilidad del hongo, utilizando el medio de cultivo y la temperatura de incubación más adecuada.
5. La recuperación de los hongos es imprescindible para su identificación y la realización de pruebas de sensibilidad.
6. El tipo de procesamiento y los medios utilizados dependen de las características de cada muestra.

3.3.2. Preparación de la muestra

Para optimizar tanto la observación microscópica como el cultivo, es necesario preparar la muestra, aunque algunas se pueden inocular directamente sin que sea necesaria su manipulación previa:

1. Los tejidos deben ser troceados e inoculados en pequeños trozos en el medio de cultivo con el fin de facilitar el crecimiento o la penetración de algunos colorantes como el blanco de calcoflúor. La utilización de homogenizadores no está completamente aceptada ya que puede destruir a los hongos no septados. Las muestras altamente viscosas, tales como el esputo, deben fluidificarse, sin diluirlas excesivamente. Y, si son muy diluidas, deben concentrarse mediante centrifugación.
2. Los líquidos orgánicos (LCR, pleural, peritoneal, articular, etc.) deben concentrarse por centrifugación ($1.500\text{--}2.500\text{ g}$ durante 10 min) o filtración ($0,2\text{ }\mu\text{m}$ de poro), siempre que haya suficiente cantidad. Estas muestras pueden requerir un procesamiento especial, o ser sembradas directamente en el medio de cultivo.
3. Los fragmentos ungueales se trocean progresivamente con un bisturí y se pulverizan.

3.3.3. Cultivo de la muestra

En la **Tabla 3.1** se resumen los medios de cultivo recomendados habitualmente según el tipo de micosis.

3.3.4. Observación de la muestra

El diagnóstico definitivo de la mayoría de las micosis requiere el aislamiento e identificación del hongo a partir del cultivo, lo que supone, con frecuencia, varios días o semanas de dilación.

No obstante, el método más rápido para la detección de estructuras fúngicas en una muestra clínica es el examen microscópico de la misma. Este examen puede aportar, en ocasiones, un diagnóstico definitivo (pitiriasis versicolor) y en otras, un diagnóstico tentativo previo a la confirmación definitiva por cultivo. Por lo tanto, es un procedimiento que

Tabla 3.1. Medios de cultivo básicos recomendados.

Micosis superficiales	<ul style="list-style-type: none"> • Agar glucosado de Sabouraud (SDA) + cloranfenicol (SDAC) • Agar glucosado de Sabouraud + cloranfenicol + cicloheximida (Mycobiotic®, Mycosel®) • <i>Dermatophyte test medium</i> (DTM), opcional • Ante la sospecha de <i>Malassezia</i> utilizar medio de Leeming (LNA) o de Dixon modificado (mDixon), en el caso de pitiriasis no es necesario el cultivo para el diagnóstico • Para la detección de <i>Candida</i> en las muestras mucocutáneas, la utilización de medios cromogénicos facilita la detección de cultivos mixtos, y la identificación rápida
Micosis subcutáneas	<ul style="list-style-type: none"> • SDA, SDAC, Mycobiotic o Mycosel (MYC), Agar infusión cerebro-corazón (BHIA)
Micosis sistémicas	<ul style="list-style-type: none"> • SDAC • BHIA (Dimórficos) • Agar de Staib (<i>Cryptococcus</i>) • BHIA con antibacterianos e, incluso, con cicloheximida en muestras muy contaminadas (Dimórficos) • LNA o mDixon (<i>Malassezia</i>)
Miscelánea (aspergilosis, mucormicosis, otomicosis)	<ul style="list-style-type: none"> • SDAC

debería ser realizado en todos los laboratorios ya que puede hacerse mediante técnicas sencillas, permitiendo dirigir los medios adecuados para el cultivo de la muestra. En el Capítulo 14 de esta Guía se detallan las características de las técnicas de examen microscópico más utilizadas en Micología.

Las limitaciones y los problemas del examen microscópico también deben ser tenidos en cuenta:

- un examen negativo no excluye la infección;
- el examen microscópico puede originar falsos positivos al confundirse ciertas estructuras con elementos fúngicos (linfocitos lisados por *Cryptococcus neoformans* en la tinción con tinta china, fibras de colágeno o del hisopo pueden confundirse con elementos fúngicos, gotas de grasa con levaduras gemantes, etc);
- si la muestra es escasa, el cultivo debe ser prioritario.

El examen microscópico debe realizarse, al menos, en todas las muestras con alta sospecha de micosis; aunque lo ideal sería realizarlo siempre que fuese posible.

Las muestras para estudio micológico deben ser examinadas tanto macroscópica como microscópicamente:

Observación macroscópica

Antes de inocular los medios de cultivo y realizar el examen microscópico, la muestra debe ser examinada en busca de gránulos, material caseoso, purulento, hemorrágico o necrótico.

Examen microscópico

La observación microscópica se realiza con bajo aumento, seguida de alto aumento en seco y, si es necesario, con objetivo de inmersión. Las dos formas observadas habitualmente son levaduras y/o elementos miceliares.

Es aconsejable utilizar periódicamente controles positivos y negativos y, si una tinción se emplea ocasionalmente, deben emplearse siempre controles que aseguren su correcta utilización.

Aunque es muy difícil identificar una especie fúngica por la morfología observada en el examen microscópico directo de la muestra, algunas estructuras pueden asociarse a ciertos géneros o especies:

Levaduras

- Células, con o sin gemas, de varios tamaños y formas, posiblemente sean *Candida* spp. u hongos dimórficos.
- Células de pared gruesa, generalmente con una gema de base amplia, podrían corresponder a *Blastomyces dermatitidis*.
- Células de pared delgada con gemación múltiple rodeando a la célula madre, posiblemente sean

Paracoccidioides brasiliensis.

- d. Células rodeadas de una cápsula grande, probablemente corresponden a *C. neoformans*.
- e. Células pequeñas, de gemación simple observadas en tinciones especiales, posiblemente son *Histoplasma capsulatum*.
- f. Células con pseudohifas: *Candida* spp., *Geotrichum* spp., o *Trichosporon* spp. Las dos últimas pueden mostrar artrosporas.
- g. Células redondas de pared gruesa de varios tamaños, algunas de las cuales (las más grandes) pueden contener esporas podrían tratarse de esférulas de *Coccidioides immitis*. Sin embargo, *Rhinosporidium seeberi* también puede mostrar esférulas grandes y endosporas.

**Elementos miceliales
(con o sin otras estructuras asociadas)**

- a. Hifas no septadas, de pared gruesa, algunas de las cuales pueden mostrar ramificaciones en 90°: *Rhizopus* spp., *Mucor* spp., *Absidia* spp.
- b. Hifas septadas, ramificadas, algunas en V, con o sin cabezas de *Aspergillus*, posiblemente correspondan a *Aspergillus* spp.
- c. Hifas septadas, pigmentadas (marrones oscuras) con o sin cuerpos esféricos, probablemente sean de hongos dematiáceos.
- d. Racimos de pared gruesa y oscura, con apariencia de gemas, posiblemente pertenezcan a un agente de cromomicosis.
- e. Fragmentos de hifas con o sin esporas, con o sin levaduras probablemente correspondan a dermatofitos o a *M. furfur* complex.

Las técnicas más habitualmente utilizadas para la observación microscópica de las muestras se resumen en la **Tabla 3.2** y se comentan detalladamente en el Capítulo 14.

3.4. Medios de cultivo

El objetivo fundamental de la utilización de los medios de cultivo es optimizar el crecimiento de los microorganismos. El primer medio de cultivo que permitió el aislamiento de los gérmenes en medios artificiales fue el propuesto por Koch, en 1876, basado en el uso de gelatina. Posteriormente, Frost en 1909 utilizó medios deshidratados y, en 1919, añadió agar, lo que proporcionó un gran avance en el estudio de la microbiología.

La composición básica de un medio incluye nutrientes, agente solidificante (en los medios sólidos o semisólidos), pH adecuado y componentes específicos. En los medios de cultivo para el aislamiento de hongos, los antimicrobianos se utilizan con frecuencia, tanto para inhibir el crecimiento bacteriano como el de otros hongos ambientales. Atendiendo a su composición, los medios de cultivo puede ser generales, enriquecidos, selectivos, diferenciales y especializados:

A. Generales: El más característico y clásico es el agar glucosado de Sabouraud (SDA) y su equivalente en EEUU, el medio para mohos. Ambos se utilizan frecuentemente para el aislamiento a partir de la muestra y para la descripción de las

Tabla 3.2. Técnicas de observación microscópica.

En fresco	Tinciones
<ul style="list-style-type: none">• KOH• KOH + tinta Parker• KOH + blanco calcoflúor• Tinta china (<i>Cryptococcus</i>)	<ul style="list-style-type: none">• KOH + tinta Parker, KOH + blanco calcoflúor: Uso general• Giemsa: micetoma, histoplasmosis, coccidioidomicosis, <i>Pneumocystis</i>, otras micosis cutáneas con exudado o pus• PAS: micetoma, Coccidioidomicosis, onicomycosis• Grocott: <i>Pneumocystis</i>• Fontana Masson: <i>Pneumocystis</i>• Inmunofluorescencia: <i>Pneumocystis</i>

características de la mayoría de los hongos.

B. Enriquecidos: Se utilizan especialmente en micosis sistémicas endémicas (histoplasmosis, coccidioidomicosis, etc.), un ejemplo es la infusión cerebro-corazón (BHI).

C. Selectivos: Son medios que favorecen el aislamiento de los microorganismos deseados impidiendo el de otros. Los componentes más utilizados como agentes selectivos son antibacterianos (cloranfenicol, gentamicina, penicilina, estreptomycin) y también inhibidores de hongos, como la cicloheximida que es especialmente útil en las muestras cutáneas y respiratorias de micosis sistémicas endémicas.

E. Diferenciales: Se utilizan para ayudar a la identificación del hongo basada en la apariencia de éste en dicho medio, merced a la adición de determinados componentes como por ejemplo sustancias cromógenas, o indicadores de pH como en el DTM (que también es selectivo).

F. Especializados: Son aquellos medios que contienen algún componente (*Guizotia abyssinica*) destinado a aislar un agente concreto (*Cryptococcus neoformans*) o a favorecer la identificación de ciertas especies (medio de Czapeck).

3.4.1. Preparación de los medios de cultivo

La buena calidad de los medios es indispensable para conseguir el aislamiento y la identificación en Micología; por lo tanto, cuando se utilicen medios comerciales es necesario tener en cuenta la garantía que aporta el proveedor y la calidad de la distribución.

Cuando se prepara un medio deshidratado deben seguirse rigurosamente las instrucciones del fabricante, evitando errores en la forma de disolverlo o suspenderlo, en la temperatura y/o duración de la esterilización, para preservar la calidad del producto final. La esterilización en autoclave es más eficaz si se utilizan frascos de volúmenes inferiores a 500 ml; si se han utilizado imanes para la disolución, deben retirarse antes de introducir los medios en el autoclave. También hay que tener presente que algunos antibióticos deben añadirse al medio una vez esterilizado y a la temperatura adecuada, para no ser desactivados por las altas temperaturas de la esterilización.

3.4.2. Control de calidad

Para asegurar la correcta utilización de los medios, debe controlarse periódicamente sus características más importantes: apariencia, esterilidad, pH y funcionamiento. El funcionamiento se puede evaluar utilizando las cepas de control adecuadas para cada medio. En este proceso se recomienda seguir las especificaciones del documento M22-A del NCCLS en aquellos casos en los que está establecido [3].

Los controles de calidad deben realizarse tanto, a los medios elaborados en el laboratorio, como a los medios comerciales ya preparados; en este caso, es conveniente solicitar al fabricante los controles a utilizar y los resultados para el lote suministrado. En el Capítulo 18 de esta Guía se detallan todos los aspectos del control de calidad de los medios de cultivo.

3.4.3. Soporte de los medios de cultivo

El soporte habitual para los medios de cultivo en Micología suele ser tubos de cristal o placas de Petri (90 mm). La elección depende del usuario; autores como De Hoog y Guarro proponen el uso habitual de placas excepto, por razones de seguridad, en los casos de sospecha de histoplasmosis, coccidioidomicosis, blastomicosis, paracoccidioidomicosis e infecciones por *Penicillium marneffe* [4].

Si se utilizan tubos, deben incubarse en posición horizontal las primeras 24 h para que el inóculo no se concentre en el fondo. Los tubos no deben ser los habituales de Microbiología porque, en ellos, las colonias no son fáciles de aislar. Si los tubos utilizados son de tapón de rosca, el cierre debe mantenerse parcialmente abierto para garantizar las mejores condiciones atmosféricas.

Cuando se eligen placas, es conveniente que contengan 40 ml de medio para evitar que se sequen y deben sellarse con cinta adhesiva para que no se abran involuntariamente. El precintado debe ser permeable al aire, ya que cuando el aire circula libremente se favorece la producción de pigmento y la superficie del agar se seca, permitiendo el desarrollo de micelio aéreo y esporas.

3.4.4. Almacenamiento

Los medios se deben guardar refrigerados a 2-8 °C. Para mejorar su conservación y prevenir la desecación, es aconsejable invertir las placas e introducirlas en bolsas de plástico.

Las placas de Petri suelen conservarse en buen estado unos tres meses, mientras que los medios semisólidos o líquidos en tubo de rosca se conservan bien hasta seis meses. Sin embargo, ciertos medios, al contener sustancias inestables (antibióticos, vitaminas, sangre, etc.), no se conservan en buen estado tanto tiempo. También hay que tener presente que algunos componentes de ciertos medios pueden verse afectados por la luz, por lo que estos medios deben almacenarse en contenedores opacos.

Como norma general, todos los medios deben utilizarse antes de la fecha de caducidad indicada por el fabricante y, antes de su utilización, deben atemperarse, durante unos minutos, a temperatura ambiente.

3.4.5. Elección de los medios de cultivo

Los medios más utilizados en el cultivo de hongos son: agar glucosado de Sabouraud, habitualmente con la modificación de Emmons (SDA); agar infusión cerebro-corazón (BHIA) con o sin sangre de cordero al 5%, con o sin antibacterianos; agar inhibidor para mohos (MIA); agar Mycosel/Mycobiotic y agar glucosado de patata (PDA). Sin embargo, los hongos también pueden crecer en medios no selectivos, incluidos la mayoría de los medios bacteriológicos, si se incuban el tiempo suficiente.

La elección y el número de medios a utilizar están condicionados por el coste, la disponibilidad y las preferencias personales, pero siempre se deben incluir medios con antibacterianos y sin ellos.

La incorporación de cicloheximida, inhibidor de muchos hongos considerados contaminantes, ayuda especialmente en las micosis de la piel, aunque pueda inhibir algunos patógenos fúngicos importantes; por ello, debe utilizarse siempre en combinación con otro medio sin cicloheximida.

El aislamiento de algún hongo puede verse dificultado por otros factores como la acidificación del medio utilizado (para impedir el crecimiento de bacterias) o, en el caso de *Malassezia* spp., la utilización de gentamicina. [5]

Los medios más empleados en Micología

pueden agruparse en dos categorías en función de su utilidad: aislamiento e identificación. Para el aislamiento, la utilización de 3-4 medios prácticamente cubre todas las necesidades: SDA con/sin antimicrobianos (el más utilizado en Europa y sustituido con frecuencia en EE.UU. por MIA); un medio con cicloheximida y agar infusión cerebro corazón, para las micosis sistémicas endémicas.

Sin embargo, en ciertas situaciones es recomendable la utilización de otros medios:

- i) LNA, Dixon, o SDAC con aceite de oliva para el aislamiento de *Malassezia*;
- ii) medio cromogénico en las muestras de mucosas, para facilitar el diagnóstico de infecciones mixtas,
- iii) medio para *Cryptococcus*, para facilitar su detección en muestras donde es frecuente el aislamiento de otras levaduras (muestras respiratorias).

Para la identificación, puede ser necesario un número mayor de medios que dependerá del número de muestras, las etiologías más probables en la zona geográfica, las posibilidades del laboratorio y el nivel diagnóstico esperable según el tipo de centro.

3.4.6. Medios de cultivo más utilizados

Agar Czapek Dox*	
Se utiliza en el cultivo de hongos saprofitos, especialmente <i>Aspergillus</i> spp. y <i>Penicillium</i> spp. Es el medio de referencia para la identificación de <i>Aspergillus</i> spp.	
Composición	
Nitrato sódico (NO ₃ Na)	3 g
Fosfato dipotásico (PO ₄ K ₂ H)	1 g
Sulfato magnésico (SO ₄ Mg.7H ₂ O)	0,5 g
Cloruro potásico (ClK)	0,5 g
Sulfato ferroso (SO ₄ Fe.7H ₂ O)	0,01 g
Sacarosa	30 g
Agar	15 g
Agua desionizada	1.000 ml
Preparación	
a) Calentar hasta disolver todos los componentes.	
b) Esterilizar a 121 °C durante 15 min.	
c) Dispensar en placas de Petri.	
Control de calidad	
Apariencia: Ámbar pálido, sólido transparente.	
pH final a 25 °C: 7,3 ± 0,2.	
<i>Aspergillus flavus</i> : crece, colonia amarilla-verde.	
(*) Disponible comercialmente (Becton Dickinson, Difco, Merck, Remel)	

Agar Dixon modificado (mDixon)

Utilizado en el cultivo de *Malassezia* spp. Puede modificarse añadiendo cloranfenicol o bien cloranfenicol y cicloheximida.

Composición

Extracto de malta	36 g
Peptona	6 g
Ox bile, desecada	20 g
Tween 40	10 ml
Glicerol	2 ml
Ácido oleico	2 ml
Agar	12 g
Agua desionizada	1.000 ml

Preparación

- Calentar hasta disolver todos los componentes.
- Esterilizar a 121 °C durante 15 min.
- Dispensar en placas de Petri.

Control de calidad

Aspecto: Blanco amarillento, no muy sólido.

Malassezia restricta: Crece.

En el medio inhibidor:

M. restricta: Crece.

Aspergillus flavus: Inhibición parcial o completa.

Staphylococcus epidermidis: Inhibición parcial o completa.

Comprobar el crecimiento de las 7 especies.

Agar glucosado de patata* (PDA)

Es un medio utilizado para la estimulación de la formación de conidias, en la preparación de inóculos de hongos miceliales y en la estimulación de producción de pigmentos: rojo en *Trichophyton rubrum*, rosa salmón en *Microsporum audouinii* y amarillo en *Microsporum canis*. Se utiliza con frecuencia en microcultivos para observar las características morfológicas.

Composición

Patata	200 g
Glucosa	10 g
Agar	18 g
Agua desionizada	1.000 ml

Preparación

- Pelar las patatas, cortarlas en cubos y hervir en agua durante 1 h.
- Filtrar, añadir la glucosa y el agar, hervir hasta disolver el agar completamente y filtrar con papel Whatman nº 2.
- Ajustar el volumen a un litro.
- Esterilizar a 121°C durante 15 min.

Control de calidad

- Aspecto: incoloro o amarillo suave, medio sólido, transparente o translúcido.
- pH final a 25 °C: 5,6 ± 0,2.

M. audouinii: pigmento salmón en el reverso de la colonia.

T. rubrum: rojo intenso en el reverso de la colonia.

T. mentagrophytes: pigmento marrón en el reverso.

(*) Disponible comercialmente (Becton Dickinson, bioMérieux, Merck, Oxoid, Remel)

Agar glucosado de Sabouraud*

Medio poco utilizado ya que normalmente se usa la modificación de Emmons.
Puede no crecer *Blastomyces dermatitidis*.

Composición

Peptona	10 g
Glucosa	40 g
Agar	15 g
Agua desionizada	1.000 ml

Preparación

- Mezclar los ingredientes y hacerlos hervir hasta su disolución completa.
- Esterilizar a 121 °C durante 15 min.
- Dispensar en tubos o placas (si se utilizan tubos de cristal, también se puede dispensar antes de esterilizar).
- Solidificar en posición inclinada.

Modificación

Añadir cloranfenicol (50 mg/l).

Control de calidad

- Aspecto: medio sólido, ámbar, transparente.
- pH final a 25 °C: $5,6 \pm 0,2$.

Trichophyton mentagrophytes: crece.

Staphylococcus epidermidis: inhibición parcial o total en el medio con cloranfenicol.

(*) Disponible comercialmente (Becton Dickinson, Fluka, Oxoid, Remel, Sigma)

Agar glucosado de Sabouraud modificado por Emmons* (SDA)

Es el medio estándar para el aislamiento, esporulación y conservación de muchos hongos. El cambio en el pH y la concentración de glucosa favorece la esporulación.

Composición

Peptona	10 g
Glucosa	20 g
Agar	15 g
Agua desionizada	1.000 ml

Preparación

- Mezclar los ingredientes y hacerlos hervir hasta su disolución completa.
- Esterilizar a 121 °C durante 15 min.
- Dispensar en tubos o placas (si se utilizan tubos de cristal, también se puede dispensar antes de esterilizar).
- Solidificar en posición inclinada.

Modificación (SDAC)

Añadir cloranfenicol (50 mg/l).

Control de calidad

- Aspecto: medio sólido, ámbar, transparente.
- pH final a 25 °C: $7,0 \pm 0,2$.

Trichophyton mentagrophytes: crece.

Staphylococcus epidermidis: inhibición parcial o total en el medio con cloranfenicol.

(*) Disponible comercialmente (Becton Dickinson, bioMérieux, Fluka, Oxoid, Remel)

Agar harina de maíz con Tween 80* (Corn Meal Agar)

Se utiliza en el cultivo y diferenciación de especies de *Candida* basándose en las características miceliales. El Tween 80 se incorpora para demostrar la formación de clamidosporas. Si se le añaden 10 g de glucosa puede utilizarse en la diferenciación de *Trichophyton rubrum* y *Trichophyton mentagrophytes* basándose en la producción de pigmento.

Composición

Harina de maíz	40 g
Agar	20 g
Tween 80	3 ml
Agua desionizada	1.000 ml

Preparación

- Mezclar la harina de maíz en agua.
- Hervir a fuego lento durante 1 h.
- Filtrar con gasa.
- Medir y completar hasta 1.000 ml. Añadir el agar y calentar hasta disolver. Filtrar otra vez si fuese necesario.
- Esterilizar a 121 °C durante 10 min. Filtrar.
- Añadir el agar y calentar hasta disolver.
- Esterilizar a 121 °C durante 15 min.
- Dipensar en placas de Petri.

Control de calidad

Candida albicans produce clamidosporas.

(*) Disponible comercialmente (Becton Dickinson, Difco, Remel)

Agar infusión de cerebro corazón* (BHIA)

Puede utilizarse como medio enriquecido para aumentar los aislamientos de *Cryptococcus neoformans* a partir de muestras estériles como el LCR. Mantenimiento de la fase levaduriforme de algunas micosis sistémicas, ya sea con sangre o sin ella. En general está indicado para el aislamiento de una gran variedad de patógenos, incluyendo levaduras, mohos y bacterias como *Nocardia*. Adicionado de sangre de carnero al 10%, se utiliza para el aislamiento de todos los hongos incluidos los dimórficos. Pueden añadirse antibacterianos (cloranfenicol y/o gentamicina) para convertirlo en selectivo. En algunas ocasiones también puede adicionarse cicloheximida (facilita el aislamiento de *Histoplasma capsulatum* y *Blastomyces dermatitidis*).

Preparación

- Preparar de acuerdo con el fabricante.
- Hervir los componentes hasta su completa disolución.
- Dispensar en matraces o tubos.
- Esterilizar a 121 °C durante 15 min.
- Enfriar en posición inclinada, si se utilizan tubos.

Control de calidad

Aspecto: Ámbar claro a semitransparente, sin precipitado (cuando no está adicionado de sangre).
pH final: 7,4 ± 0,2.

Neisseria meningitidis ATCC 13090: crecimiento aceptable a bueno.
Streptococcus pneumoniae ATCC 6303: crecimiento bueno a excelente.
Streptococcus pyogenes ATCC 19615: crecimiento bueno a excelente.

(*) Disponible comercialmente. También puede utilizarse en forma de caldo (Becton Dickinson, Biomedic, Difco, Fluka, Oxoid)

Agar inhibidor para mohos* (MIA)

Es un medio enriquecido con sales inorgánicas, cloranfenicol y gentamicina. Se utiliza en el aislamiento de hongos sensibles a la cicloheximida (*Cryptococcus*, zigomicetos, etc.) de muestras contaminadas. Permite el desarrollo de la mayoría de los mohos y de las levaduras.

Composición

Triptona	3 g	Sal A:	
Extracto de carne	2 g	PO ₄ H ₂ Na	25 g
Dextrosa	5 g	PO ₄ HNa ²	25 g
Extracto de levadura	5 g	H ₂ O	250 ml
Almidón soluble	2 g	Sal C:	
Dextrina	1 g	SO ₄ Mg.7H ₂ O	10 g
Cloranfenicol	0,125 g	SO ₄ Fe.7H ₂ O	0,5 g
Gentamicina	5 mg	ClNa	0,5 g
Sal A	10 ml	SO ₄ Mn.7H ₂ O	2 g
Sal C	20 ml	Agua desionizada	250 ml
Agar	17 g		
Agua desionizada	970 ml		

Preparación

- Calentar hasta disolver todos los componentes. Enfriar y ajustar el pH a 6,7.
- Esterilizar a 121 °C durante 15 min.
- Dispensar en placas de Petri.

Control de calidad

Trichophyton mentagrophytes: Crece.
Staphylococcus epidermidis: Inhibición parcial o completa.

(*) Disponible comercialmente (Becton Dickinson)

Agar con leche, glucosa y púrpura de bromocresol*

Puede utilizarse para la diferenciación de *Trichophyton rubrum* y *Trichophyton mentagrophytes*. *Trichophyton rubrum* melanoide secreta un pigmento que puede parecer alcalinización. El pigmento típico de *T. rubrum* puede verse a través de la colonia, pero no a través del medio. *T. mentagrophytes* granular puede necesitar 10 días para originar un positivo claro. *Microsporum persicolor* crece profusamente pero no alcaliniza.

Composición

- Solución A:

Leche desnatada en polvo	80 g
Púrpura de bromocresol 1,6%	2 ml (diluido en etanol)
Agua desionizada	1.000 ml
- Solución B:

Glucosa	40 g
Agua desionizada	200 ml
- Solución C:

Agar	30 g
Agua desionizada	800 ml

Preparación

- Preparar las soluciones A y B y esterilizar por separado a 115 °C durante 8 min.
- Hervir la solución C hasta disolver el agar completamente y esterilizar a 121 °C durante 15 min.
- Añadir las soluciones A y B a la C, mezclar, enfriar a 50 °C y ajustar el pH a 6,6 con ácido clorhídrico 1N.
- Dispensar asépticamente en tubos y dejar enfriar en posición inclinada.

Control de calidad

- Aspecto: Medio sólido, azul cielo, opaco.
 - pH final a 25 °C: 6,6 ± 0,1.
- T. rubrum*: Crecimiento restringido y sin cambio de pH a los 7 días a 25 °C.
T. mentagrophytes: Crecimiento profuso y alcalinización a los 5 días a 25 °C.

Agar Leeming & Notman (ALN)

Utilizado en el cultivo de *Malassezia* spp. Puede modificarse añadiendo cloranfenicol o bien cloranfenicol y cicloheximida.

Composición

Peptona	10 g
Glucosa	5 g
Extracto de levadura	100 mg
Ox bile desecada	8 g
Glicerol	1 ml
Monoestearato de glicerol	500 mg
Tween 60	0,5 ml
Leche de vaca entera	10 ml
Agar	12 g
Agua desionizada	1.000 ml

Preparación

- Calentar todos los componentes (excepto la leche) hasta disolver correctamente.
- Esterilizar a 121° C durante 15 min.
- Añadir la leche.
- Dispensar en placas.

Control de calidad

Aspecto: Blanco amarillento, no muy sólido.

Malassezia restricta: Crece.

En el medio inhibidor:

M. restricta: Crece.

Aspergillus flavus: Inhibición parcial o completa.

Agar Sabouraud con cicloheximida y cloranfenicol* (MYC)

Es un medio selectivo utilizado para el aislamiento de hongos patógenos a partir de muestras muy contaminadas con hongos saprofitos y bacterias. Se utiliza fundamentalmente en el aislamiento de dermatofitos y hongos dimórficos. Inhibe algunas especies de hongos de interés médico (*Candida no albicans*, *Aspergillus*, *Zygomycetes*, *Cryptococcus neoformans*, etc.).

Composición

Se utilizan fundamentalmente Mycosel y Mycobiotic ambos comercializados.

Preparación

De acuerdo con las instrucciones, evitar manipular la cicloheximida.

Control de calidad

Aspecto: Agar firme, amarillento, transparente.

Trichophyton mentagrophytes: Crece.

Aspergillus flavus: Inhibición parcial o completa.

Staphylococcus epidermidis: Inhibición parcial o completa.

(*) Disponible comercialmente (Becton Dickinson, Biomedics, Bio-Rad, Difco, Oxoid, Remel, Sigma)

Agar de Staib (*Guizotia abyssinica*). Agar semillas de alpiste

Utilizado para aislar *Cryptococcus* spp. y *Cryptococcus neoformans*. *C. neoformans* es el único que al metabolizar la *Guizotia abyssinica* (alpiste), produce melanina originando un color marrón oscuro. El cloranfenicol lo convierte en medio selectivo. También puede ser útil en la diferenciación de *Candida dubliniensis* [6].

Composición

Glucosa	10 g
Creatinina	0,78 g
Cloranfenicol	0,05 g
Difenilo (disuelto en 10 ml de etanol 95%)	100 mg
<i>Guizotia abyssinica</i>	70 g
Agar	20 g
Agua desionizada	1.000 ml

Preparación

- Moler las semillas y añadir 350 ml de agua.
- Esterilizar en autoclave y filtrar.
- Añadir agua hasta 1.000 ml.
- Añadir el resto de los componentes excepto el difenilo.
- Esterilizar. Enfriar a 45°C.
- Añadir el difenilo antes de dispensar el medio en las placas.

Controles

C. neoformans y *Cryptococcus* spp.

Agar *Trichophyton* (1 a 7)*

Son siete medios que se utilizan en la identificación de especies de *Trichophyton* basándose en sus requerimientos nutricionales. El crecimiento se valora desde el 1 al 4 (0 = no-crecimiento; 1 = crecimiento ligero; 2 = parcialmente estimado, pero inferior al control; 4 = crecimiento comparable con el control).

Composición

- | | |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"> <i>Trichophyton</i> agar #1: Ácidos casamínicos (libres de vitaminas) 2,5 g Glucosa 40 g Fosfato monopotásico ($\text{PO}_4 \text{ KH}_2$) 1,8 g Sulfato magnésico ($\text{SO}_4 \text{ Mg} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 0,1 g Agar 15 g Agua desionizada 1.000 ml <i>Trichophyton</i> agar # 2 = # 1 + inositol 50 mg <i>Trichophyton</i> agar # 3 = # 1 + inositol 50 mg + tiamina. CIH 0,2 mg <i>Trichophyton</i> agar # 4 = # 1 + tiamina. CIH 0,2 mg | <ul style="list-style-type: none"> <i>Trichophyton</i> agar # 5 = # 1 + ácido nicotínico (niacina) 2,0 mg <i>Trichophyton</i> agar #6: Nitrato amónico ($\text{NO}_3 \text{ NH}_4$) 1,5 g Glucosa 40 g Fosfato monopotásico ($\text{PO}_4 \text{ KH}_2$) 1,8 g Sulfato magnésico ($\text{SO}_4 \text{ Mg} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 0,1 g Agar 15 g Agua desionizada 1.000 ml <i>Trichophyton</i> agar # 7 = # 6 + histidina. CIH 30 mg |
|--|---|

Preparación

- Mezclar los ingredientes y hervir hasta disolver completamente.
- Dispensar en tubos.
- Esterilizar a 121 °C durante 15 min.
- Enfriar en posición inclinada.

Control de calidad

- Aspecto: Agar inclinado, ámbar, transparente.
- pH final a 25 °C: $6,8 \pm 0,2$

(*) Disponible comercialmente (Becton Dickinson, Difco, Remel)

Agar urea de Christensen*

Se utiliza en la identificación de algunos dermatofitos, especialmente *Trichophyton rubrum* de *Trichophyton mentagrophytes* y de algunas levaduras (*Cryptococcus neoformans*).

Composición

Peptona	1 g
Glucosa	1 g
CINa	5 g
PO ₄ KH ₂	2 g
Rojo de fenol	12 mg
Agar	20 g
Agua desionizada	900 ml

Preparación

- Esterilizar los 900 ml de agar a 121 °C durante 15 min.
- Añadir 100 ml de solución de urea (20% en agua, esterilizar por filtración) a 900 del medio enfriado a 50 °C.
- Dispensar en tubos. Solidificar en posición inclinada.
- También puede prepararse a partir Urea agar base (Christensen), que se esteriliza por filtración y se añade al agar estéril.

Control de calidad

Aspecto: Agar inclinado, naranja, transparente.
pH final: 6,8 ± 0,2

T. mentagrophytes: ureasa positiva (rojo).

T. rubrum: ureasa negativa (naranja).

Cuando se usa para levaduras: *C. neoformans* (positiva) y *Candida albicans* (negativa).

(*) Disponible comercialmente (Becton Dickinson, Biomedics, Difco, Fluka, Merck, Remel, Sigma)

CHROMagar Candida*

CHROMagar contiene diversos sustratos enzimáticos que están unidos a compuestos cromogénicos. Cuando enzimas específicas descomponen el sustrato, se produce color. Las colonias deben evaluarse a las 48 h. La siembra de muestras directamente aumenta un 20% el número de cultivos mixtos [7]. Puede utilizarse para identificar levaduras aisladas en otros medios no cromogénicos. Es interesante también su utilización para comprobar la pureza de las cepas en las pruebas de sensibilidad. Permite la identificación rápida de especies resistentes. Puede utilizarse en mucosas, heridas con flora mixta, hemocultivos y orinas, especialmente. Es necesario seguir con rigor las condiciones establecidas por el fabricante. Incubar a 35 °C, en cámara húmeda y en oscuridad, 48 a 72 h (no <48 h). Recientemente se ha modificado para evitar productos de países con encefalopatía espongiforme [8].

Composición

Peptona	10 g
Glucosa	20 g
Agar	15 g
Cloranfenicol	500 mg
Mezcla cromogénica	2 g
Agua desionizada	1.000 ml

Preparación

Generalmente se suministra preparado.

Si se prepara a partir del polvo deshidratado: disolver en agua caliente, sin hervir. No esterilizar mediante calor (los cromógenos se desnaturalizan).

Control de calidad

Aspecto: Ámbar claro.

Candida albicans: Crece con color característico (colonia verde esmeralda).

Candida krusei: Crece con color y aspecto característicos (colonia rosa y rugosa).

Escherichia coli: Inhibición.

(*) Disponible comercialmente (Becton Dickinson, Biomedics, CHROMagar). Es el medio cromogénico más utilizado, existiendo otras variantes (Capítulo 11).

Dermatophyte test medium* (DTM)

Medio utilizado para el aislamiento de dermatofitos en muestras muy contaminadas, proporcionando una identificación presuntiva. Los dermatofitos producen alcalinización, virando el medio de amarillo a rojo, algunas bacterias y hongos también pueden producir alcalinización. El pigmento característico de algunos dermatofitos no se puede identificar. La cicloheximida inhibe muchos de los hongos saprofitos.

Composición

Peptona	10 g
Glucosa	10 g
Agar	20 g
Solución de rojo fenol	40 ml
CIH 0,8 M	6 ml
Cicloheximida	0,5 g
Sulfato de gentamicina	100 µg/ml
Clortetraciclina	100 µg/ml

Preparación

- Mezclar la peptona, glucosa y agar en 1.000 ml de agua desionizada y hervir hasta disolver el agar.
- Añadir 40 ml de la solución de rojo fenol mientras se remueve (Solución de rojo fenol: 0,5 g de Bacto-Phenol red disolver en 15 ml de NaOH 0,1 N; completar hasta 100 ml con agua desionizada).
- Ajustar el pH añadiendo 6 ml de CIH 0,8 M mientras se remueve.
- Disolver 0,5 g de cicloheximida en 2 ml de acetona y añadir al medio caliente mientras se remueve.
- Disolver el sulfato de gentamicina en 2 ml de agua, añadir al medio mientras se remueve.
- Esterilizar a 121 °C. Enfriar hasta unos 47 °C.
- Disolver la clortetraciclina en 25 ml de agua desionizada estéril. Añadir al medio mientras se agita.
- Dispensar en placas o en tubos.

Control de calidad

Aspecto: Agar amarillo naranja, transparente.

Trichophyton verrucosum: Crece y alcaliniza.

Aspergillus flavus: Inhibición parcial o completa.

Staphylococcus epidermidis: Inhibición parcial o completa.

(*) Disponible comercialmente (Becton Dickinson, Fluka, Merck, Remel)

Medio de arroz

Se utiliza para la diferenciación de cepas atípicas de *Microsporum audouinii* y *Microsporum canis*.

Composición

Arroz blanco no enriquecido	8 g
Agua desionizada	25 ml

Preparación

- Mezclar los ingredientes en un matraz Erlenmeyer.
- Esterilizar a 121 °C durante 15 min.

Control de calidad

Aspecto: granos de arroz cocido.

M. canis: presenta buen crecimiento, pigmento amarillo y esporulación abundante.

M. audouinii: no presenta crecimiento o es escaso, coloración marronácea.

Con asa micológica, transferir una pequeña porción del aislamiento al matraz con los granos estériles.

A continuación se detallan las principales indicaciones, composición, forma de preparación y los controles de calidad de los medios de cultivo más utilizados en el laboratorio de Micología clínica. Los medios comerciales pueden presentar pequeñas variaciones respecto a lo expuesto en los cuadros.

3.4.7. Incubación

La temperatura óptima de crecimiento de la mayoría de los hongos patógenos es 30 °C. Sin embargo, *Sporothrix schenckii* es una excepción, crece más rápido a 27-28 °C.

Hay laboratorios que utilizan la temperatura ambiente en lugar de 30 °C, pero no es recomendable, ya que en los cambios de temperatura son notables entre el día y de la noche en la mayoría de los laboratorios. La temperatura de 37 °C no se recomienda por dos razones principales: 1) muchas muestras contienen abundantes bacterias que crecen muy bien a esta temperatura y 2) algunos hongos crecen mal a esta temperatura o no crecen, especialmente los hongos que infectan la piel [9].

No hay ventaja en incubar simultáneamente a 30 °C y a 37 °C. La temperatura de 37 °C debe reservarse para hongos dimórficos o algún hongo que se desarrolle mejor a esta temperatura [10]. Una estufa a 37 °C es también necesaria para verificar la tolerancia a esta temperatura. Sin embargo, utilizar 37 °C para el aislamiento del estadio levaduriforme de *Histoplasma* o *Blastomyces* no aporta ventajas y, además, son morfológicamente indistinguibles de otras levaduras [9].

Si la estufa no está humedecida, es conveniente poner un recipiente con agua cerca de las placas de cultivo. [10]. Los cultivos de hongos deben incubarse durante 3-4 semanas antes de ser desechados. Los cultivos no deben desecharse cuando se aísla un hongo, debe completarse el periodo de incubación [11]. Sin embargo, hay muestras que se pueden eliminar a los 7 días de forma habitual (orina y exudados de mucosas).

3.5. Informe de los resultados

El diagnóstico micológico no acaba con el aislamiento y la identificación del agente causal. Finaliza cuando la información sobre el mismo llega al conocimiento del médico responsable del paciente. Esta última etapa del procedimiento diag-

nóstico no es menos importante que las anteriores, por lo que debe cuidarse al máximo todos los detalles de la misma.

3.5.1. Observación microscópica

Debe informarse en el día ya que aporta una importante ayuda al clínico; sus pacientes pueden salir de la consulta de dermatología con un diagnóstico presuntivo (dermatofitosis), que habrá que confirmar con el cultivo, o definitivo (pitiriasis versicolor). La tinta china en buenas manos (criptococosis) y la inmunofluorescencia (pneumocistosis) también son diagnósticas. Otras observaciones positivas permiten una orientación terapéutica (mucormicosis, aspergilosis, etc.).

Este informe es fundamental en toda muestra estéril y permite saber si la muestra posee suficiente calidad.

El informe oral es muy importante para la correcta valoración de la muestra y contrastar la eficiencia del laboratorio, además de adecuar la relación con el clínico. Todo informe oral debe seguirse de otro escrito, reflejando que existe un informe oral previo.

3.5.2. Cultivo

El cultivo negativo se informa, generalmente, a las cuatro semanas de incubación, con las excepciones citadas en el tiempo de lectura. La prolongación de la incubación después de tres semanas aporta poca información adicional y, dependiendo del sistema de lectura, puede suponer una sobrecarga de trabajo que hay que valorar adecuadamente en cada laboratorio [12].

Los cultivos positivos se informan, de la misma manera que la observación microscópica, en el momento en el que se disponga del crecimiento. En los casos en los que hay que realizar aislamientos repetidos (uñas), al cuestionarse el significado del hongo aislado, se informará de la misma manera. En ambos casos, hay que valorar el beneficio para el paciente y el esfuerzo en la localización del clínico responsable, por lo que la utilización del correo electrónico para este tipo de informes, ayuda sensiblemente al establecimiento de una rápida y fluida comunicación entre el micólogo y el clínico.

En todo informe escrito debe figurar si se trata de un informe provisional o definitivo. Para los aislamientos realizados en Bacteriología y remitidos a Micología, debe establecerse un mecanismo que garantice la correcta llegada del resultado al mé-

co:

1. Si la numeración del laboratorio es única, se realizarán informes provisionales en los que se refleje la transferencia de la cepa.
2. Si la numeración es diferente, en el registro de Micología figurará que es una cepa recibida de Bacteriología y su número original.

En el informe debe figurar el resultado definitivo. En el caso de ser positivo, debe incluir la identificación de la especie aislada y el estudio de sensibilidad, si procede.

Cuando el significado es de dudosa interpretación debe hacerse constar.

Por sus especiales características, en este tipo de informes se deben seguir unas recomendaciones especiales:

1. Cuando no sea posible contactar con el facultativo solicitante, se intentará hablar con el responsable o el jefe de servicio. No se dará nunca el informe a una persona no cualificada.
2. Deben facilitarse siempre los datos que garantizan que el informe corresponde al paciente sobre el que se nos pregunta:
 - Nombre del paciente
 - Localización (habitación, centro de salud, etc.)
 - Tipo de cultivo
 - Fecha de recogida de la muestra
 - Resultados
3. En el registro del laboratorio debe anotarse:
 - Día y hora de la llamada
 - Nombre del médico que recibe la información

3.5.3. Informe telefónico

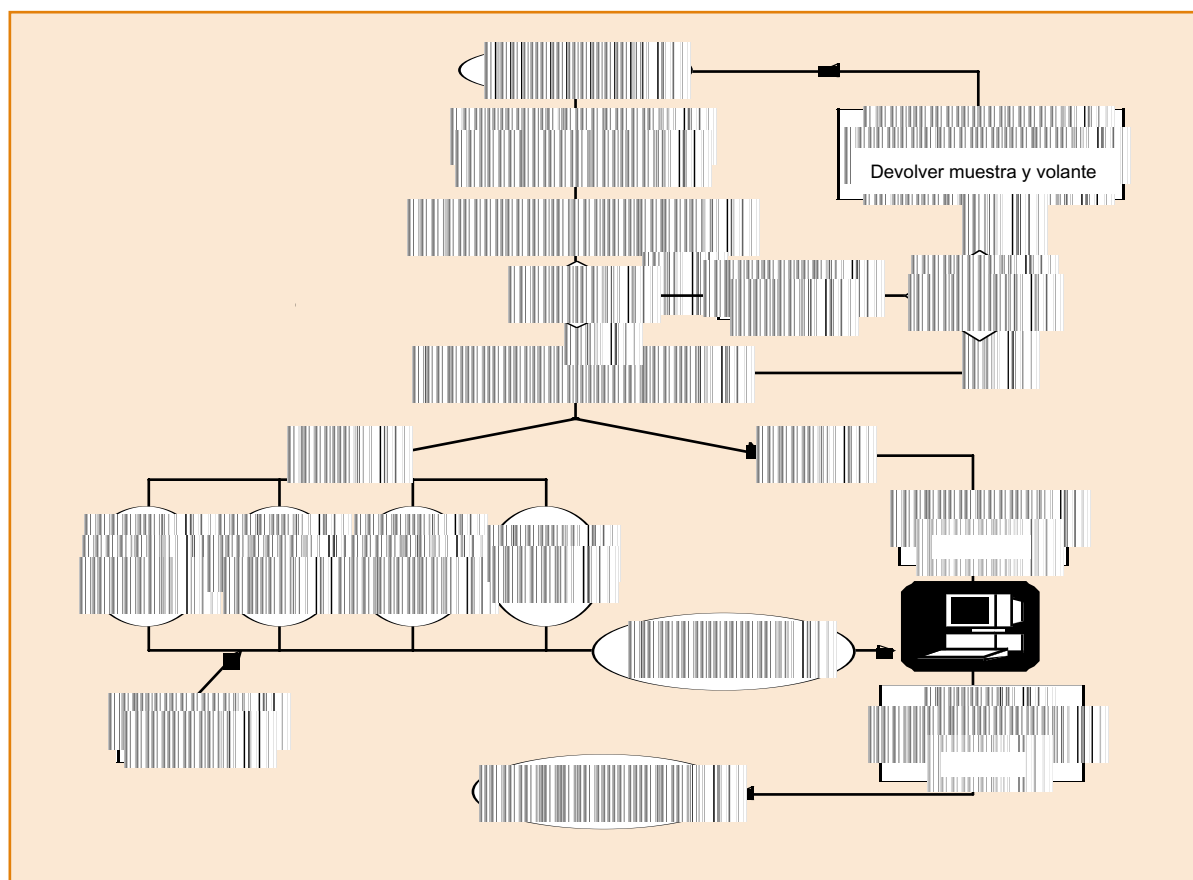


Figura 3.1. Modelo de gestión de la información en un laboratorio de Micología Clínica.

Referencias

1. Land CA, Stringfellow J, Flores M. Collection and transport of specimens. En: Isenberg HD (Ed.) Clinical microbiology procedures handbook. Washington DC, American Society for Microbiology, 1992.
2. Hazen KC. Mycology and aerobic Actinomycetes. En: Isenberg HD (Ed.) Essential procedures for clinical Microbiology. Washington, American Society for Microbiology, 1998: 255-357.
3. National Committee for Clinical Laboratory Standard. QC assurance for commercially prepared microbiological culture media. Approved Standard. M22-A. Villanove, Pa, National Committee for Clinical Laboratory Standard, 1990.
4. De Hoog GS, Guarro J, Figueras MJ, Gené J. Atlas of clinical fungi (2nd ed.). Baarn / Reus, Centraalbureau voor Schimmelmcultures / Universitat Rovira i Virgili, 2000.
5. Aspiroz C, Rezusta A, Rubio MC, Gómez-Lus R. *Malassezia pachydermatis* failure to grow on a commercial Sabouraud medium with gentamycin. 14th ISHAM World Congress, Buenos Aires, Argentina 2000.
6. Staib F, Arasteh K. Chlamydospore formation on Staib agar. Observations made before *Candida dubliniensis* was described. Mycoses 2001; 44: 23-27
7. Pfaller MA, Houston A, Coffmann S. Application of CHROMagar Candida for rapid screening of clinical specimens for *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei* and *Candida (Torulopsis) glabrata*. J Clin Microbiol 1995; 34: 59-61.
8. Jabra-Rizk MA, Brenner TM, Romagnoli M, et al. Evaluation of a reformulated CHROMagar Candida. J Clin Microbiol 2001; 39: 2015-2016.
9. Kwon-Chung KJ, Bennett JE. Medical Mycology. Philadelphia, Lea & Febiger, 1992.
10. Larone D. Medically important fungi. A guide to identification. Washington DC, American Society for Microbiology 1995.
11. Passarell L. 1999 Use and publishing guideline. URL: <http://fungus.utmb.edu>
12. Labarca JA, Wagar EA, Grasmick AE, Kokkinos HM, Bruckner DA. Critical evaluation of 4-week incubation for fungal cultures: Is the fourth week useful? J Clin Microbiol 1998; 36: 3683-3685.

Bibliografía complementaria

- Al-Doory Y. Laboratory Medical Mycology. Philadelphia, Lea y Febiger, 1980.
- Smith E, Rogers AL. Medical mycology and human mycoses. Belmont California, Star Publishing Co., 1996.
- Goodman NL, Roberts GD. Laboratory diagnosis. In: Ajello L, Hay RJ (Volume 4 Eds.) Medical Mycology. In: Collier L, Balows A, Sussman M (Eds.) Topley & Wilson's. Microbiology and Microbial Infections. 9th ed. London, Arnold, 1998: 75-87.
- Merz WG, Roberts GD. Algorithms for detection and identification of fungi. En Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, Tenover RH (Eds.) Manual of Clinical Microbiology. Washington DC, American Society for Microbiology, 1999: 1167-1183.
- Chapin KC, Murray PR. En Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH (Eds.) Manual of Clinical Microbiology. Washington DC, American Society for Microbiology 1999: 1701-1704.
- St-Germain G, Summerbell R. Identifying filamentous fungi. A clinical handbook. Belmont, California, Star Publishing Co., 1996.
- Kwon-Chung KJ, Bennett JE. Medical Mycology. Philadelphia, Lea & Febiger, 1992.
- Koneman EW, Roberts GD. Micología práctica de laboratorio. 3^a ed. Buenos Aires, Panamericana 1987.
- Kane J, Summerbell RC. *Trichophyton*, *Microsporum*, *Epidermophyton*, and agents of superficial mycoses. En: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH (Eds.) Manual of Clinical Microbiology. Washington, American Society for Microbiology 1999: 1275-1294.
- McGinnis MR. Laboratory Handbook of Medical Mycology. New York, Academic Press, 1980.

M^a Soledad Cuétara

4.1. Introducción

En los últimos años, se ha observado una tendencia creciente, por parte de los micólogos, a separar las infecciones de la piel, pelos y uñas en dos grupos (Tabla 4.1): micosis superficiales (incluyen aquellas enfermedades que generalmente no producen una respuesta inflamatoria en el huésped) y micosis cutáneas (donde el hongo se confina al estrato córneo y produce cambios inflamatorios); sin embargo, en sentido estricto, esta clasificación es artificial ya que las micosis profundas oportunistas, las subcutáneas y las causadas por hongos dimórfi-

la respuesta inmune específica por técnicas histológicas.

El laboratorio, al realizar el diagnóstico etiológico, puede confirmar la sospecha clínica de micosis, permitiendo la elección del tratamiento específico y la valoración del mismo. Para facilitar la labor al micólogo y enfocar el diagnóstico convenientemente, es muy importante que el laboratorio reciba las muestras bien identificadas y los datos de interés clínico (comienzo y evolución de la enfermedad, tratamientos administrados) y epidemiológico (viajes, residencias en el extranjero, contactos con animales, trabajo, etc.) convenientemente cumplimentados [1].

Para el correcto aislamiento del agente etiológico se requiere:

- Una adecuada toma de muestra
- Rápido transporte al laboratorio
- Pronto y correcto procesamiento
- Inoculación en medios de cultivo adecuados
- Incubación a temperatura óptima

4.2.1. Toma de muestras de micosis superficiales

Los resultados de laboratorio dependen de la toma de muestra, la cual debe hacerse antes de instituido el tratamiento o cuando éste se ha suspendido previamente (1-2 semanas, para piel o pelo; varios meses, para las uñas). Las micosis superficiales estudiadas en este capítulo se limitan a la piel, el pelo y las uñas. Otros procesos que afectan a las capas más superficiales de la piel son producidos por bacterias y no forman parte de esta Guía; sin embargo, el eritrasma (producido por *Corynebacterium minutissimum*) se ha estudiado clásicamente dentro de la Micología Médica y requiere habitualmente un diagnóstico diferencial con las micosis superficiales (págs. 4-2 y 4-6).

Para la adecuada toma de muestra de las micosis superficiales se recomienda seguir las siguientes recomendaciones: examen con luz de Wood, limpieza del área afectada y recogida de la muestra.

Examen con luz de Wood

cos también pueden tener manifestaciones cutáneas.

4.2. Diagnóstico de laboratorio de las micosis superficiales

Ante la sospecha clínica de una micosis superficial (Capítulo 2), el clínico tiene que confirmar la infección recurriendo a una serie de procedimientos de laboratorio que incluyen la detección del organismo en el tejido (por examen directo o estudio histológico), el aislamiento del patógeno en el cultivo y, excepcionalmente, el reconocimiento de

Tabla 4.1. Clasificación de las micosis que afectan a la piel y sus anejos.

Micosis superficiales:

- Pitiriasis versicolor (*Malassezia* spp.)
- Piedra blanca (*Trichosporon* spp.)
- Piedra negra (*Piedraia hortae*)
- Tinea nigra (*Phaeoannelomyces werneckii*)

Micosis cutáneas:

- Candidiasis y micosis por otras levaduras (*Geotrichum* spp., *Hansenula* spp.)
- Dermatofitosis (*Epidermophyton* spp., *Trichophyton* spp. y *Microsporum* spp.)
- DermatOMICOSIS (*Penicillium* spp., *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., etc.)

Antes de realizar la toma de muestras de una micosis superficial es aconsejable examinar las lesiones de la piel (sospechosas de pitiriasis versicolor o eritrasma) y cuero cabelludo (dermatofitosis) en una habitación completamente oscura bajo la luz de Wood (luz ultravioleta de 365 nm de longitud de onda, que pasa a través de un filtro de cristal que contiene óxido de níquel). La piel normal muestra un color azul, mientras que en infecciones bacterianas como el eritrasma, emite fluorescencia rojo coral.

En micosis como la pitiriasis versicolor, las áreas afectas emiten una fluorescencia brillante verdosa amarillenta (pudiendo poner de manifiesto lesiones no perceptibles a simple vista). En *tinea capitis* debidas a *Microsporum* spp. o *Trichophyton schoenleinii*, las lesiones muestran una fluorescencia característica.

El descubrimiento de Margarot y Devezé, en 1925, de que pelos infectados por ciertos dermatofitos producían una fluorescencia característica bajo la luz ultravioleta de la lámpara de Wood fue un importante avance en la Micología Médica. La naturaleza y fuente de las sustancias fluorescentes en los pelos infectados no son del todo conocidas y la sugerencia de que era una pteridina ha sido cuestionada. El pelo permanece fluorescente después de que el hongo deje de ser viable, y el material fluorescente puede ser extraído del pelo en agua caliente o solución fría de bromuro de sodio. Debido a que el crecimiento del hongo, en el medio de cultivo o de forma *in vitro* en el pelo, no origina fluorescencia, esta se atribuye a alguna sustancia producida por la interacción entre el crecimiento del hongo y del pelo. Solamente algunos dermatofitos capaces de invadir el pelo producen fluorescencia:

- *M. canis* y *M. audouinii*, siempre producen fluorescencia verde; sin embargo, *M. gypseum* y *M. nanum*, lo hacen ocasionalmente.
- *T. schoenleinii*, causa una fluorescencia verde pálida.

En áreas geográficas donde *Microsporum* spp. y el favus son prevalentes, la luz Wood es una herramienta esencial tanto en el diagnóstico y el tratamiento del enfermo, como en el control de epide-

mias. Además, la lámpara es fácilmente transportable y puede ser usada en instituciones para el rápido examen de los contactos.

Limpieza del área afectada

Antes de realizar la recogida de la muestra, la piel, pelos o uñas afectados deben limpiarse con etanol (70%) para eliminar la flora bacteriana, exudación o restos de excipientes de tratamientos previos que dificultan el examen directo y el cultivo.

Recolección del material

Escamas

En las lesiones descamativas, deben recogerse las escamas de las zonas afectas con fluorescencia positiva (pitiriasis versicolor o eritrasma) o con fluorescencia negativa (candidiasis y dermatofitosis), raspando su borde activo con un **escalpelo** desechable, ya que dicho borde es el que más probablemente contenga elementos fúngicos viables. Cuando existen lesiones satélites (candidiasis), el raspado se realiza de dichas lesiones por ser las más jóvenes.

El material obtenido se recoge en un sobre o placa de Petri (debidamente precintada), con el fin de mantenerlo seco y libre de contaminación. El uso de contenedores de plástico puede tener el inconveniente de que las escamas se adhieran a sus paredes dificultando su recuperación; mientras que el uso de portaobjetos de cristal, tiene el riesgo de pérdida de material por ruptura del vidrio en el transporte. Los dermatofitos en los raspados de la piel pueden permanecer viables durante meses.

En la pitiriasis versicolor parcialmente tratada, la descamación es escasa, por lo que se recomienda hacer la toma con la técnica del **papel cello**, para ello se aplica la zona adherente de la cinta sobre la piel a estudiar, presionando enérgicamente, se despega y se coloca sobre un portaobjetos.

En intertrigos candidiásicos, las lesiones no suelen ser descamativas sino exudativas, en cuyo caso no se debe raspar porque resultaría una técnica cruenta, sino que el material se recoge con **torunda estéril** con/sin humedad. Si el espécimen no va a ser procesado inmediatamente, se prefiere el empleo de torunda con un medio de transporte (como el de Stuart) ya que las levaduras pierden rápidamente la viabilidad en los hisopos secos. Pero hay que tener presente que el retraso en el procesamiento de estas torundas permite la multiplicación de las bacterias en la muestra y que, además, el medio de transporte la diluye, dificultando la observación directa.

Existe una técnica complementaria o alterna-

Un consejo...

La fuente más común de errores en el examen con luz de Wood es una habitación insuficientemente oscura o la existencia de sustancias químicas capaces de emitir fluorescencia (cosméticos, productos terapéuticos, etc.).

tiva para la recogida de las escamas en las micosis cutáneas (candidiasis y dermatofitosis): el método del cuadrado de **moqueta** de Mariat y Adan-Campos [2]. Consiste en frotar 5 veces con un cuadrado de alfombra de lana estéril la totalidad de la superficie a examinar (piel glabra o cuero cabelludo) (Figura 4.1); posteriormente, la moqueta se guarda en un sobre de papel o en una caja de Petri y se envía al laboratorio de Micología para su procesamiento. Este procedimiento tiene varias ventajas: i) no es cruento para el paciente, ii) es útil para realizar tomas de *tinea capitis* con fluorescencia negativa, iii) permite estudiar a portadores asintomáticos de dermatofitos o pacientes ya tratados, cuando la lesión clínica ha desaparecido, iv) facilita los estudios epidemiológicos de tiña y v) permite estudiar animales (gatos, perros, etc.) que pueden ser reservorio de dermatofitos. Sin embargo, tiene el inconveniente de que con esta técnica no se puede realizar la observación directa, solamente el cultivo.

Pelos

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

- En la Piedra blanca o la Piedra negra, ambas confinadas a la vaina del pelo, se debe cortar la porción suprafolicular de los pelos enfermos.
- En las tiñas del cuero cabelludo o de la barba, es importante recoger los pelos parasitados arrancándolos con la raíz intacta, ya que cortar los pelos es menos eficaz. En muchas ocasiones, los pelos parasitados se reconocen porque tienen una fluorescencia positiva con luz de Wood, están deslustrados, rotos, friables o se desprenden fácilmente con el raspado.

Las tiñas microspóricas (*M. canis* y *M. audouinii*) se reconocen por presentar una placa escamosa blanquecina con escasa o nula inflamación, que puede alcanzar varios centímetros de diámetro, y en la cual se observan pelos rotos a 5-10 mm de la superficie cutánea, estos pelos parasitados son friables y se arrancan con facilidad al raspar con el escalpelo (Figura 4.2).

Las tiñas tricofíticas antropofílicas (*Trichophyton tonsurans* y *T. violaceum*), forman pequeñas placas escamosas con pelos de poca longitud, en forma de W o Z, situados en el espesor de la escama o bien rotos al nivel de la superficie dando un aspecto de “puntos negros”, casi siempre en ausencia de inflamación. Estos “puntos negros” son los que deben extraerse con la punta del escalpelo o mediante pinzas. Sin embargo, cuando la infección se debe a especies zoofílicas (*T. mentagrophytes* var. *mentagrophytes* y *T. verrucosum*) se observan placas escamosas de tamaño variable, que se infla-

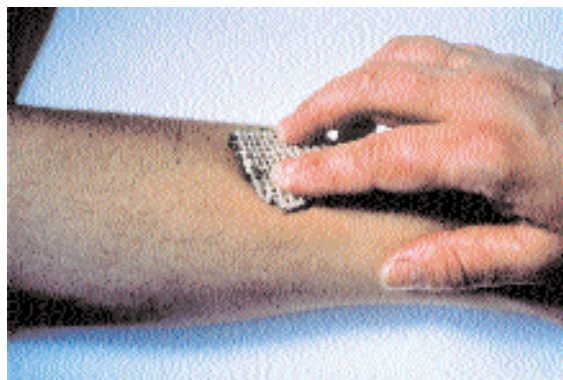


Figura 4.1. Toma de lesión en piel glabra con moqueta.



Figura 4.2. Paciente con lesiones de *tinea capitis* por *M. canis*.

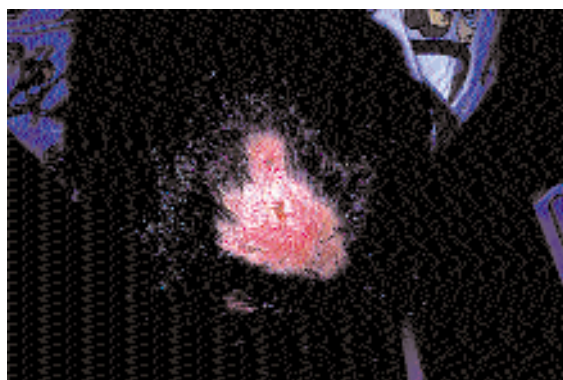


Figura 4.3. Paciente con lesiones de *tinea capitis* por *T. mentagrophytes* var. *mentagrophytes*.

man y se elevan sobre la superficie cutánea, apareciendo numerosas pústulas foliculares que originan un Kerion (Figura 4.3). Los pelos situados en la placa tienen una longitud variable pudiéndose extraer con facilidad sin causar dolor al paciente.

La tiña favosa (*T. schoenleinii*) presenta costuras amarillentas, cóncavas y centradas por un pelo, denominadas escútlulas o cazoletas fávicas. Están

formadas por un conglomerado de hifas que originan una foliculitis y, con el tiempo, alopecia cicatricial por destrucción de la matriz. La muestra de estas lesiones debe ser tomada con asa (el pus foliular) y cucharilla (las cazoletas).

Algunos autores recomiendan que en lesiones de *tiña tricoftica*, en las cuales se encuentran mezclados pelos sanos y enfermos, es útil cortar 20 a 30 pelos a una altura de 1 cm (en un área de 4-5 cm de diámetro) y, posteriormente, depositarlos en un portaobjetos, previamente calentado o en una placa de Petri, destinando una parte del mismo al examen directo y otra al cultivo.

En la *tinea capitis*, además, se pueden realizar tomas con la moqueta de Mariat y Adan-Campos y con un cepillo de plástico estéril de diámetro inferior a la placa de Petri donde se va a sembrar (Figura 4.4). Este método de cultivo es extremadamente sensible y de gran valor para estudios epidemiológicos de contactos de niños infectados y de animales domésticos sospechosos. Consiste

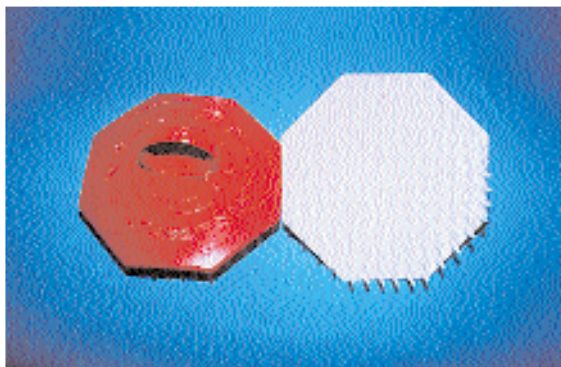


Figura 4.4. Cepillo de plástico empleado en la toma de muestras de cuero cabelludo.

uñas hiperqueratósicas por lo que los alicates son esenciales para recoger el material subungueal y cortar trozos de la parte más proximal de la uña, ya que aunque sea la menos accesible, es la que menos se contamina y presenta los elementos fúngicos más jóvenes y viables [6].

Onicomicosis proximal subungueal: causada por *Candida* spp. o por recidivas de una *tinea unguium* tratada. Se observa, de forma característica, en pacientes con sida. En estos casos, se debe recoger el material blanquecino de la porción más profunda de la tabla ungueal.

Onicomicosis blanca superficial: se manifiesta como una mancha blanca lechosa en un punto cualquiera de la superficie de la uña que se va extendiendo progresivamente. Es debida a dermatofitos (*T. mentagrophytes*, *T. rubrum*) u otros hongos miceliares (*Acremonium* spp., *Fusarium* spp., *Aspergillus* spp.). Para recoger la muestra, se raspa con el escalpelo la superficie afectada.

Onicolisis distal y lateral con paroniquia crónica: comienza con una inflamación del borde periungueal y termina con la afectación lateral de la lámina ungueal que aparece plisada. Aunque casi siempre está causada por *Candida* spp., en ocasiones excepcionales algún moho no dermatofito también puede ser el responsable. En estos casos, se recoge el material ungueal más cercano a la cutícula, raspando con el bisturí en la profundidad del surco periungueal. Con torunda o asa estéril, se

Un consejo...

En lesiones dolorosas e inflamatorias, como el Kerion, o en niños sensibles, puede ser difícil la toma de muestras. En estos casos, el uso de una torunda humedecida sobre la zona afectada puede ser el único medio incruento de realizar la toma. Con esta técnica es posible obtener cultivos positivos, pero resultados negativos no excluyen la infección.

en cepillar enérgicamente 10 veces el cuero cabelludo y posteriormente implantar las púas del cepillo sobre la superficie del agar (técnica descrita por MacKenzie [3] y usada por Clayton y Midgley [4,5]). Antes de reutilizar estos cepillos deben esterilizarse con óxido de etileno.

Uñas

En las onicomicosis, la toma de muestras varía en función del tipo de lesión clínica:

Onicomicosis distal y lateral subungueal o uña en “médula de junco”: la lesión comienza en el borde libre de la uña y va extendiéndose hacia la matriz, la sustancia de la uña se sustituye por un material amarillento y friable, mientras que la lámina exterior puede estar infectada o destruida. Esta lesión es debida a dermatofitos, *Scopulariopsis* spp. o *Scytalidium dimidiatum*. En estos casos, aparecen

Un consejo...

En la *tinea unguium* y en la onicomicosis por *Scytalidium* spp., la piel adyacente suele estar afectada, por lo que, en estos casos, también es recomendable procesar muestras cutáneas ya que su cultivo es más sensible que el procedente de las uñas.

obtiene el pus de la paroniquia acompañante tras incisión con lanceta o compresión de la porción lateral del dedo.

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

4.2.2. Transporte de la muestra superficial

Las muestras superficiales de pitiriasis versicolor y dermatofitosis deben ser transportadas en un contenedor seco; sin embargo, si se sospecha la presencia de *Candida* spp. y se demorase su procesamiento, se debe emplear un medio de transporte como el de Stuart, para preservar su viabilidad. Las distintas opciones de transporte, ya han sido comentadas en el Capítulo 3 en función de la lesión clínica, agente etiológico y posibilidades de recolección.

El almacenaje de muestras dermatológicas se debe realizar a temperatura ambiente.

4.2.3. Procesamiento de las muestras superficiales

Los pelos y escamas pueden procesarse directamente y ser examinados al microscopio o sembrados en los medios de cultivos sin más preparación. Sin embargo, las uñas deben homogenizarse previamente para aumentar la superficie de contacto del espécimen con el medio de cultivo y posibilitar el aislamiento del agente causal; para ello se fragmentan con alicates en piezas de 1 mm, en condiciones asépticas.

4.2.4. Examen microscópico directo en las micosis superficiales

El examen microscópico directo permite un diagnóstico presuntivo rápido de las micosis superficiales y, con ello, la instauración de un tratamiento precoz sin tener que esperar al crecimiento de los cultivos (Capítulo 14). Habitualmente, el examen directo se efectúa en fresco, utilizando sustancias que favorecen la disgregación de la queratina y aclaran la preparación. Además, estas sustancias facilitan la visualización de las estructuras fúngicas (micelios, esporos o levaduras) por su alto índice de refracción.

El examen microscópico con hidróxido potásico (KOH), utilizado clásicamente, puede mejorarse añadiendo ciertas sustancias:

- Dimetil sulfóxido (DMSO). Se prepara añadiendo, en el mismo orden, 20 g de KOH, 40 ml de DMSO y 60 ml de agua destilada. La muestra se examina en un porta con unas gotas de este líquido, calentando ligeramente en la llama para acelerar la digestión (aunque esto último no es estrictamente necesario).

Un consejo...

La adición de DMSO permite el examen directo inmediato sin que sea necesario el calentamiento. Evita la ruptura de portas, cristalizaciones, aparición de artefactos y permite el examen microscópico pasadas 24 ó 48 h, siempre que se conserve la preparación en una cámara húmeda.

- Lactofenol de Amman, con o sin azul algodón. Solución de lactofenol de Amman: fenol, 20 g; ácido láctico, 20 ml; glicerina, 40 ml; agua destilada, 20 ml. Mezclar el ácido láctico y la glicerina con el agua destilada y, seguidamente, añadir el fenol bajo agitación y calentamiento hasta su disolución. Se puede agregar 2 ml de azul algodón al 1%.
- Azul de metileno. Azul de metileno 1 g y 250 ml de agua destilada.
- Glicerina.

Existen colorantes que tiñen de azul las levaduras lipofílicas como:

- **Colorante de Cohen.** Hidróxido potásico al 30% con tinta Quink (Parker) azul negra, a partes iguales.
- **Colorante de Kane:** Glicerol, 10 ml; Tween 80, 10 ml; fenol, 2,5 g; azul de metileno, 1 g y agua destilada, 480 ml.

El blanco de calcoflúor (Capítulo 14) tiñe específicamente los polisacáridos de la pared de los hongos proporcionando imágenes excelentes. Según estudios comparativos es más sensible que la microscopía óptica clásica en fresco con KOH, pero exige el uso de un microscopio de fluorescencia.

Para valorar el examen directo en una micosis superficial, se requiere la suficiente experiencia como para no confundir la presencia de artefactos como algodón, hilo, burbujas de aire, grasa intercelular (*mosaic fungus*) con estructuras fúngicas.

Si se necesita disponer de tinciones permanentes, debe realizarse una tinción de PAS o de plata metenamina (Capítulo 14), aunque en las micosis superficiales, tienen más valor didáctico que diagnóstico.

El tipo de examen microscópico recomendado en las micosis superficiales varía en función de la estructura afectada y la lesión observada:

Piel

En la **pitiriasis versicolor**, la observación del material (raspado o papel cello), demuestra los microorganismos en una disposición característica: una combinación de formas redondeadas (2-8 μm de diámetro) con gemación e hifas cortas (de 2-5 μm de ancho por 25 μm de largo). Su visualización se facilita con el Colorante de Cohen (Figura 4.5), ya que las formas fúngicas del género *Malassezia* se tiñen inmediatamente de azul, mientras que *Candida* spp. y los dermatofitos, se tiñen pasadas unas horas. La tinción con Cohen del pus obtenido en foliculitis por *Malassezia* spp. revela únicamente estructuras levaduriformes.

El colorante de Kane tiñe intensamente de azul las levaduras lipofílicas, *Dermatophilus* spp., y, lo que es más importante, *Corynebacterium minutissimum*, agente causal del **eritrasma**, de modo que la visión en fresco de las escamas con este colorante, bajo inmersión, permite visualizar los bacilos teñidos de azul (Figura 4.6), proporcionando de forma inmediata el diagnóstico de eritrasma.

En la **tiña negra**, el examen directo cutáneo revela hifas septadas, ramificadas, de 5 μm de diámetro, con un característico color oscuro, marrón u oliváceo, junto con células levaduriformes elongadas.

En las **candidiasis superficiales**, la visualización de levaduras, blastosporas, pseudohifas o verdaderas hifas septadas, evidencia la existencia de levaduras, aunque la identificación de la especie requiera el cultivo. En las candidiasis sistémicas con lesiones cutáneas hematógenas el diagnóstico se realiza por estudio histológico de la biopsia cutánea.

En las **dermatofitosis** de piel lampiña, se observan filamentos miceliales artrosporados, estrechos, regulares, septados, ramificados y birrefringentes (Figura 4.7). Ocasionalmente, se visualizan en el espesor de las escamas folículos pilosos parasitados ("tiña del vello").

Pelos

En las **piestras**, el examen directo de los pelos parasitados permite establecer el diagnóstico [7]. Los nódulos de piedra negra están formados por una masa de células romboidales (parecidos a artroconidios) e hifas ramificadas unidas por una sustan-

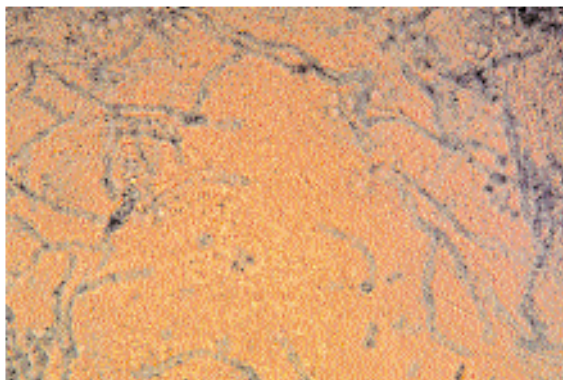


Figura 4.5. Pitiriasis versicolor: visión con microscopio óptico y tinción de Cohen de las escamas (x400).

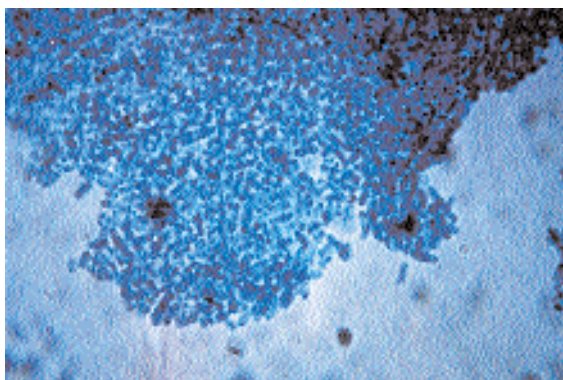


Figura 4.6. Eritrasma: visión con microscopio óptico y tinción de Kane de las escamas (x1.000).

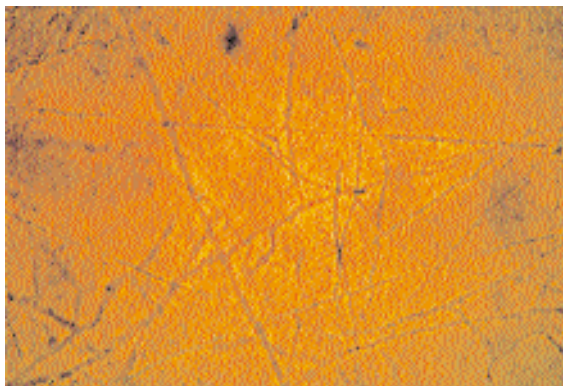


Figura 4.7. Examen de escama de piel lampiña con KOH. Se observan hifas de dermatofito.

cia cementadora. Las hifas y células tienen un diámetro de 4 a 8 μm con pigmentación regular. La sección del nódulo pone de manifiesto la existencia de ascas en cuyo interior existen ocho elementos fusiformes, curvados (30 x 10 μm) con un filamento espiral terminal. En la piedra blanca, *Trichosporon*

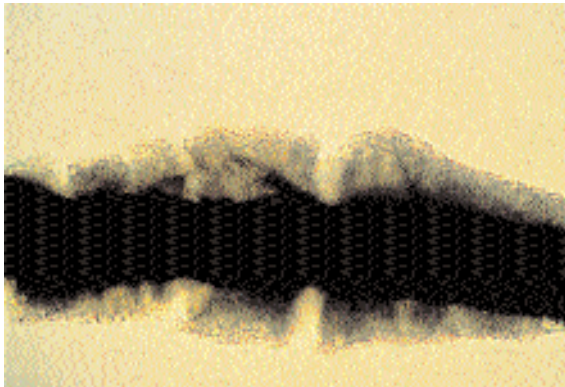


Figura 4.8. Examen de pelo con KOH. Se observan nódulos de piedra blanca.

- **Tiñas macrospóricas:** Las esporas presentan un tamaño superior a 10 μm de diámetro (*T. verrucosum*, *T. mentagrophytes* var *mentagrophytes*, *T. mentagrophytes* var *erinacei*, *T. megninii* o *T. rubrum* -rara vez-).
- **Endotrix** (cuando el dermatofito se encuentra situado en el interior del pelo formando artroconidias con diámetro superior a 8 μm). Son debidas a otras especies de *Trichophyton*: *T. tonsurans*, *T. soudanense*, *T. violaceum*, *T. yaoundei*, *T. gourvilii* o *T. rubrum* (rara vez).

Uñas

El examen directo de las uñas suele realizar-

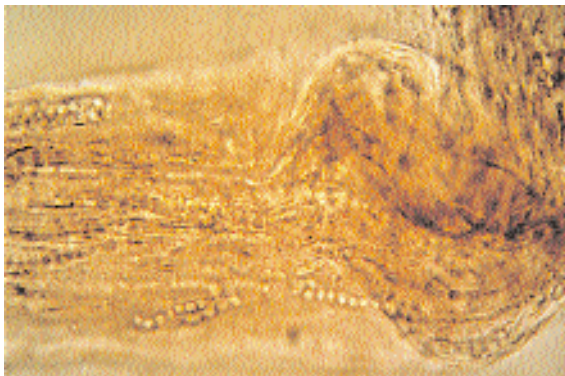


Figura 4.9. Examen del pelo con KOH. Se observan artrosporas compatibles con dermatofito.

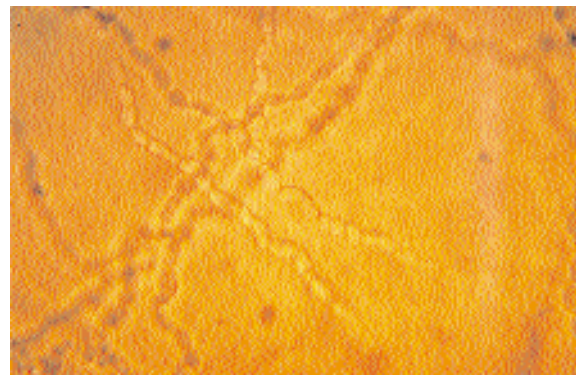


Figura 4.10. Examen de material ungueal con KOH. Se observa micelio artrosporado típico de dermatofito.

spp. se tiñe rápidamente con tinta Parker; los elementos fúngicos (hifas con artrosporos y algunos blastoconidios, de 2 a 4 μm de diámetro) se disponen perpendicularmente a la superficie del pelo y carecen de estructura organizada típica de la piedra negra (Figura 4.8).

En la **tiña capitis** el examen microscópico del pelo (Figura 4.9) permite de forma rápida establecer el diagnóstico de tiña y en muchos casos sospechar el agente causal en función del tipo de invasión fúngica:

- **Ectotrix** (el pelo está envuelto por una vaina externa de esporas):
- **Tiñas microspóricas:** Pueden visualizarse pequeñas artroconidias de 2-3 μm de diámetro (*M. audouinii*, *M. audouinii* var *rivalieri*, *M. canis*, *M. canis* var. *distortum*, *M. equinum* o *M. ferrugineum*) o esporas de 5-8 μm de diámetro (*M. gypseum*, *M. fulvum*, *M. nanum* y *M. vanreuselii*).

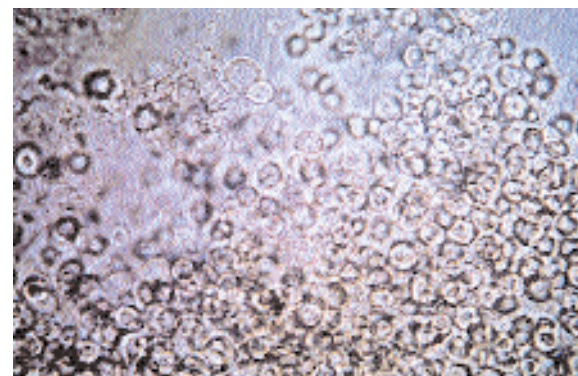


Figura 4.11. Examen de material ungueal con KOH. Se observan abundantes conidios de *Scopulariopsis* spp.

Tabla 4.2. Morfología habitual de los diferentes agentes causales de micosis superficiales en visión microscópica directa.

Agente etiológico	L	HE	ART	FR+	HI	CEG	FR++	HH
Levaduras	+	-	-	-	-	-	-	-
Dermatofito	-	+	+	+	-	-	-	-
Scopulariopsis spp.	-	-	-	-	+	+	-	-
Aspergillus spp.	-	-	-	+	+	-	+	-
Fusarium spp.	-	+	-	+	+	+	+	+
Scytalidium spp.	-	+	-	+	+	-	-	-

L: levaduras con/sin pseudomicelios; HE: hifas septadas y estrechas; HI: hifas irregulares; HH: hifas hinchadas; ART: artroconidias; FR+: frondas ligeras o moderadas; FR++: frondas abundantes; CEG: conidios específicos de género.

se en fresco con KOH y DMSO o con calcoflúor. Es un procedimiento rápido, ofrece resultados positivos superiores al cultivo en micosis ungueal y, en manos expertas, permite diferenciar los dermatofitos (hifas y artroconidios) (Figura 4.10) de *Candida* spp. (blastosporas y/o pseudohifas), hongos miceliales como *Scopulariopsis* spp. (esporas en forma de limón con pared gruesa) (Figura 4.11), *Aspergillus* spp. y *Acremonium* spp. (hifas en forma de frondas).

Según MK Moore [8], la morfología del examen directo orientará sobre el agente etiológico y el medio de cultivo a emplear (Tabla 4.2).

4.2.5. Cultivo de las muestras superficiales

El cultivo es un procedimiento de diagnóstico lento pero específico, permitiendo establecer con certeza el diagnóstico etiológico del género y la especie causal, por lo que es de gran importancia en los estudios epidemiológicos.

Medio de cultivo

Las muestras deben ser procesadas de forma inmediata, preferentemente. Las escamas, pelos y uñas, se siembran en tubo con el medio de cultivo elegido en pico de flauta (ya que de este modo el medio resiste mejor la desecación y estas muestras requieren largos periodos de incubación). Necesariamente, el cuadrado de moqueta y el cepillo deben implantarse sobre la superficie del agar dispensado en placas de Petri, las cuales serán selladas para evitar la desecación (Figura 4.12).

El medio habitual para el aislamiento de los hongos es el agar glucosado de Sabouraud (SDA) al que pueden añadirse antibióticos como el cloranfenicol y la gentamicina, para reducir la contaminación bacteriana, o la cicloheximida (actidiona) para

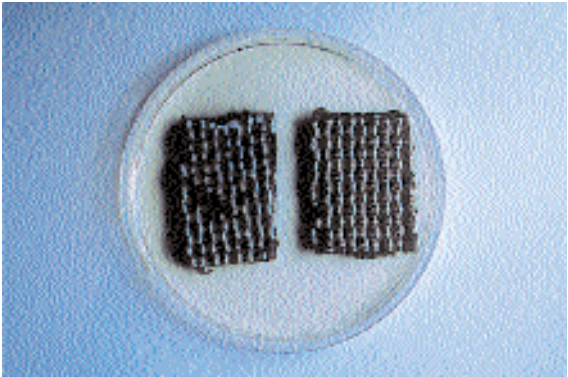


Figura 4.12. Cultivo de la muestra realizada con moqueta.

reducir el crecimiento de hongos saprofitos (Capítulo 3). Sin embargo, la actidiona no debe ser utilizada si el microorganismo que se sospecha es *Candida no albicans*, *Scopulariopsis* spp., *Acremonium* spp., *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp. o *Scytalidium* spp., ya que estos son sensibles a dicho antifúngico.

Cuando se sospechen infecciones por levadu-

Tabla 4.3. Elección del medio de cultivo y condiciones de incubación en función del presunto microorganismo causal.

Agente etiológico	Medio	Temperatura (°C)	Tiempo (días)
Dermatofito	MYC	25-30	28
Scopulariopsis spp.	SDAC	25-30	21
Acremonium spp.	SDAC	25-30	21
Fusarium spp.	SDAC	25-30	21
Aspergillus spp.	SDAC	25-30 y 37	21
Scytalidium spp.	SDAC	25-30	21

MYC: Sabouraud con cloranfenicol y actidiona (Mycobiotic / Mycosel)
SDAC: Sabouraud con cloranfenicol

ras, es recomendable añadir un medio que contenga sustrato cromogénico como el Albicans ID medio (bioMérieux) o el CHROMagar Candida (Becton Dickinson) en los que las colonias de levaduras desarrollan determinados colores en función de la especie aislada (Capítulo 3).

La elección del medio a emplear depende de la muestra y del patógeno causal y, muchas veces, estará orientada por el resultado del examen directo (Tabla 4.2). Así, en las uñas se puede emplear SDA con cloranfenicol con o sin actidiona al 0,04%; además, en uñas con fuerte contaminación bacteriana, algunos autores recomiendan añadir un tercer medio con actidiona al 0,4% para facilitar el aislamiento de los dermatofitos (Tabla 4.3).

Condiciones de incubación

Si se sospecha un dermatofito, los cultivos de micosis superficiales deben incubarse a 25-30 °C; sin embargo, *Trichophyton verrucosum* y *Candida* spp. crecen mejor a 37 °C (Tabla 4.3).

Los tiempos de incubación varían en función de la especie: mientras que los dermatofitos suelen crecer entre 7-28 días, otros hongos, como *Aspergillus* spp., *Scytalidium* spp. y las levaduras, tienen un crecimiento más rápido y pueden ser identificados en 1 semana (Tabla 4.3).

Identificación del aislamiento

Para la correcta identificación del agente etiológico de las micosis superficiales (levaduras, dermatofitos y hongos miceliares no dermatofitos), se recomienda consultar los Capítulos 11, 12 y 13 de esta Guía.

Significado del aislamiento

***Malassezia* spp.** El diagnóstico de sospecha de pitiriasis versicolor es clínico y la confirmación se realiza mediante examen microscópico directo en fresco de las escamas, o del papel cello, con colorante de Cohen o de Kane, por lo que el aislamiento en cultivo de *Malassezia* spp. no solamente es innecesario, ya que dicha levadura forma parte de la flora saprofita de la piel, sino que además resulta laborioso por requerir condiciones determinadas de humedad, temperatura y medios de cultivo ricos en ácidos grasos (Dixon o Leeming).

***Candida* spp.** Las levaduras tienen una distribución ubicua en la naturaleza pero las productoras de candidiasis en el hombre son de hábitat más restringido. En los cultivos con significado clínico

la principal especie infectante es *C. albicans*. De hecho, el 10-20% de los individuos son portadores asintomáticos de dicha levadura en el tubo digestivo y en las superficies cutaneomucosas, no así en la piel normal, donde su aislamiento resulta excepcional. Sin embargo, otras especies como *C. parapsilosis* o *C. tropicalis* forman parte de la flora saprofita habitual de la piel. En general, el estado de comensal o saprofita de *Candida* spp., se corresponde con una concentración baja de levaduras, mientras que el estado parasitario o infección se correlaciona con una concentración alta de las mismas, hallando no solo cultivos positivos (en forma masiva o confluyente cuando son semicuantitativos) sino también exámenes directos positivos [9]. Por eso es imprescindible correlacionar la observación directa y los cultivos con la situación clínica.

Dermatofitos. El aislamiento de un dermatofito en la piel, asociado a una clínica compatible con dermatofitosis y a la observación directa positiva, es diagnóstico de dermatofitosis. Existen situaciones especiales como los controles post-tratamiento de *tinea* de piel glabra curada clínicamente y los contactos familiares y escolares de niños con *tinea capitis*, en los que sin clínica acompañante y con examen directo negativo, también puede aislarse un dermatofito. Estos casos son catalogados como portadores asintomáticos; en ellos existen pocos elementos fúngicos y los cultivos semicuantitativos son ligeros (<10 UFC/placa). La evolución de estos portadores asintomáticos depende de la especie infectante: si es zoofílica como *M. canis*, la infección tiende a desaparecer en el tiempo sin necesidad de tratamiento; mientras que si corresponde a especies antropofílicas, como el *T. rubrum* o *T. mentagrophytes* var *interdigitale*, el hongo puede quedar acantonado presentando periodos de recrudescencia (portadores crónicos de *T. rubrum* en *tinea pedis*).

El aislamiento de un dermatofito en el pelo,

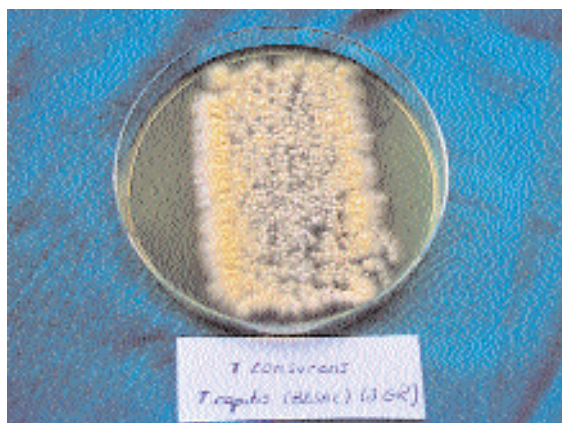


Figura 4.13. Cultivo de cepillo procedente de un paciente con *tinea capitis*.



Figura 4.14. Cultivo de cepillo procedente de un portador asintomático de dermatofito (izquierda). Ausencia de dermatofito en

con clínica y visión directa positiva, se correlaciona con un elevado número de estructuras fúngicas en la

lesión (Figura 4.13) y con el diagnóstico de *tinea capitis*. También puede existir la figura del portador asintomático de dermatofito en cuero cabelludo entre los contactos familiares y escolares de niños con *tinea capitis*, y entre los controles post-tratamiento de los niños tratados, donde existe un bajo número de elementos fúngicos con visión directa negativa y buena respuesta clínica. La evolución de estos portadores asintomáticos (Figura 4.14) también depende de la especie infectante, si es zoofílica (*M. canis* o *T. mentagrophytes* var *mentagrophytes*) el estado de portador asintomático tiende a desaparecer con el tiempo sin necesidad de tratamiento. Sin embargo, la evolución de las especies antropofílicas, como *T. tonsurans*, suele ser hacia el desarrollo o recrudescencia de la tiña.

La visualización directa, en las uñas, de micelios artrosporados es sinónima de la presencia de dermatofito en la muestra. En alrededor del 60% de los exámenes directos positivos, no se consigue aislar el dermatofito en el cultivo. Esto es debido a que las células fúngicas no son viables en la queratina ungueal, por lo que la toma de muestras se debe repetir un mínimo de 3-4 veces para aislar el dermatofito.

Los criterios para valorar el aislamiento fúngico en uñas siguen siendo los enunciados hace tres décadas por Mary P. English [10]:

- KOH (positivo) + Cultivo (dermatofito) = aislamiento significativo.

En resumen...

El diagnóstico micológico correcto en las micosis superficiales exige:

- obtención adecuada de la muestra
- transporte adecuado
- rigor en la interpretación del examen directo
- elección de medios de cultivo adecuados
- identificación de la especie fúngica
- valoración/interpretación correctas de los cultivos positivos

Referencias

1. Evans EGV, Richardson MD. Medical mycology. A practical approach. Oxford, Oxford University Press, 1989.
2. Mariat MMF, Adan-Campos C, Gentilini M, Gaxotte P. Presence of dermatophytes chez l'homme en l'absence de lésions cliniques. Soc Dermat Syphil 1976; 74: 724-729.
3. Mackenzie DWR. Hairbrush in detection and eradication of non-fluorescent scalp ringworm. Br Med J 1963; 11: 363-365.
4. Clayton YM. The changing pattern of tinea capitis in London school-children. Mykosen 1978; 1: 104-107.
5. Clayton YM, Midgley G. Scalp ringworm simplified practical diagnostic method to study spread in children. Mod Med 1971; 10: 758-762.
6. Weitzman I, Summerbell RC. The dermatophytes. Clin Microbiol Rev 1995; 8: 240-259.
7. del Palacio-Hernanz A. Piedras. En: Micología médica. Torres-Rodríguez JM, del Palacio-Hernanz A, Guarro-Artigas J, Negroni-Briz R, Pereiro-Miguens M (Eds.) Barcelona, Masson, 1993: 43-49.
8. Moore MK, Howell SA, Duncan G, Cunningham MJ, Midgley G. A comparison of bright field and fluorescent

vo.

- KOH (levadura con pseudomicelio) + Biopsia (levadura y pseudomicelio) + Cultivo (*Candida*

microscopy in onychomycosis. 6th Congress of the European Confederation of Medical Mycology Societies, Barcelona. Rev Iberoam Micol 2000; 17: S131.

9. Odds FC. Candidosis of the skin, nails and other external sites. En: *Candida* and candidosis. A review and bibliography. London, Bailliere Tindall, 1988: 136-142.
10. English MP. Nails and fungi. Br J Dermatol 1976; 94: 697-701.

Bibliografía complementaria

- Hay RJ, Moore MK. Mycology. En: Rook A, Wilkinson DS, Ebling FJG, Champion RHM, Burton JL, Burns DA (Eds.) Rook Wilkinson / Ebling. Textbook of Dermatology. 6th ed. Oxford, Blackwell Science. 1998: 1281-1376.
- Midgley G, Clayton YM, Hay RJ. Diagnoses in colour Medical mycology. London, Mosby-Wolfe, 1997.

Ferrán Sánchez Reus

5.1. Fundamento

La infección micótica pulmonar se produce por la inhalación de las esporas fúngicas y su posterior desarrollo en el parénquima pulmonar. Sólo aquellas esporas que sean capaces de alcanzar los sacos alveolares pueden germinar y atravesar su pared para dar lugar a un proceso invasor, siempre y cuando sean capaces de resistir a los mecanismos de defensa del huésped.

El tracto respiratorio funciona como una compleja red para la distribución del aire inspirado, formada por tubos que se van ramificando y disminuyendo de diámetro progresivamente hasta alcanzar los alvéolos, por lo que todo el tracto respiratorio actúa a modo de trampa atrapa-esporas, filtrando y reteniendo la gran mayoría de las partículas que acompañan a los más de 8.000 litros de aire que diariamente movilizan los pulmones. La anatomía propia del tracto respiratorio desempeña un papel muy activo en este mecanismo de defensa inespecífico. En el tracto respiratorio superior se retienen las partículas de gran tamaño ($>10\text{-}20\text{ }\mu\text{m}$), que impactan en la superficie mucosa nasofaríngea; a medida que el aire avanza por el tracto bronquial, disminuye su velocidad, lo que, junto a la reducción del diámetro de las vías aéreas y a las turbulencias que se producen en cada bifurcación bronquial, hace poco probable que las esporas puedan llegar a regiones muy distales sin mantener contacto con la pared bronquial y ser atrapadas en el sistema mucociliar. Existe una zona límite de penetración en función del diámetro de las esporas, de tal modo que sólo las esporas con un diámetro inferior a $3\text{-}4\text{ }\mu\text{m}$ pueden alcanzar los sacos alveolares y depositarse por sedimentación (Figura 5.1).

Al igual que ocurre en otros procesos fúngicos, las micosis pulmonares invasoras pueden clasificarse en dos grandes grupos: las causadas por hongos patógenos primarios y las causadas por hongos oportunistas (Tabla 5.1).

Los hongos patógenos primarios tienen la capacidad de vencer los mecanismos de defensa del huésped, produciendo enfermedad en los individuos sanos y dando lugar a infecciones particularmente graves en los pacientes inmunodeprimidos. Estos hongos se encuentran restringidos a unas áreas geográficas concretas y tienen la capacidad genética de modificar su morfología, metabolismo, estructura y forma de reproducción para adaptarse al ambiente hostil de los tejidos del hospedador, pasando de

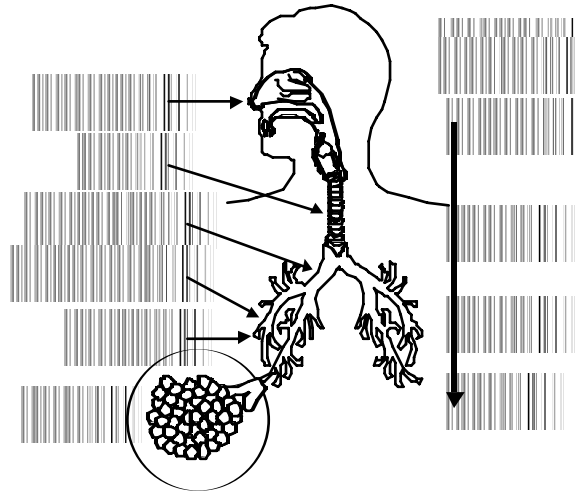


Figura 5.1. Límite de la penetración de las esporas según su diámetro.

hongos filamentosos, cuando crecen en su nicho ecológico natural, a levaduras o esférulas cuando sus esporas son inhaladas y penetran en el organismo; es lo que se ha definido como dimorfismo térmico. Puesto que su implicación como agentes de micosis invasoras pulmonares es indudable, siempre que se aisle cualquiera de estos hongos en un enfermo con manifestaciones clínicas compatibles, el diagnóstico de infección fúngica se considera proba-

Tabla 5.1. Principales agentes de micosis pulmonares invasoras.

Hongos patógenos primarios

Histoplasma capsulatum var. *capsulatum*
Blastomyces dermatitidis
Coccidioides immitis
Paracoccidioides brasiliensis
Penicillium marneffeii
Emmonsia parva
Sporothrix schenckii

Hongos oportunistas

Aspergillus fumigatus
Aspergillus flavus
Pneumocystis carinii
Absidia corymbifera
Rhizopus oryzae (arrhizus)
Scedosporium apiospermum
Cryptococcus neoformans
Fusarium solani
Candida albicans

do.

Por el contrario, los hongos oportunistas tienen un poder patógeno escaso y sólo producen enfermedad en pacientes con alguna enfermedad de base que condicione un defecto del sistema inmunitario o de los mecanismos de defensa inespecíficos. Son hongos ampliamente distribuidos por la naturaleza, siendo común el encontrar sus esporas en el aire o el suelo de cualquier latitud. La gran ubicui-

dad de estos hongos, dificulta el diagnóstico microbiológico de las micosis invasoras oportunistas del tracto respiratorio inferior, siendo difícil diferenciar entre un verdadero proceso invasor, una colonización o una simple contaminación. Los criterios microbiológicos sólo proporcionan un diagnóstico de probabilidad o posibilidad de infección fúngica invasora, requiriéndose para diagnóstico de seguridad la demostración histopatológica del hongo invadiendo el parénquima pulmonar (Tabla 5.2).

Tabla 5.2. Criterios diagnósticos de infección fúngica invasora del tracto respiratorio inferior (adaptada de <http://www.aspergillus.man.ac.uk>).

INFECCIÓN FÚNGICA PROBADA

- Histo/citopatología mostrando hifas, esférulas o levaduras y/o pseudohifas en muestra de parénquima pulmonar obtenida por aspiración con aguja o biopsia, con evidencia de lesión tisular microscópica o inequívocamente por imagen, o cultivo positivo con evidencia clínica o radiológica de infección.
- Cultivo de muestra respiratoria positivo para *Histoplasma*, *Blastomyces*, *Coccidioides* o *Paracoccidioides* en paciente sintomático u observación histopatológica de elementos morfológicamente compatibles con serología positiva.
- Observación histopatológica de elementos morfológicamente compatibles con *P. carinii* en lavado broncoalveolar de paciente con sida y clínica compatible.

INFECCIÓN FÚNGICA PROBABLE

- Debe presentar al menos un factor predisponente, acompañado de un hallazgo microbiológico y un criterio clínico mayor (o dos menores).

INFECCIÓN FÚNGICA POSIBLE

- Debe presentar al menos un factor predisponente, acompañado de un hallazgo microbiológico o un criterio clínico mayor (o dos menores).

Factores predisponentes:

1. Neutropenia $<500/\text{mm}^3$ durante más de 10 días.
2. Fiebre persistente >96 h que no responde a antibióticos de amplio espectro.
3. Temperatura $> 38^\circ\text{C}$ ó $< 36^\circ\text{C}$ con alguna de las siguientes condiciones:
 - neutropenia > 10 días en los 30 días previos.
 - empleo de inmunosupresores en los últimos 30 días.
 - antecedentes de infección fúngica invasora.
4. Signos y síntomas de enfermedad de injerto contra huésped.
5. Uso de corticosteroides > 3 semanas.

Criterios microbiológicos:

1. Cultivo positivo para *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., mucorales, *Scedosporium* spp. o *C. neoformans* en esputo o LBA.
2. Examen microscópico directo positivo para hongos filamentosos o criptococo en esputo o LBA.
3. Antígeno de *Aspergillus* positivo en 2 muestras de LBA o suero.
4. Lesión pulmonar con cultivos bacteriológicos de cualquier tipo de muestra (sangre, esputo, LBA,...) negativos para los posibles agentes de infección del tracto respiratorio inferior.

Criterios clínicos mayores:

- Cualquier infiltrado nuevo con signo del halo, menisco aéreo o cavitación rodeada de un área de consolidación.

Criterios clínicos menores:

1. Síntomas del tracto respiratorio inferior (tos, hemoptisis, disnea,...).
2. Signos de derrame pleural.
3. Cualquier nuevo infiltrado que no cumpla el criterio mayor.

5.2. Recogida, transporte y conservación de muestras respiratorias

Como cualquier enfermedad infecciosa, el diagnóstico de las micosis se inicia con la sospecha clínica que permite indicar una serie de pruebas complementarias para llegar al diagnóstico final. El diagnóstico definitivo lo facilita el laboratorio de Microbiología aislando e identificando un posible agente causal en un producto patológico y el de Anatomía Patológica demostrando, si es preciso, la invasión tisular fúngica. Por lo tanto, el tipo y la calidad de la muestra clínica o producto patológico que se remite al laboratorio para su análisis, es crucial en el diagnóstico etiológico de los procesos infecciosos y condiciona en gran manera la rentabilidad de cualquier estudio microbiológico.

5.2.1. Tipo de muestras clínicas y técnicas de recogida

Exudado y lavado nasofaríngeo

Mediante hisopo de algodón o catéter, aspirar el moco por vía per o retranasal (para facilitar la aspiración puede requerirse la instilación previa de solución salina). Hay que tener presente que la muestra obtenida pertenece al tracto respiratorio superior, por lo que en caso de ser positiva, tan sólo será indicadora de colonización de las vías aéreas superiores.

Espujo por expectoración espontánea

La muestra debe obtenerse tras una expectoración profunda preferentemente matinal, mediante tos o fisioterapia respiratoria (se recomienda el lavado previo de la boca con agua destilada estéril o solución salina y evitar que la expectoración se contamine con saliva o secreciones postnasales). Aunque el esputo es una de las muestras más fáciles de recoger y con menos riesgo para el paciente, su empleo indiscriminado en el diagnóstico de las infecciones pulmonares no suele ser útil, pues los microorganismos presentes en la muestra no necesariamente se correlacionan con los del tracto respiratorio inferior. Su utilidad diagnóstica vendrá condicionada en gran parte por su "calidad", que se valora en función del número de leucocitos polimorfonucleares (PMN) y células epiteliales (CE) pre-

sentes en la muestra (> 25 PMN y < 10 CE / campo, $\times 100$). Sin embargo, el esputo tiene valor diagnóstico *per se* en las micosis sistémicas por hongos dimórficos patógenos primarios (*Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatitidis*, *Paracoccidioides brasiliensis* y *Penicillium marneffei*). Aunque recomendado en ocasiones, el cultivo cuantitativo del esputo no ha demostrado su utilidad para diferenciar entre infección y colonización en las micosis oportunistas.

Espujo inducido

El esputo inducido se obtiene tras hacer inhalar al paciente, durante unos 15-20 min, nebulizaciones de 20-30 ml de solución salina hipertónica estéril, obtenidas mediante un nebulizador ultrasónico. Su valor diagnóstico equivale a la expectoración espontánea, aunque con experiencia y una meticulosa técnica de recogida se puede minimizar la contaminación nasobucal. Se recomienda como alternativa al esputo en caso de que no sea posible una expectoración espontánea, habiendo sido muy preconizado su empleo en el diagnóstico de la neumonía por *Pneumocystis carinii*, aunque debe tenerse presente que su sensibilidad es inferior a la del lavado broncoalveolar (LBA).

Aspirado tráqueal (AT)

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

Lavado bronquial o broncoaspirado (BAS)

Mediante fibrobroncoscopia se realiza una aspiración de las secreciones del árbol bronquial, generalmente tras la instilación de 5-10 ml de suero fisiológico. No hay que olvidar que la muestra procede del árbol bronquial superior y no es representativa del territorio alveolar ni bronquiolar. En el enfermo intubado tiene el mismo valor que el AT y, en el no intubado, puede estar contaminada por secreciones del tracto respiratorio superior, siendo su valor diagnóstico similar al del esputo. Sólo está indicado cuando el volumen de líquido recuperado en el LBA es insuficiente y existe la sospecha de una infección fúngica pulmonar por patógenos primarios.

Cepillado bronquial

A través del fibrobroncoscopio se introduce un cepillo relativamente rígido que permite obtener muestras con una elevada proporción de células descamadas de las paredes del árbol bronquial. Hay que tener presente que la muestra no está protegida y puede contaminarse al pasar por el canal del broncoscopio. Se emplea, sobre todo, para el diagnóstico citológico de enfermedades neoplásicas y puede ser de utilidad en el diagnóstico de procesos bronco-neumónicos víricos (al poderse evidenciar cambios citopáticos o cuerpos de inclusión) pero no es una muestra recomendable para el estudio de las infecciones fúngicas.

Lavado broncoalveolar (LBA) convencional

Para realizar la toma de la muestra el fibrobroncoscopio debe enclavarse en el árbol bronquial e instilar » 120 ml solución salina que posteriormente será recuperada (10-100 ml). La muestra representa las secreciones presentes en aproximadamente un millón de alveolos y sus correspondientes bronquiolos (» 1% de la superficie pulmonar), estimándose que en el líquido recuperado se encuentran diluidas 1 ml de secreciones. El fluido recuperado se considera la muestra más adecuada y sensible para el diagnóstico de las infecciones respiratorias causadas por hongos dimórficos patógenos primarios y para el diagnóstico de la neumonía por *P. carinii*. En enfermos inmunodeprimidos, es la técnica de elección para el diagnóstico de presunción de las micosis invasoras oportunistas del tracto respiratorio inferior, con valores predictivos positivos que pueden ser superiores al 80%, según el tipo de inmunosupresión y la micosis de la que se trate. Al igual que en el esputo, el cultivo cuantificado del LBA tampoco puede diferenciar entre infección fúngica y colonización, pero constituye una de las muestras más rentables para el diagnóstico de la aspergilosis pulmonar.

LBA protegido

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

Mini-LBA

Se introduce un catéter telescópico en el

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

Cepillado protegido

La toma de muestra requiere dos catéteres telescopados, uno externo que lleva un tapón en la punta y otro interno a través del cual se introduce el cepillo. A través del canal del fibrobroncoscopio se introduce el catéter externo y, una vez se ha alcanzado la zona deseada, con el catéter interno se expulsa el tapón del catéter externo y se hace avanzar el cepillo hasta recoger la muestra. Mediante esta técnica, se recogen en el cepillo 0,001-0,01 ml de las secreciones presentes en un único bronquiolo, que, para su transporte, serán diluidas en 1 ml de solución salina. Su utilidad está limitada al diagnóstico de las neumonías bacterianas (empleando criterios cuantitativos) y no es una muestra útil para el diagnóstico de las infecciones fúngicas debido a su baja sensibilidad.

Biopsia transbronquial

A través del broncoscopio se introducen unas pinzas que, mediante visión fluoroscópica, permiten la obtención de parénquima pulmonar peribronquial o incluso alveolar. Está especialmente indicada para estudios histológicos. Aunque el pequeño tamaño de las biopsias obtenidas merman la sensibilidad de la muestra, debe tenerse presente su gran especificidad y valor en el diagnóstico de seguridad de las micosis invasoras. Es una muestra de gran rentabilidad para el diagnóstico de la neumonía por *P. carinii* en el paciente con sida, pero la elevada iatrogenia de la técnica (neumotórax o hemoptisis en un 20% de los casos) la relegan como última alternativa diagnóstica.

Punción-aspiración transtraqueal

A nivel de la membrana cricotiroides se punciona la tráquea y a través de la aguja se introduce una pequeña sonda por la que se aspiran las secreciones. Este procedimiento evita, en gran parte, la contaminación por flora orofaríngea, aunque en la práctica tiene una sensibilidad y especificidad muy

similar a la del esputo. No es una exploración carente de complicaciones y debe limitarse su empleo a casos muy seleccionados. En la actualidad es una técnica poco empleada y ha sido sustituida por otras con mejor rendimiento diagnóstico y menos complicaciones.

Punción pulmonar percutánea o transtorácica

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

Biopsia pulmonar percutánea

Mediante un trocar se punciona la cavidad torácica y se alcanza el pulmón, pudiendo obtenerse una pequeña porción de tejido de determinados focos pulmonares. El material que se obtiene es muy limitado y su rentabilidad en el diagnóstico microbiológico de las neumonías es relativamente baja. Además, es un material muy desestructurado y no es útil para estudios histopatológicos. En realidad, se trata de una técnica en desuso, pues sus complicaciones son muy similares a las de la biopsia pulmonar abierta y su utilidad mucho más pobre.

Biopsia pulmonar por toracotomía

La toma de muestra requiere anestesia general e intubación. Mediante toracotomía se aborda directamente el pulmón, pudiendo inspeccionarlo y tomar muestras biópsicas de las alteraciones observadas. Permite la obtención de un gran volumen de material que puede emplearse tanto para estudios microbiológicos como histopatológicos, siendo de gran utilidad en el diagnóstico de las micosis pulmonares invasoras por hongos oportunistas, pues permite el aislamiento y la demostración histológica de la invasión tisular. Su máxima rentabilidad se alcanza en el diagnóstico de lesiones localizadas (nodulares, tumorales o cavitadas). Pero se trata de una técnica muy agresiva que puede presentar complicaciones graves. Su indicación estaría limitada al diagnóstico de casos muy graves en pacientes con mala evolución clínica, que no hubie-

sen podido ser diagnosticados por otras técnicas menos invasoras.

Líquido pleural

A través de una punción transparietal, mediante una aguja de punción pleural, se extraen varios mililitros de líquido pleural. El empiema suele presentarse como complicación de una neumonía bacteriana o tuberculosa, pero no debe descartarse la implicación de un hongo que, en procesos neumónicos crónicos, puede invadir la cavidad pleural o introducirse en ella a través de un neumotórax o una fistula broncopleural. No hay que olvidar que la práctica de una toracocentesis puede presentar ciertas complicaciones, especialmente en forma de neumotórax o hemotórax.

Biopsia pleural

A través de una pequeña incisión en la pared torácica se introduce un trocar hasta perforar la hoja parietal de la pleura de donde se toman varias muestras biópsicas. La muestra suele emplearse para estudio histológico o para el diagnóstico de una posible paquipleuritis tuberculosa, siendo habitualmente poco útil en Micología. La aparición de neumotórax o hemotórax iatrogénico puede complicar su obtención.

5.2.2. Transporte y conservación de muestras

Las muestras respiratorias deben trasladarse al laboratorio en contenedores estériles, perfectamente cerrados y en un plazo máximo de 2 h desde su recogida. Los esputos, BAS y LBA se recogen en un frasco de boca ancha con cierre hermético, preferiblemente de rosca. Los productos de aspiración se depositan en un tubo estéril con tapón de rosca. Las secreciones recogidas por cepillado se transportan, en tubos con tapón de rosca, diluidas en 1 ml de solución salina. Las piezas biópsicas deben dividirse en dos fragmentos: uno se introduce en un frasco con formol al 10% y se envía para estudio anatómopatológico, y el otro, destinado al laboratorio de Micología, se introduce en un frasco o tubo con suero fisiológico para evitar su desecación.

Las muestras deben procesarse e inocularse lo más rápidamente posible, ya que el retraso en la

siembra reduce el número de células viables de *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatitidis*, *Aspergillus fumigatus* y algunas especies de mucorales. Si el procesamiento de la muestra va a demorarse durante varias horas, es preferible conservarla a 4 °C para reducir el sobrecrecimiento bacteriano, especialmente en muestras muy contaminadas como los esputos.

5.2.3. Recepción de las muestras en el laboratorio

Es conveniente anotar el aspecto de la muestra, la proporción de saliva que posee, su color, la presencia o ausencia de pus, sangre o moco, así como cualquier otra característica que se considere relevante. En las muestras recogidas por fibrobroncoscopio, debe anotarse el volumen de solución salina recuperado en el LBA así como el volumen en el que se encuentran diluidas las secreciones obtenidas mediante cepillado protegido.

torias no debe sustituir al cultivo, pero es una técnica rápida que puede proporcionar al clínico una información muy útil y, en ocasiones, puede incluso llegar a ser diagnóstica. Así, la observación de quistes o trofozoitos de *P. carinii* en una muestra de LBA, o la visualización de pequeñas levaduras en el interior de células histiocitarias, son hallazgos patognomónicos de neumocistosis e histoplasmosis, respectivamente. Pero también, la presencia de hifas no tabicadas en un paciente en cetoacidosis diabética, puede ser de gran valor para iniciar el tratamiento de una posible mucormicosis; así como la presencia de hifas tabicadas en una muestra respiratoria de un paciente neutropénico, puede ser suficiente para orientar una posible aspergilosis pulmonar invasora.

Por otro lado, la observación de elementos fúngicos característicos en el examen directo (grandes levaduras o levaduras intracelulares) puede alertar sobre la necesidad de emplear técnicas de cultivo específicas o tiempos de incubación más prolongados.

A continuación se hace referencia a una selección técnicas de examen directo que pueden aplicarse a muestras procedentes del tracto respiratorio inferior, indicando su utilidad y principales características (Tablas 5.3 y 5.4) pero sin entrar en sus detalles metodológicos (Capítulo 14).

5.3. Examen directo de muestras respiratorias

El examen directo de las muestras respira-

5.3.1. Técnicas de examen directo sin colorantes

Tabla 5.3. Indicación de las principales técnicas de examen directo, en función del tipo de muestra del tracto respiratorio inferior.

	Esputo Aspirado traqueal Broncoaspirado	Lavado broncoalveolar	Biopsia bronquial Biopsia pulmonar
Digestión KOH +/- blanco calcoflúor	Búsqueda elementos fúngicos	Búsqueda elementos fúngicos	Búsqueda elementos fúngicos Reservar para histopatología
Tinta china		Sospecha criptococosis	
Tinción de Gram	Evaluar calidad de las muestras	Evaluar calidad de las muestras	
Diff-Quick/Giemsa	Sospecha histoplasmosis	Sospecha neumocistosis Sospecha histoplasmosis Sida (<200 CD4)	Sospecha histoplasmosis
Hematoxilina eosina			Evidenciar reacción tisular
Gomori-Grocott		Sospecha neumocistosis (Diff-Quick negativa)	Búsqueda elementos fúngicos
Tinción de PAS			Búsqueda elementos fúngicos
Anticuerpos marcados		Sospecha neumocistosis (Diff-Quick, Grocott negativas)	Identificación elementos fúngicos

Tabla 5.4. Características del examen directo de los principales agentes de micosis invasoras pulmonares.

	Descripción
<i>Histoplasma capsulatum</i>	Tinción de Diff-Quick: pequeñas levaduras ovaladas (1-4 μm) de un intenso color púrpura, en el interior de células macrofágicas. Es característico observar las levaduras rodeadas de un halo claro o falsa cápsula.
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	Levaduras redondeadas u ovales, extremadamente polimorfas (5-60 μm), suelen presentar gemaciones múltiples de base estrecha, siendo característica la observación de células multigemantes en rueda de timón.
<i>Coccidioides immitis</i>	Grandes esférulas de 10 a 80 μm , de pared fina y con numerosas endosporas de 2-5 μm en su interior.
<i>Blastomyces dermatitidis</i>	Levaduras grandes (8-15 μm), redondeadas o ligeramente ovaladas, de pared lisa y gruesa y gemación característicamente única, de base ancha y tamaño muy similar al de la célula madre.
<i>Penicillium marneffei</i>	Pequeñas levaduras ovales o elípticas (3-8 μm) en el interior de histiocitos. Es característica la observación de un septo central.
<i>Pneumocystis carinii</i>	Diff-Quick: material amorfo, mal definido de color púrpura y apariencia espumosa, abundantes trofozoitos con el núcleo teñido de rojo y el citoplasma de azul. No tiñe los quistes. Gomori-Grocott: quistes oscuros, redondos u ovalados (4-7 μm), muchas veces colapsados en forma de doble paréntesis, generalmente agrupados y envueltos por material amorfo. No tiñe los trofozoitos.
<i>Aspergillus</i>	Hifas hialinas de un diámetro inferior a 5 μm , de bordes externos paralelos, separadas por tabiques y ramificaciones dicotómicas, característicamente en ángulo agudo (45°). Indistinguible de otros hongos hialinos.
Mucorales	Hifas muy irregulares, con bordes externos no paralelos y diámetro variable (entre 5 y 25 μm), no suelen presentar septos y las ramificaciones son generalmente en ángulo recto (no dicotómicas).
<i>Cryptococcus neoformans</i>	Levaduras esféricas (5-7 μm), no gemadas o con una única gemación de base estrecha. Tinta china: pone en evidencia la cápsula, que aparece como un halo claro y bien delimitado, de 2 a 10 μm , que rodea completamente la célula fúngica, la cual destaca por la refringencia de su pared.
<i>Candida</i>	Levaduras redondas u ovales (4-6 μm) de gemación multilateral con pseudofilamentos y cadenas de levaduras gemantes.

Examen en fresco / examen en fresco tras digestión con KOH

El examen directo de las muestras respiratorias sin tinción, suele tener una rentabilidad muy baja si no se procede a una concentración previa por centrifugación, pero en este caso también se concentran un gran número de células y otros artefactos que hacen muy difícil la observación microscópica, siendo prácticamente indispensable clarificar las muestras con la adición de unas gotas de KOH al 15-20% (Capítulo 14).

Las muestras de LBA son suficientemente líquidas y pueden centrifugarse directamente, mientras que los esputos, AT y BAS deben someterse a un tratamiento de fluidificación previo con un agente mucolítico (N-acetil-cisteína al 0,5% o Sputolysin, v/v a temperatura ambiente hasta la fluidificación de la muestra). Las muestras biopsicas deben fragmentarse en pequeños trozos para facilitar la acción del KOH.

La observación de levaduras de

Blastomyces dermatitidis en una muestra respiratoria es diagnóstica de blastomicosis pulmonar. Se trata de levaduras grandes (8-15 μm de diámetro), redondeadas o ligeramente ovaladas, de pared lisa y gruesa y gemación característicamente única, de base ancha y tamaño muy similar al de la célula madre (Figura 2.19). Las levaduras de *Paracoccidioides brasiliensis* son redondeadas u ovales, y extremadamente polimorfas en cuanto a tamaño, y suelen presentar gemaciones múltiples de base estrecha siendo característica la observación de células multigemantes en rueda de timón (Figura 2.19). La forma parasitaria de *Coccidioides immitis* puede ser fácilmente reconocible cuando en las muestras respiratorias se observan grandes esférulas de 10 a 80 μm , de pared fina y con numerosas endosporas de 2-5 μm en su interior (Figura 2.19 y Figura 14.4).

En la aspergilosis pulmonar, el examen directo de las muestras respiratorias puede evidenciar la presencia de hifas hialinas de un diámetro inferior a 5 μm , de bordes externos paralelos, sepa-

radas por tabiques y ramificaciones dicotómicas, característicamente en ángulo agudo. Debe tenerse en cuenta que las hifas de *Aspergillus* en una muestra clínica son indistinguibles de las de otros hongos filamentosos como *Scedosporium* o *Fusarium* que también pueden ser agentes de micosis pulmonar oportunista. Las hifas de los hongos filamentosos inferiores (mucorales) son muy irregulares, con bordes externos no paralelos y diámetro variable (5-25 µm), no suelen presentar septos, o son muy escasos, y las ramificaciones son en ángulo recto no dicotómicas.

Examen con tinta china

Está especialmente indicado en muestras de LBA en las que se plantea el diagnóstico diferencial de criptococosis pulmonar. Mediante el examen con tinta china se pone en evidencia la cápsula de *C. neoformans* como un halo claro y bien delimitado, de 2 a 10 µm, que rodea completamente la célula fúngica (Figura 2.20), la cual destaca por la refringencia de su pared (Capítulo 14).

5.3.2. Técnicas de examen directo mediante tinciones

Tinción de Gram

Es de utilidad para evaluar la calidad de las muestras respiratorias, lo que en el caso de las infecciones fúngicas oportunistas debería ser un paso limitante para continuar con el procesamiento. Para ello las preparaciones deben evaluarse a bajo aumento (x100), considerándose que una muestra rica en leucocitos polimorfonucleares, histiocitos y células del epitelio del árbol traqueobronquial es representativa de una infección respiratoria de vías bajas, mientras que la presencia de células epiteliales orofaríngeas es un claro índice de contaminación oral (Capítulo 14).

Tinción de Giemsa / Diff-Quick

El empleo de estas tinciones es obligado en muestras de LBA de enfermos con sida, pues permite el diagnóstico rápido de la neumocistosis con una muy aceptable sensibilidad (70-80%). Las preparaciones deben observarse inicialmente a bajos aumentos (x100), buscando un material amorfo, mal definido y de apariencia espumosa que se tiñe de color púrpura con la tinción de Diff-Quick y en donde se encuentran englobados los quistes y trofo-

zoitos de *P. carinii*. A grandes aumentos (x1.000) este material se observa formado por la superposición de múltiples círculos no teñidos, que corresponden a los quistes, y abundantes trofozoitos, que destacan por presentar el núcleo teñido de rojo y el citoplasma de azul (Capítulo 14).

Tinciones argénticas

La tinción de Gomori-Grocott es muy útil en el diagnóstico de la neumocistosis y se considera como método de referencia. Mediante la misma, los quistes de *P. carinii* (pero no los trofozoitos) se tiñen de oscuro, observándose como estructuras redondas u ovaladas, de unos 4-7 µm, muchas veces colapsadas en forma de doble paréntesis, generalmente agrupadas y envueltas por material amorfo (Capítulo 14).

Estas tinciones también son de elección cuando interesa descartar la presencia de hongos en nódulos pulmonares, especialmente si estos presentan amplias áreas de caseosis o están calcificados, pues la acción combinada del ácido crómico que actúa como disolvente y la impregnación argéntica permiten la visualización de elementos prácticamente imposibles de distinguir con otras tinciones.

5.3.3. Técnicas de examen directo con fluorocromos

Tinción con blanco de calcoflúor

Esta técnica es aplicable a cualquier tipo de muestra respiratoria y permite la identificación morfológica de las estructuras fúngicas con las mismas consideraciones que las ya mencionadas en el examen en fresco (Capítulo 14).

5.3.4. Técnicas inmunológicas de examen directo

En la neumocistosis, el empleo de anticuerpos monoclonales marcados con fluoresceína, parece haber demostrado una sensibilidad mucho más alta que cualquier otra técnica de examen directo, si bien es cierto que algunos de los casos diagnósticos por fluorescencia, y no por otras técnicas, mejo-

raron clínicamente sin tratamiento específico (Capítulo 14).

El empleo de anticuerpos marcados puede facilitar la identificación de elementos fúngicos, pudiendo ser especialmente útil en cortes histológicos. Pero el arsenal disponible de anticuerpos marcados es muy escaso y, salvo contadas excepciones, sólo están disponibles en algunos centros de referencia. En enero de 2001, la *Division of Bacterial and Mycotic Diseases* del CDC ofrecía la posibilidad de identificar por técnicas inmunohistológicas *C. immitis*, *C. neoformans*, *Candida* spp., *H. capsulatum*, *B. dermatitidis* y *Aspergillus* spp., pero alertaba que los reactivos para la identificación de los tres últimos estaban aún en fase de evaluación.

5.4. Cultivo de muestras respiratorias: siembra, incubación e interpretación

Al igual que en otros procesos infecciosos, el cultivo de las muestras respiratorias es un paso esencial y necesario en el diagnóstico de las infecciones fúngicas del tracto respiratorio inferior. Su sensibilidad, salvo excepciones y siempre que se disponga de la muestra adecuada y el procesamiento de la misma sea correcto, acostumbra a ser más alta que la de cualquier otra técnica diagnóstica y además permite el aislamiento del agente causal, lo que es indispensable para una correcta identificación de la especie implicada y, en caso de estar indicados, hace posible la práctica de estudios de sensibilidad o epidemiológicos.

El procesamiento y cultivo de las muestras respiratorias debe realizarse tan pronto como sea posible después de la recogida de la muestra; en caso contrario, las muestras deben conservarse en nevera a 4 °C. La tasa de recuperaciones de posibles hongos patógenos siempre es mayor en las muestras recién recogidas que en aquellas conservadas en nevera o congeladas durante periodos de tiempo más o menos prolongados. Así, el índice de viabilidad de *H. capsulatum* y otros hongos en muestras de esputo se reduce considerablemente después de mantener las muestras 24 h a temperatura ambiente, en nevera o congeladas.

Si bien es cierto que siempre que se manipula un cultivo micológico deben tomarse las medidas de protección personal adecuadas, éstas deben extremarse cuando se trabaja con cultivos procedentes de muestras del tracto respiratorio inferior, empleando, a ser posible, cabinas para nivel 3 de bioseguridad (Capítulo 17), pues la gran mayoría de hongos agentes de micosis invasoras del tracto respiratorio inferior se adquieren por inhalación, existiendo la posibilidad de que el proceso infeccioso esté causado por un hongo patógeno primario o que

estén implicados otros agentes infecciosos potencialmente patógenos, como las micobacterias.

5.4.1. Medios de aislamiento

Para la siembra de las muestras respiratorias se recomienda emplear medios vertidos en tubos de 25 x 150 mm y solidificados en forma de agar inclinado, en lugar de medios en placas de Petri, que si bien facilitan el agotamiento de la muestra se deshidratan con mayor rapidez y pueden contaminarse fácilmente durante la incubación. El empleo de medios en tubo tiene el inconveniente de dificultar la siembra y el agotamiento de la muestra, pero consigue mantener las condiciones de humedad del medio durante más tiempo y minimiza la posibilidad de propagación de las esporas. Además, su boca estrecha hace más difícil, aunque no imposible, la salida de las esporas, reduciendo la posibilidad de accidentes por inhalación de esporas y evitando la contaminación ambiental (Capítulo 17).

Medio de Sabouraud + cloranfenicol/gentamicina

Este medio (SDA) se recomienda como medio estándar para la siembra de todas las muestras respiratorias, aunque siempre debe ser suplementado con alguna solución antibiótica: cloranfenicol (0,5 g/l), gentamicina (0,05 g/l) o ambos, simultáneamente (Capítulo 3).

Medio de Sabouraud + cloranfenicol + cicloheximida

La adición de cicloheximida (0,5 g/l) al medio base de Sabouraud con antibióticos, es útil para evitar el crecimiento bacteriano y prevenir el sobrecrecimiento de hongos contaminantes, pero inhibe un gran número de hongos oportunistas del tracto respiratorio inferior, como la mayoría de especies de *Aspergillus*, mucorales, *Fusarium*, *Scedosporium*, *C. neoformans* y algunas especies de *Candida*, por lo que debe reservarse para cuando se necesite recuperar algún hongo patógeno primario que, por su crecimiento más lento, podría ser inhibido por el sobrecrecimiento de otros hongos filamentosos. No es recomendable para la siembra sistemática de todas las muestras respiratorias (Capítulo 3).

Agar *Guizotia abyssinica* + cloranfenicol/gentamicina

El empleo de un medio a partir de alpiste

(*Guizotia abyssinica*), suplementado con antibióticos, puede ser de gran utilidad para el aislamiento de *C. neoformans* en muestras respiratorias. En este medio, gracias a la acción de una fenoloxidasas que hidroliza la cafeína y produce melanina, las colonias de *C. neoformans* adquieren una coloración marrón que las hace fácilmente reconocibles y que, empleando medios de cultivo convencionales, podrían pasar desapercibidas entre otras levaduras, por lo que su empleo es muy recomendable si existe una sospecha clínica de criptococosis pulmonar (Capítulo 3).

Agar cerebro-corazón + cloranfenicol / gentamicina

Los medios basados en caldos de cerebro y corazón son medios ricos que pueden suplementarse con un 10% de sangre de carnero y soluciones antibióticas, siendo de gran utilidad para el aislamiento de hongos patógenos primarios en muestras respiratorias (Capítulo 3).

5.4.2. Siembra de las muestras

La calidad de la muestra clínica condiciona el diagnóstico de cualquier proceso infeccioso y, en el caso de las infecciones fúngicas pulmonares oportunistas, debería condicionar el posterior procesamiento de la misma. Todas las muestras biópsicas deben cultivarse, pues los cultivos de estas reflejan la presencia o ausencia de hongos en el parénquima pulmonar. Las secreciones respiratorias son, en un principio, un producto estéril procedente de los bronquios; por lo tanto, la presencia en estas de elementos fúngicos traduce una infección o colonización del tracto respiratorio inferior. Sin embargo, la contaminación de la muestra con secreciones procedentes del tracto respiratorio superior condiciona la especificidad de los resultados por lo que, en lo posible y antes de proceder al cultivo, debería evaluarse la calidad de una muestra en toda secreción respiratoria, solicitando una nueva siempre que esta no fuese suficientemente aceptable.

Como norma general, se recomienda sembrar unos 0,5 ml de muestra por tubo de cultivo y emplear varios tubos de SDAC para cada muestra (y uno de Sabouraud con cicloheximida y antibióticos si existe la sospecha de una micosis pulmonar por hongos dimórficos). Las muestras deben inocularse en toda la superficie del medio de cultivo, y, para evitar que se acumulen en el fondo del tubo, es conveniente que estos se incuben las primeras

24 h en posición horizontal.

Espuito, AT y BAS

Las porciones del espuito o aspirados claramente purulentas, hemáticas o caseificadas pueden inocularse directamente sobre el medio de cultivo. Las muestras fluidas deben concentrarse por centrifugación (1.500 g durante 10 min) desechando el sobrenadante (o reservándolo para otros estudios) y sembrando el sedimento resuspendido en un volumen conocido de solución salina. Las muestras muy viscosas deben fluidificarse antes de la siembra empleando algún agente mucolítico (N-acetil-cisteína, mezclada con un mismo volumen de muestra y dejándola actuar a temperatura ambiente hasta que se consiga la fluidificación). Posteriormente la muestra se concentra por centrifugación.

LBA

Las muestras de LBA se tratan de igual modo que los espuitos, sembrando directamente las porciones purulentas o hemáticas y concentrando el resto por centrifugación; aunque en este caso es recomendable registrar el volumen inicial de la muestra y el volumen en el que se resuspende, para que, sembrando una cantidad conocida de muestra, los resultados se puedan expresar cuantitativamente (UFC/ml), que, si bien no permiten confirmar una infección fúngica, sí dan una idea bastante aproximada de la cantidad de elementos fúngicos presentes en la muestra.

Biopsias

Antes de su siembra, las biopsias deben fragmentarse en pequeños pedazos de 0,5-1 mm con pinzas y bisturí o triturarse con arena estéril en un mortero, pero sin olvidar que la manipulación excesiva de la muestra puede reducir la viabilidad de los elementos fúngicos, especialmente de los mucorales, en los que la rotura de su estructura coenocítica comporta la pérdida de la viabilidad del hongo.

5.4.3. Condiciones de incubación

Transcurridas las primeras 24 h después de la siembra, los tubos se incubarán en posición vertical, en atmósfera aerobia y húmeda (40-50%) y a temperatura constante (28-30 °C). Si los tubos tienen tapón de rosca, debe aflojarse para asegurar el aporte necesario de oxígeno a la muestra. El empleo

de diferentes temperaturas de incubación (30 y 37 °C) es útil para diferenciar entre hongos contaminantes y patógenos, pero carece de valor en el primario aislamiento de hongos dimórficos, pues la forma filamentosa crece más lentamente y la forma levaduriforme es indistinguible macroscópicamente de la de otras levaduras. A 30 °C crecen todos los hongos de la muestra y a 37 °C sólo aquellos capaces de dar lugar a un proceso invasor.

Las muestras deben incubarse un mínimo de 4 semanas, que podrían alargarse hasta 12 en caso de que existiese una sospecha clínica de histoplasmosis y los cultivos fuesen negativos. Nunca debe darse por finalizado un estudio ni desecharse un cultivo antes de las 4 semanas, ni tan siquiera cuando ya se ha aislado un posible agente patógeno, pues podría ser que se tratase de un contaminante o una simple colonización, y que las colonias del verdadero agente causal todavía no fuesen evidentes.

5.4.4. Lectura e interpretación

de los cultivos

Durante la primera semana de incubación se recomienda realizar una lectura diaria de los medios de cultivo, especialmente si el examen directo ha sido positivo. Transcurrido este periodo de tiempo, la lectura puede realizarse 1 ó 2 veces por semana (según la disponibilidad), hasta completar el tiempo de incubación establecido.

Una vez detectado el crecimiento macroscópico de un hongo debe procederse a su identificación (Capítulos 11 y 13), teniendo siempre en cuenta que los criterios microbiológicos, por sí solos, no suelen ser suficientes para establecer el diagnóstico de infección fúngica invasora (Tabla 5.2), por lo que es necesario asociarlos a un contexto clínico determinado. De igual modo, la interpretación de los cultivos debe hacerse en función del hongo aislado y del tipo de muestra respiratoria evaluada, en el contexto de un paciente concreto con una clínica y unos factores predisponentes determinados.

Informar al clínico del aislamiento de hongos

Consejos prácticos para evaluar un cultivo de muestras respiratorias y emitir un informe:

- No todos los hongos tienen capacidad para producir una micosis invasora del tracto respiratorio inferior, por lo que hay que evaluar especialmente los aislamientos de aquellos hongos que con mayor frecuencia se han visto implicados en procesos clínicos (Tabla 5.1).
- El aislamiento de *A. fumigatus* o *A. flavus* en una muestra respiratoria de un paciente leucémico y/o neutropénico tiene un alto valor predictivo positivo de infección fúngica invasora.
- La gravedad y agresividad de una mucormicosis pulmonar justifica siempre informar de la presencia de un mucoral en una muestra respiratoria correctamente procesada.
- La corticoterapia prolongada es por sí sola un importante factor de riesgo para desarrollar una aspergilosis invasora.
- El aislamiento de *C. neoformans* en una muestra respiratoria es indicativo de criptococosis pulmonar o de infección sistémica.
- *S. apiospermum* y *S. prolificans* pueden dar lugar a micosis pulmonares invasoras clínicamente indistinguibles de la aspergilosis.
- La fusariosis pulmonar suele deberse a diseminación hematógena en un cuadro sistémico y, en más del 50% de los casos, cursa con hemocultivos positivos.
- La especie del género *Candida* rara vez dan lugar a micosis pulmonares invasoras, si no es en pacientes terminales, estando presentes en las secreciones respiratorias del 20% de la población sana y en más del 50% de los pacientes que han recibido antibioterapia.

gos considerados por el micólogo como contaminantes carece de sentido, al igual que informar de posibles oportunistas en pacientes inmunocompetentes sin factores de riesgo conocidos. Se recomienda informar personalmente los resultados,

Referencias

estableciendo una estrecha rela-

1. Baselski VS, Wunderink RG. Bronchoscopic diagnosis of pneumonia. Clin Microbiol Rev 1994; 7: 533-558.
2. Brown MS, Wu TC. The gram stain morphology of fungi, mycobacteria, and *Pneumocystis carinii*. J Med Technol 1986; 3: 495-499.
3. Latge JP. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. Clin Microbiol Rev 1999; 12: 310-350.
4. Powers CN. Diagnosis of infectious diseases: a cytopathologist's perspective. Clin Microbiol Rev 1998; 11: 341-365.
5. Ribes JA, Vanover-Sams CL, Baker DJ. Zygomycetes in human disease. Clin Microbiol Rev 2000; 13: 236-301.
6. El-Ebiary M, Torres A, Fàbregas N, *et al*. Significance of the isolation of *Candida* species from respiratory samples in critically ill, non-neutropenic patients. Am J Respir Crit Care Med 1997; 156: 583-590.
7. Glazer M, Nusair S, Breuer R, Lafair J, Sherman Y, Berkman N. The role of BAL in the diagnosis of pulmonary mucormycosis. Chest 2000; 117: 279-282.
8. Horvath JA, Dummer S. The use of respiratory-tract cultures in the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis. Am J Med 1996; 100: 171-178.
9. Larone DH. Medically important fungi: a guide to identification. 3rd ed. Washington D.C., American Society for Microbiology Press, 1995.
10. Land GA (Ed. section). Mycology. p. 6.1.1-6.8.4. In: Isenberg HD (Ed.) Clinical microbiology procedures handbook. Vol. 1. Washington D.C., American Society for Microbiology Press, 1992.

ción entre el micólogo y el clínico para evaluar conjuntamente la implicación clínica de los aislamientos. Por el contrario, el aislamiento de un hongo patógeno primario en cualquier muestra respiratoria tiene siempre un valor inequívoco y no debería plantear problemas de interpretación. Los cultivos de las biopsias pulmonares tampoco suelen presentar problemas de interpretación ya que, al tratarse de una muestra estéril, el aislamiento de cualquier hongo debe considerarse significativo, pero la posibilidad de una contaminación accidental hace que sea muy recomendable disponer también de estudios anatomopatológicos que confirmen la invasión tisular por elementos fúngicos.

Javier Pemán
Pilar Ramos
Isabel Iglesias

6.1 Fundamento

El diagnóstico de las infecciones fúngicas invasoras se basa, como el de cualquier otra enfermedad infecciosa grave, en dos pilares fundamentales: la presunción clínica y la confirmación microbiológica. Sin lugar a dudas, la base del diagnóstico micológico sigue siendo el cultivo de la muestra que permite el aislamiento e identificación del agente causal y la posterior realización de las pruebas de sensibilidad antifúngica. En el caso de las micosis invasoras es necesario, siempre que las condiciones clínicas del paciente lo permitan, el procesamiento de muestras profundas donde se presume la invasión fúngica: sangre, biopsias tisulares o líquidos orgánicos. Estas muestras, habitualmente estériles, son las más valiosas en un laboratorio de Micología, no sólo por su alta rentabilidad diagnóstica, sino también por la dificultad de obtención o imposibilidad de repetición, lo que obligará a extremar todas las medidas para obtener el mayor rendimiento de las mismas.

Actualmente, el hemocultivo sigue siendo la mejor técnica para el diagnóstico de una candidemia, a pesar de su escasa sensibilidad global (² 50%). Para intentar el aislamiento del agente causal de otras infecciones fúngicas invasoras será preciso procesar diferentes tipos de muestras teniendo siempre presente que cuanto más profundas sean, mayor será su fiabilidad diagnóstica [1]. Los patógenos fúngicos habitualmente aislados en este tipo de muestras se detallan en la **Tabla 6.1**.

6.2 Hemocultivo

Hoy día, para la recuperación de levaduras de la sangre se recomienda el uso de los mismos sistemas automatizados de monitorización continua utilizados para bacterias, pero si se sospecha una infección sistémica por un hongo dimórfico, la técnica de lisis-centrifugación parece ofrecer mayores ventajas. Sin embargo, para la recuperación de la mayoría de hongos filamentosos, ninguno de estos dos sistemas de hemocultivo ha demostrado su eficacia [2,3].

Los sistemas automatizados integran el sistema de detección, el incubador y el mecanismo de agitación en una sola unidad; cada frasco de hemocultivo se procesa individualmente, obviando su manipulación después de su introducción en el incubador y eliminando la posibilidad de la contaminación cruzada entre los frascos. Actualmente hay cuatro sistemas automatizados comercializados en España que se diferencian en el tipo de metabolito detectado, en el sistema de detección o en el tipo de agitación: BacT/Alert® (Organon Teknika Corp.) y BACTEC 9240® (Becton Dickinson) detectan el crecimiento microbiano midiendo la producción de CO₂ por colorimetría o por fluorescencia, respectivamente; ESP® (Difco) detecta el crecimiento microbiano por las variaciones manométricas originadas por el consumo o la producción de gas y, por último, Vital® (bioMérieux-Vitek) detecta el crecimiento por las disminuciones de fluorescencia en el interior de los frascos que se agitan con movimiento sinusoidal. Cualquiera de ellos es útil para el aisla-

Tabla 6.1. Patógenos fúngicos aislados con cierta frecuencia (++) o más raramente (+) en sangre y otras muestras estériles.

	Sangre	LCR	L. pleural	L. peritoneal	L. sinovial	MO	Tejidos
<i>Aspergillus</i>		++	++	++	+		++
<i>Blastomyces</i>		+			++	++	++
<i>Blastoschizomyces</i>	++						
<i>Candida</i>	++	++	++	++	++		++
<i>Coccidioides</i>		++			++		++
<i>Cryptococcus</i>	++	++	+	++		++	++
<i>Fusarium</i>	+		+	++			++
<i>Histoplasma</i>	++	++	+			++	+
<i>Mucor</i>				+			++
<i>Rhizopus</i>				+			++
<i>Rhodotorula</i>	++	++					
<i>Scedosporium</i>	+	+			++		++
<i>Sporothrix</i>		+			++		++
<i>Trichosporon</i>	++	+		++			

LCR: líquido cefalorraquídeo, MO: médula ósea



Figura 6.1. Botellas de hemocultivo del sistema automatizado BacT/Alert® (Organon Teknika Corp.).



Figura 6.2. Botellas de hemocultivo del sistema automatizado BACTEC 9240® (Becton Dickinson).



Figura 6.3. Botellas de hemocultivo del sistema automatizado Vital® (bioMérieux-Vitek).

miento de levaduras en los frascos de hemocultivo (Figuras 6.1-6.3).

Las aportaciones del sistema de lisis-centrifugación Isolator® (Oxoid) en el diagnóstico de las fungemias son muy interesantes. Su característica principal radica en su capacidad para lisar los leucocitos sanguíneos y la posterior liberación al medio de los posibles microorganismos fagocitados, por lo que es el método de elección para el aislamiento de *Histoplasma capsulatum*, cuya fase levaduriforme es esencialmente intracelular. Por otra parte, al permitir la siembra en cualquier medio sólido, también es muy útil para el aislamiento de levaduras con requerimientos especiales para su crecimiento, como las especies del género *Malassezia*, incapaces de crecer en los frascos de hemocultivos automatizados al no estar enriquecidos con ácidos grasos. Y, por último, al inocular en las placas un volumen conocido de inóculo, también permite la cuantificación (UFC/ml) de la infección. Entre los inconvenientes del sistema de lisis-centrifugación hay que destacar su mayor laboriosidad, sobre todo comparada con los sistemas automatizados, y la mayor posibilidad de contaminaciones en manos de personal no adiestrado (Figura 6.4).

6.2.1 Obtención de la muestra

Para evitar las frecuentes contaminaciones de los hemocultivos con flora bacteriana de la epidermis es muy importante realizar la extracción de sangre cuidando al máximo todas las medidas de asepsia. Los fabricantes de los sistemas automatizados recomiendan inocular dos frascos en cada extracción (aeróbico y anaeróbico) y, en el caso de niños, el frasco especialmente diseñado para ellos (un sólo frasco por extracción). El volumen de sangre inoculado en cada frasco es fundamental para aumentar la sensibilidad de la técnica (Tabla 6.2).

Tabla 6.2. Técnica de extracción e inoculación de sangre para los sistemas de hemocultivos automatizados.

1. Utilizar guantes estériles durante la extracción.
2. Desinfectar el tapón de goma del frasco con alcohol etílico (70%) y esperar 1 min antes de inocularlo.
3. Después de localizar el lugar de la venopunción, limpiar con un algodón impregnado con alcohol etílico (70%), realizando movimientos concéntricos de dentro hacia fuera.
4. Repetir la misma operación con otro algodón impregnado con povidona yodada (2%), dejándola actuar durante un minuto.
5. Una vez realizada la desinfección no debe volverse a palpar la vena; si fuera necesario, utilizar nuevos guantes estériles.
6. Extraer la sangre e inocular los frascos o viales de hemocultivo:
Adultos: 10 ml.
Niños: 1-5 ml (frasco pediátrico).
Neonatos y bajo peso: 0,5-1,5 ml (frasco pediátrico).
7. Limpiar los restos de povidona yodada con alcohol.

Algunos fabricantes han comercializado frascos de hemocultivo especialmente concebidos para la recuperación de patógenos fúngicos de la sangre como el Mycosis-IC/F® (Becton Dickinson) pero, hasta el momento, su utilidad sólo ha sido demostrada en los casos de septicemias mixtas por bacterias y hongos (Figura 6.5).

Los frascos de hemocultivo MYCO/F LYTIC® (Becton Dickinson) están diseñados para la recuperación de patógenos intracelulares. Incorporan al medio de cultivo un agente lítico (saponina) que induce la ruptura de los leucocitos y la posterior salida de microorganismos fagocitados que pueden ser detectados por el sistema automati-



Figura 6.4. Prensa Isostat® para la retirada del tapón de los tubos Isolator 10® del sistema lisis-centrifugación (Oxoid).



Figura 6.5. Botella de hemocultivo Mycosis-IC/F® (Becton Dickinson) diseñada especialmente para la recuperación de patógenos fúngicos.



Figura 6.6. Botella de hemocultivo MYCO/F LYTIC® (Becton Dickinson) diseñada para la recuperación de patógenos intracelulares (levaduras, hongos filamentosos, micobacterias).



Figura 6.7. Tubos Isolator 1,5® (pediátrico) e Isolator 10® del sistema lisis-centrifugación (Oxoid).

zado BACTEC 9240®. Hasta el momento, ha demostrado su utilidad en infecciones sistémicas por *H. capsulatum* (Figura 6.6).

La técnica de extracción e inoculación de la sangre en el sistema de lisis-centrifugación es similar, pero para su correcta realización hay que tener en cuenta las especificaciones del fabricante (Tabla 6.3). Para los niños, también existen comercializados tubos pediátricos (Isolator 1.5®) que, por su pequeño tamaño, no pueden procesarse de igual forma que los tubos de adultos: se inoculan con 0,5-1,5 ml de sangre, se voltean varias veces para activar la lisis celular y, sin necesidad de centrifugación, se siembra todo su contenido en el

Un consejo...

Los resultados obtenidos con el frasco Mycosis-IC/F (Becton Dickinson) son similares a los de los frascos convencionales en la mayoría de las candidemias. Pero en aquellos casos con firme sospecha clínica de candidemia y donde sólo se aíslan bacterias contaminantes en los frascos convencionales (*Staphylococcus coagulasa negativo*, *Corynebacterium*, etc), puede detectarse el crecimiento de levaduras subcultivando 10 ml del hemocultivo positivo para bacterias en un frasco de Mycosis-IC/F suplementado con 5 mg/l de vancomicina (Diluir 0,1 ml de Diatracin® 500 en 10 ml de solución salina, introducir 0,5 ml de esta dilución en el frasco de Mycosis-IC/F ya inoculado con los 10 ml del hemocultivo positivo y procesar de forma habitual en el arcón incubador).

Tabla 6.3. Técnica de extracción e inoculación de sangre para el sistema de lisis-centrifugación.

1. Utilizar guantes estériles durante todo el proceso.
2. Desinfectar el tapón de goma del tubo Isolator 10 con alcohol yodado, sin inundar la cavidad. Dejar secar completamente.
3. Abrir el cartucho de Vacutainer y ensamblar la aguja al porta-tubos.
4. Insertar el tubo Isolator 10 en el porta-tubos Vacutainer hasta la línea marcada.
5. Después de localizar el lugar de la venopunción, limpiar con un algodón impregnado con alcohol etílico (70%), realizando movimientos concéntricos de dentro hacia fuera.
6. Repetir la misma operación con otro algodón impregnado con povidona yodada (2%), dejándola actuar durante 1 min.
7. Una vez realizada la desinfección no debe volverse a palpar la vena; si fuera necesario, utilizar nuevos guantes estériles.
8. Realizar la venopunción manteniendo siempre la aguja en posición más elevada que el fondo del tubo (para que el contenido del mismo no contacte con el tapón de goma).
9. Empujar el tubo hasta el fondo del porta-tubos o hasta que la sangre fluya en su interior.
10. Cuando el tubo esté lleno (10 ml), retirarlo conjuntamente con el porta-tubos.
11. Separar el tubo del porta-tubos.
12. Invertir cuidadosamente el tubo 4-5 veces para facilitar la lisis celular y evitar la coagulación de la sangre.
13. Retirar la aguja del porta-tubos y desecharla en un contenedor adecuado.

medio seleccionado según el microorganismo sospechado (Figura 6.7).

6.2.2. Procesamiento del hemocultivo

Una vez inoculados, los frascos de hemocultivo deben ser introducidos en los arcones incubadores lo antes posible, de lo contrario se conservan a temperatura ambiente hasta su procesamiento. El crecimiento de la mayoría de las especies de levaduras es detectado por los sistemas automatizados en las primeras 72 h de incubación; no obstante, los frascos deben incubarse un mínimo de siete días y, al término de la incubación, se realiza un subcultivo del frasco en SDAC o un examen microscópico, con tinción de Gram o naranja de acridina, antes de informarlos como negativos.

Cuando el sistema automatizado detecte crecimiento microbiano en el interior de un frasco, debe realizarse un examen microscópico del mismo previa tinción (Gram) y, en el caso de observarse células levaduriformes, se realiza un subcultivo en SDAC y CHROMagar Candida® para, posteriormente, proceder a su identificación y al estudio de su sensibilidad (Capítulos 11, 15 y 16).

El procesamiento de los tubos de lisis-centrifugación es más complejo y no está exento de contaminaciones externas, por lo que deben extremarse al máximo todas las medidas indicadas por el fabricante (Tablas 6.4 y 6.5). Si durante la incubación se

Tabla 6.5. Procesamiento de los tubos Isolator 10® del sistema lisis-centrifugación (II). Extracción del sobrenadante, siembra del sedimento e incubación.

1. Realizar todo el procesamiento en campana de flujo laminar.
2. Comprimir completamente el bulbo de la "Pipeta de Sobrenadante" antes de introducirla en el tubo (para evitar el burbujeo y la resuspensión del sedimento).
3. Insertar cuidadosamente la punta de la pipeta en el tubo, a través de la membrana de la cápsula, manteniendo el bulbo comprimido.
4. Introducir la pipeta hasta que el bulbo contacte con la cápsula.
5. Aflojar la presión sobre el bulbo de la pipeta, permitiendo el flujo del sobrenadante en su interior (la entrada final de aire confirmará que el sobrenadante ha sido retirado completamente).
6. Desechar la pipeta en un contenedor adecuado.
7. Resuspender el sedimento del tubo en un Vortex.
8. Comprimir completamente el bulbo de la "Pipeta de Concentrado" antes de introducirla en el tubo.
9. Insertar cuidadosamente la punta de la pipeta en el tubo, a través de la membrana de la cápsula y manteniendo el bulbo comprimido.
10. Introducir la pipeta hasta tocar con la punta el botón del sedimento. Aflojar la presión sobre el bulbo de la pipeta, permitiendo el flujo del sedimento en su interior.
11. Distribuir equitativamente el sedimento en diferentes placas de SDAC y, utilizando la punta de la misma pipeta, realizar un zigzag perpendicular (15-20 estrías) sobre el inóculo dispensado.
12. Desechar la pipeta en un contenedor adecuado.
13. Las placas sembradas deben incubarse a 35 °C lo antes posible. Se colocan en la estufa hacia arriba durante las primeras 24 h de incubación. Posteriormente, se invierte su posición.
14. Las placas se examinan diariamente hasta cumplir el tiempo total de incubación (7 días).

Tabla 6.4. Procesamiento de los tubos Isolator 10 del sistema lisis-centrifugación (I). Retirada del tapón mediante la prensa Isostat®.

1. Los tubos Isolator 10 se deben procesar a su llegada al laboratorio. De lo contrario, se conservarán a temperatura ambiente (¡no refrigerar, ni congelar!).
2. Utilizar siempre una centrifuga con rotor de 35° de inclinación y adaptadores especiales para los tubos Isolator 10.
3. Centrifugar los tubos, con sus adaptadores, a 3.000 g durante 30 min. No utilizar el freno de la centrifuga para detenerla.
4. Retirar cuidadosamente los tubos de la centrifuga (para evitar la mezcla del sedimento con el sobrenadante).
5. Separar los tubos de sus adaptadores.
6. Introducir los tubos en la gradilla especial Isostat girando ligeramente en el sentido de las agujas del reloj.
7. Desinfectar el tapón de goma con alcohol yodado, sin inundar la cavidad. Dejar secar durante 1 min.
8. Colocar la gradilla en la prensa Isostat y cubrir cada tapón con una cápsula estéril Isostat.
9. Colocar cada tubo, con su cápsula, debajo de la prensa y empujar rápidamente el asa de la prensa hacia abajo.
10. Colocar el asa en su posición original y repetir la maniobra con cada tubo. Retirar la gradilla de la prensa.

observa crecimiento temprano de algún microorganismo, las placas deben reincubarse para comprobar el posible crecimiento de un segundo germen.

6.2.3. Diagnóstico de fungemia por *Malassezia* spp.

Las especies del género *Malassezia* son levaduras lipófilas que forman parte de la flora cutánea. *M. furfur* y *M. globosa* son agentes causales de la pitiriasis versicolor, dermatitis seborreica y ciertas foliculitis, pero también pueden causar sepsis relacionada con el catéter en neonatos, prematuros y enfermos inmunodeprimidos alimentados con nutrición parenteral enriquecida con lípidos [4]. Los sistemas automatizados de hemocultivos no suelen detectar su crecimiento por lo que, cuando se sospeche una fungemia por especies de este género, es aconsejable el uso de los tubos de lisis-centrifugación Isolator 10 o Isolator 1.5, dependiendo de la edad del paciente, para la extracción de sangre (preferiblemente a través del catéter de la nutrición parenteral) y su posterior siembra en medios de cultivo suplementados con ácidos grasos: SDA más aceite de oliva, Dixon o Leeming-Notman (Capítulo 3). El cultivo del catéter, utilizando la técnica de Maki en alguno de estos medios, también es de gran ayuda para el diagnóstico etiológico las sepsis asociadas a catéter (Capítulo 10).

Durante la primera década de la pandemia del sida, las infecciones fúngicas más frecuentes del SNC eran debidas a *Cryptococcus neoformans*; pero en la actualidad, gracias a la instauración de la triple terapia antiretroviral, las meningitis por *C. neoformans* son muchos menos frecuentes. Además, diferentes especies de los géneros *Candida* o *Rhodotorula*, hongos dimórficos como *Histoplasma* o *Coccidioides* o, incluso patógenos oportunistas como *Aspergillus*, *Scedosporium* o *Acremonium* también pueden causar meningitis. Sin embargo, la invasión del espacio leptomeníngeo por hongos miceliares es infrecuente, por lo que la gran mayoría de los aislamientos fúngicos en el LCR van a estar constituidos por levaduras. En nuestro medio, las meningitis fúngicas suelen ser secundarias a neurocirugía, traumatismos, prematuridad o a los sistemas de derivación de LCR.

El diagnóstico etiológico de una meningitis precisa el procesamiento y cultivo del LCR. La dificultad de su obtención hace del LCR una de las muestras biológicas estériles más valiosas en un

Tabla 6.6. Técnica de obtención del LCR.

1. Realizar la punción en condiciones de máxima asepsia.
2. Desinfectar la zona con povidona yodada al 2%.
3. Realizar la punción en los espacios intervertebrales L3-L4, L4-L5 o L5-S1.
4. Al llegar al espacio subaracnoideo, retirar el estilete y dejar salir libremente el LCR; recogerlo en tres tubos estériles con tapón de rosca (Bioquímica, Microbiología y Citología).
5. Extraer un volumen mínimo de 10 ml (3 ml / tubo).
6. Enviar inmediatamente al Laboratorio de Microbiología.
7. Extraer también sangre para hemocultivo.

6.3. Líquido cefalorraquídeo

Tabla 6.7. Técnica para el procesamiento del LCR.

1. Procesar en el laboratorio inmediatamente, de lo contrario, almacenarlo a temperatura ambiente (máximo 24 h).
2. Centrifugar todas las muestras >1 ml (1500 g / 15 min) y realizar los siguientes pasos en cabina de flujo laminar.
3. Dejar 1 ml de LCR junto con el sedimento y depositar el resto de sobrenadante en otro tubo estéril (para una posterior detección de antígenos).
4. Resuspender cuidadosamente el sedimento con la ayuda de un vórtex.
5. Dispensar una gota del sedimento sobre un portaobjetos para su examen microscópico directo: Tinta china y/o fresco (Capítulo 14).
6. Inocular el resto del sedimento en 2 tubos de SDA.
7. Incubar un tubo a 35 °C y otro a temperatura ambiente (30 días).
8. Si se sospecha meningitis por *C. neoformans*, realizar la detección de Ag criptocócico en el sobrenadante (Capítulo 14).
9. Vigilar los cultivos cada 48 h.
10. Si se detectase crecimiento fúngico, proceder a la identificación del microorganismo (Capítulos 11 y 13) y al estudio de su sensibilidad (Capítulos 15 y 16).

laboratorio de Microbiología; por lo tanto, la técnica de extracción y el posterior procesamiento del LCR deben ser lo más cuidadosa posible para aprovechar al máximo las posibilidades diagnósticas de la muestra (Tablas 6.6 y 6.7).

6.4. Otros líquidos orgánicos (pleural, peritoneal, pericárdico, sinovial)

Como respuesta a una infección, cualquier cavidad del organismo puede albergar líquido originado mediante un proceso exudativo. Estos líquidos, junto con los denominados estériles, son unas muestras microbiológicas de primer orden al reflejar el patrón infeccioso de los tejidos colindantes, por lo que deben ser manejados con extremo cuidado, recomendándose que su manipulación y siembra sea realizada en cabina de flujo laminar.

Los líquidos orgánicos que con mayor frecuencia se estudian en el laboratorio de Microbiología, después de la sangre y el LCR, son el pleural, peritoneal, pericárdico y sinovial.

Las técnicas para su obtención y procesa-

Tabla 6.8. Técnica de obtención de los líquidos orgánicos estériles.

1. Realizar la punción en condiciones de máxima asepsia.
2. Desinfectar la piel con povidona yodada al 2%.
3. Obtener la muestra por aspiración con aguja percutánea o por cirugía.
4. Extraer un volumen mínimo de 5 ml y depositarlo en un tubo estéril con tapón de rosca (o inocular un frasco de hemocultivo).
5. Enviar inmediatamente al Laboratorio de Microbiología.

Tabla 6.9. Técnica para el procesamiento de los líquidos orgánicos estériles.

1. Procesar en el laboratorio inmediatamente, de lo contrario, almacenarlo a temperatura ambiente (máximo 24 h).
2. Centrifugar todas las muestras >1 ml (1.500 g / 15 min) y realizar los siguientes pasos en cabina de flujo laminar.
3. Dejar 1 ml de líquido junto con el sedimento y depositar el resto del sobrenadante en otro tubo estéril.
4. Resuspender cuidadosamente el sedimento (aspirándolo y expulsándolo con una pipeta o con la ayuda de un vórtex).
5. Dispensar una gota del sedimento resuspendido sobre un portaobjetos para su examen microscópico directo: KOH, blanco de calcofluor (Capítulo 14).
6. Inocular el resto del sedimento en 2 tubos de SDA.
7. Incubar un tubo a 35 °C y otro a temperatura ambiente (30 días).
8. Vigilar los cultivos cada 48 h.
9. Si se detectase crecimiento fúngico, proceder a la identificación del microorganismo (Capítulos 11 y 13) y al estudio de su sensibilidad (Capítulos 15 y 16).

miento son similares, por lo que se recomienda seguir las indicaciones detalladas en las Tablas 6.8 y 6.9, teniendo siempre en cuenta que cuanto mayor sea el volumen extraído, mayor será la probabilidad de aislamiento de un patógeno fúngico.

En la actualidad, la causa más frecuente de peritonitis fúngica es la diálisis peritoneal ambulatoria siendo *Candida*, *Aspergillus* y *Fusarium* los agentes causales más habituales.

La patogenia de la artritis fúngica también está relacionada con la inoculación directa del ger-

Un consejo...

Como en toda peritonitis, el gran volumen de líquido ascítico presente en la cavidad abdominal aumenta la dilución del inóculo microbiano, por lo que la rentabilidad del cultivo convencional para el diagnóstico de la peritonitis fúngica es muy baja. Para aumentar la sensibilidad de la técnica se recomienda centrifugar 50 ml de líquido peritoneal, inocular el sedimento en dos frascos de hemocultivo y procesarlos como tales.

men (traumatismos previos, implantación de material protésico); *Candida*, *Sporothrix* y otros hongos dimórficos suelen ser los patógenos más frecuentemente aislados en el líquido articular.

gación para el procesado de esta muestra facilita la liberación de las levaduras fagocitadas, aumentando su recuperación en el medio de cultivo (Tabla 6.10).

6.5. Médula ósea

El aspirado de médula ósea, generalmente obtenido por punción esternal o de cresta ilíaca, es una de las mejores muestras para el diagnóstico de la histoplasmosis diseminada. El estadio levaduriforme

Tabla 6.10. Obtención y procesamiento de médula ósea.

1. Realizar la punción medular aplicando las máximas medidas de asepsia posibles.
2. Introducir el aspirado en un tubo Isolator 1.5 y enviar inmediatamente al laboratorio de Microbiología.
3. Dispensar una gota del contenido sobre un portaobjetos para su examen microscópico directo mediante tinción Giemsa (Capítulo 14).
4. Inocular el contenido del tubo Isolator 1.5 en un dos tubos de agar BHI.
5. Incubar un tubo a 35 °C y otro a temperatura ambiente (30 días).
6. Vigilar los cultivos cada 48 h.
7. Si se detectase crecimiento fúngico, proceder a la identificación del microorganismo (Capítulos 11 y 13) y al estudio de su sensibilidad (Capítulos 15 y 16).

me de *H. capsulatum* es eminentemente intracelular, por lo que la utilización del sistema de lisis-centrifugación

6.6. Tejidos

Cuando exista sospecha de infección localizada en uno o varios órganos, debe plantearse la idoneidad de realizar una biopsia de ese tejido afectado para su diagnóstico microbiológico. Sin embargo, en la mayoría de las micosis profundas, la situación clínica y hemostática del paciente contraindican este procedimiento; no obstante, siempre que sea posible, debe plantearse su obtención como una de las mejores vías de para intentar el aislamiento, identificación y posterior estudio de la sensibilidad del agente causal.

Las muestras de tejidos se obtienen mediante

Tabla 6.11. Obtención y procesamiento de muestras tisulares.

1. Realizar la biopsia aplicando las máximas medidas de asepsia.
2. Introducir el tejido biopsiado en un recipiente estéril con tapón de rosca y enviar inmediatamente al laboratorio de Microbiología.
3. Si la muestra es pequeña, añadir varias gotas de solución salina estéril para mantener la humedad.
4. Trocear la muestra en pequeños pedazos con la ayuda de un bisturí estéril.
5. Realizar varias improntas de la muestra sobre un portaobjetos para su examen microscópico directo: blanco de calcoflúor, KOH, tinción de plata metenamina (Capítulo 14).
6. Inocular la muestra troceada en dos tubos de SDA, sumergiendo ligeramente la misma en la superficie del agar.
7. Incubar un tubo a 35 °C y otro a temperatura ambiente (30 días).
8. Vigilar los cultivos cada 48 h.
9. Si se detectase crecimiento fúngico, proceder a la identificación del microorganismo (Capítulos 11 y 13) y al estudio de su sensibilidad (Capítulos 15 y 16).

Unos consejos...

- La homogenización o trituración de las muestras tisulares es perjudicial para las hifas de los zigomicetos y dificulta su crecimiento. Por lo tanto, si el presunto agente fúngico es desconocido o se sospecha la presencia de un zigomiceto, se debe cortar la muestra con bisturí estéril en piezas de 1 mm.
- Por el contrario, si se sospecha la presencia de *H. capsulatum*, la trituración previa de la muestra es el procedimiento aconsejado.

Referencias

cirugía, biopsia percutánea o

1. Reisner BS, Gail L, Woods RB *et al.* Specimen processing. En: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC (Eds.) Manual of Clinical Microbiology. Washington D.C., American Society for Microbiology Press, 1999: 85-89.
2. Reimer LG, Wilson G, Weinstein MP. Update on detection of bacteremia and fungemia. Clin Microbiol Rev 1997; 10: 444-465.
3. Fricker-Hidalgo H, Chazot F, Lebeau B, Pelloux H, Ambroise-Thomas P, Grillot R. Use of simulated blood cultures to compare a specific fungal medium with a standard microorganism medium for yeast detection. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1998; 17: 113-116.
4. Marcon MJ, Powell DA. Epidemiology, diagnosis and management of *Malassezia furfur* systemic infection. Diagn Microbiol Infect Dis 1987; 7: 161-175.

autopsia y, al igual que ocurre con los líquidos orgánicos, deben extremarse al máximo las normas para su procesamiento ya que constituyen una de las muestras más valiosas, por su difícil obtención, en un laboratorio de Microbiología Clínica (Tabla 6.11).

Pedro García-Martos
Juan Manuel Hernández-Molina

7.1. Fundamento

7.1.1. Vulvovaginitis

Es la forma más frecuente de infección genital en la mujer, especialmente durante el embarazo, fase premenstrual, diabéticas y usuarias de anticonceptivos orales o jabones vaginales de pH ácido. Es un proceso relativamente frecuente, muchas veces recurrente, que supone un 25-30% de las infecciones vaginales, en especial durante el embarazo. La infección se adquiere por transmisión sexual o a partir del reservorio fecal. El prurito, el eritema vulvovaginal y la leucorrea son las manifestaciones clínicas más notables. En su etiología predomina *Candida albicans*, seguida de *Candida glabrata* y, en menor proporción, otras especies.

7.1.2. Balanitis

Es la infección genital masculina más frecuente, sobre todo en varones no circuncidados. La superficie del glande, el prepucio e, incluso, el escroto y perineo presentan lesiones rojas vesiculosas, dolorosas, generalmente rodeadas de un pequeño halo inflamatorio y cubiertas por un depósito blanco y cremoso. El paciente refiere sensación de quemazón y prurito intenso. El proceso puede complicarse con uretritis y cistitis (aguda o crónica). *C. albicans* es el agente más común de esta infección, pero también se ha implicado a otras especies de levaduras.

7.1.3. Infección del tracto urinario

El tracto urinario, en su conjunto, no posee flora microbiana autóctona, excepto la porción dis-

tal de la uretra que puede ser colonizada por la flora normal de la piel. La infección del tracto urinario (ITU) se origina por vía ascendente a partir de la uretra o, en menor proporción, por vía hematógena. Las bacterias son responsables de la mayor parte de las ITU; las producidas por levaduras se deben, principalmente, a *C. albicans*, sobre todo en mujeres. En infecciones diseminadas, se pueden encontrar otros hongos levaduriformes, incluyendo a *Cryptococcus neoformans*; y, en países endémicos: *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis* o *Histoplasma capsulatum*; el hallazgo de *Aspergillus* en la orina es excepcional. La candiduria puede constituir, a veces, un factor predictivo de candidiasis sistémica; pero, habitualmente, es el resultado de la presencia de levaduras en el tracto genital o gastrointestinal. El hallazgo de levaduras diferentes a *C. albicans* se asocia más frecuentemente con candidemia. La candidiasis del tracto urinario es más común en las edades extremas de la vida, en diabéticos y en pacientes con trastornos del tracto urinario. En los últimos años ha experimentado un incremento significativo en pacientes hospitalizados, inmunodeprimidos o sometidos a cateterización vesical. Se relaciona con enfermedades graves, antibioterapia intensa o instrumentación vesicouretral. La presentación clínica es variada, pero es más frecuente la infección de vías altas (pielonefritis) y uretritis que la de vías bajas (cistitis).

Para confirmar la sospecha clínica de las infecciones fúngicas genitourinarias es imprescindible el estudio microbiológico que, además, permite orientar el tratamiento antimicrobiano. El diagnóstico clínico de la candidiasis vulvovaginal no suele presentar grandes dificultades, pero, debido a la frecuente falta de especificidad de los síntomas y signos exploratorios, el examen microscópico de las muestras y el cultivo micológico constituyen las actitudes diagnósticas más rentables; en la balanitis, el examen microscópico es el recurso diagnóstico más rápido. Las infecciones del tracto urinario se diagnostican habitualmente por la sintomatología, la presencia de leucocitos y microorganismos en el sedimento urinario y el cultivo microbiológico de la orina. La presencia de levaduras en la orina no siempre es indicativa de infección, pues depende de la concentración y de la especie implicada, teniendo en cuenta la facilidad con que la orina se puede contaminar en el acto de la micción. El análisis microbiológico debe suministrar, por tanto, información cuantitativa y cualitativa para poder valorar correctamente los resultados del mismo.

7.2. Recogida de muestras

Las técnicas de recogida de muestras genitourinarias varían según la localización de las mismas (Tabla 7.1).

7.2.1. Vulvovaginitis

Para la recogida del **exudado vaginal**, no debe practicarse higiene genital previa que pueda alterar las características de la flora. La toma de muestras vaginales debe hacerse ayudándose de un espéculo bivalvo estéril, sin utilizar lubricantes. Se toma la secreción de la mucosa de la pared posterior del canal vaginal, mediante escobillón o torunda de alginato, haciendo rotar el mismo por la zona de secreción más abundante. Es aconsejable obtener simultáneamente exudado de cérvix, así como tomar las muestras por duplicado o triplicado si se quieren investigar distintos patógenos; una de las muestras se introduce en solución salina para observación en fresco de *Trichomonas*.

Para la recogida del **exudado vulvar**, es conveniente lavar la superficie cutánea con solución salina estéril, antes de arrastrar el exudado con un escobillón o torunda. La obtención del **exudado anal** se efectúa de la misma manera que el vulvar.

7.2.2. Balanitis

Las muestras se toman de los bordes de las lesiones y del surco balanoprepucial mediante escobillón estéril y sin limpieza previa.

7.2.3. Uretritis

El exudado uretral se recoge por la mañana, o al menos después de 1-3 h sin vaciar la vejiga. Debe limpiarse la zona externa para evitar una posible contaminación, sobre todo en hombres no circuncidados, utilizando jabón neutro o solución salina. Si existe secreción abundante, se exprime la uretra, se desecha la primera gota que contiene flora saprofita y se toma el resto con escobillón fino, introducido 2 cm en el meato urinario; en caso de no existir secreción, se introduce el escobillón en la uretra después de realizar un masaje uretral.

7.2.4. Infección del tracto urinario

Las condiciones de obtención de la orina juegan un papel fundamental en la fiabilidad de los resultados del análisis microbiológico, puesto que la flora saprofita de la zona terminal de la uretra y de los genitales externos puede contaminar la orina en el momento de su emisión. Los diversos procedimientos de recogida de la orina están encaminados a evitar, en lo posible, la contaminación de origen extraurinario.

Micción directa o espontánea

Se recogen unos 20-25 ml de orina recién emitida en un frasco estéril, preferiblemente de boca ancha, siendo la parte media de la micción matinal

Tabla 7.1. Recomendaciones para la recogida adecuada de muestras genitourinarias.

Muestra	Procedimiento de recogida
Exudado vaginal	Espéculo + escobillón estéril (porción posterior) Espéculo + escobillón estéril
Exudado cervical	Escobillón estéril
Exudado vulvar	Escobillón estéril (previo lavado con solución salina)
Exudado anal	Escobillón estéril (previo lavado con solución salina)
Exudado balanoprepucial	Escobillón estéril
Exudado uretral	Escobillón fino estéril (1-3 h antes de la micción)
Orina (matinal)	Micción directa en frasco estéril (parte media) Cateterismo vesical Bolsa colectora (intercambio y lavado cada 30 min) Punción suprapúbica

la más representativa del estado de las vías urinarias y la más idónea para el cultivo. La primera parte de la micción se desecha porque contiene la flora de arrastre de la porción distal de la uretra; la parte final también, por su escaso contenido microbiano. Esta modalidad de recogida la realiza el propio paciente, quien debe efectuar una previa y concienzuda limpieza de sus genitales con agua y jabón. En el momento de la micción, los hombres deben retraer el prepucio y las mujeres separar los labios para evitar contaminaciones exógenas (Figura 7.1).

Cateterismo o sondaje vesical

El cateterismo vesical efectuado de manera aséptica, después de un lavado cuidadoso del meato uretral y de los genitales externos, es el procedimiento más adecuado para recoger orina cuando se sospecha una candidiasis urinaria, pero implica cierto peligro de sobreinfección de vías altas y producción de microtraumatismos que pueden acarrear complicaciones, especialmente en el hombre. Se recurre al sondaje ante la imposibilidad de obtener buenos resultados por los métodos directos, o cuando se pretende corroborar un diagnóstico (Figura 7.1). En pacientes con sonda permanente, la orina se toma por punción aséptica de la sonda, nunca de la bolsa de recogida.

Bolsa colectora

La orina de lactantes se recoge en una bolsa de plástico estéril dispuesta para tal fin, que se adosa directamente a los genitales, tras un lavado previo de los mismos y de la zona anal, manteniéndola hasta la micción (Figura 7.1). En el caso de que la micción no se produzca dentro de los 30 min siguientes a la colocación de la bolsa, debe sustituirse esta después de un nuevo lavado para evitar el sobrecrecimiento de la flora cutánea. La recogida se puede facilitar estimulando la micción mediante la ingesta de líquidos o por el reflejo de Pérez (golpeo de los músculos paraespinales, sosteniendo al niño

por el abdomen). Es conveniente comprobar la ausencia de restos fecales acompañantes. Las muestras obtenidas por este procedimiento no son de buena calidad para el diagnóstico de candiduria.

Punción o aspiración suprapúbica

Cuando la recogida de orina es dificultosa por otro procedimiento, puede realizarse una punción vesical, sobre todo en lactantes, pero es una técnica contraindicada en pacientes con problemas



Figura 7.1. Técnicas de recolección de orina: a: Micción directa; b: Sondaje vesical; c: Bolsa colectora; d: Punción suprapúbica.

de hemostasia. La vejiga se punciona directamente, después de aseo, antisepsia y anestesia local. Las complicaciones que puede presentar son leves y se traducen en hematuria y hematomas. En este tipo de muestra cualquier hallazgo microbiológico tiene indudable valor (Figura 7.1).

7.3. Transporte y conservación de las muestras

Tabla 7.2. Transporte y conservación de muestras genitourinarias.

Muestra	Transporte y conservación
Exudado vaginal	Medio de Amies o medio de Stuart (siembra inmediata)
Exudado cervical	Medio de Amies o medio de Stuart (siembra inmediata)
Exudado vulvar	No precisa condiciones de transporte (siembra rápida)
Exudado anal	No precisa condiciones de transporte (siembra rápida)
Exudado balanoprepucial	No precisa condiciones de transporte (siembra rápida)
Exudado uretral	Medio de Amies o medio de Stuart (siembra inmediata)
Orina	Siembra inmediata o rápida Refrigerar si se demora el cultivo (máximo 12 h)

En general, las muestras genitourinarias deben procesarse lo más rápidamente posible después de su recolección, pues el rápido crecimiento de las levaduras a temperatura ambiente puede dar lugar a una falsa interpretación en cuanto a su concentración en la muestra. Cada muestra exige unas condiciones diferentes, de acuerdo con su procedencia (Tabla 7.2).

Si el cultivo va a demorarse, las muestras vaginales y uretrales deben preservarse en un medio de transporte, pero no debe dilatarse su procesamiento. La utilización de medios de transporte, como el de Stuart o el de Amies, es fundamental para conservar viables algunos microorganismos patógenos en estas localizaciones, pero no tanto en el caso de las levaduras (Capítulo 3).

Las muestras de orina para investigación de hongos deben transportarse con rapidez al laborato-

rio y ser cultivadas antes de una hora de su recolección. Cuando se va a demorar el cultivo, las muestras deben mantenerse refrigeradas a 4 °C, para evitar el sobrecrecimiento de microorganismos, no más de 12 h. Las muestras de orina de 24 h son inaceptables, pues el tiempo prolongado puede modificar las condiciones físico-químicas de la orina e influir sobre la cantidad y calidad de la flora.

7.4. Examen directo

El examen microscópico directo permite obtener información respecto a la presencia de hongos y su abundancia, observar algunos detalles de su morfología y disposición, e incluso peculiaridades de conidiogénesis, además de precisar la citología del material observado. Este examen sirve de pauta para el uso de técnicas complementarias de cultivo y evita, muchas veces, incurrir en errores graves.

El examen microscópico debe realizarse en las **muestras genitales** una vez efectuado el cultivo, siempre que dispongamos de suficiente muestra, sirve de ayuda para el diagnóstico y como soporte para la posterior valoración del cultivo. En las **muestras urinarias**, se suele examinar el sedimento obtenido por centrifugación de la orina, pero también puede hacerse de la orina sin centrifugar.

7.4.1. Examen en fresco

En la candidiasis vulvovaginal, uretritis y balanitis, el examen en fresco se realiza suspendiendo parte del exudado en solución salina. Si se utiliza azul de lactofenol, en vez de solución salina, se pueden apreciar mejor las levaduras y elementos hifales. La adición de KOH al 10% solamente se aconseja en muestras con abundancia de células y restos celulares, con el fin de eliminar interferencias y resaltar las estructuras fúngicas. Actualmente, también se recurre a las preparaciones con colorantes fluorescentes, especialmente blanco de calcoflúor, que facilitan la detección y diferenciación de las estructuras fúngicas cuando se examinan en un microscopio de fluorescencia (Capítulo 14).

El examen microscópico de la orina se realiza, generalmente, a partir del sedimento obtenido por centrifugación a 1.500-2.000 rpm de unos 10 ml

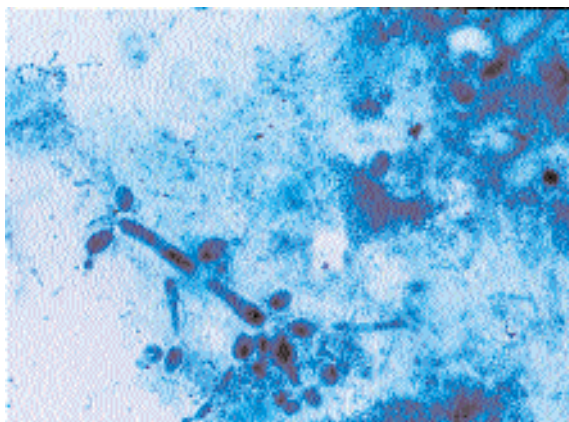


Figura 7.2. Azul de lactofenol. Observación de levaduras en el sedimento urinario (x1.000).

de orina, previamente homogeneizada, durante 5-10 min. El examen en fresco del sedimento urinario permite apreciar sus componentes celulares (hematíes, leucocitos, células epiteliales) así como la presencia de cristales, sales amorfas, cilindros y microorganismos. Las levaduras muestran su típica forma ovoide y pueden exhibir blastoconidias y estructuras hifales (Figura 7.2).

7.4.2. Tinciones

Las técnicas de coloración son imprescindibles para el estudio microscópico de las muestras genitourinarias, pues permiten observar con gran detalle la morfología celular. En la candiduria, no tiene interés la tinción del sedimento urinario; es más rentable examinar una gota de orina sin centrifugar, coloreada mediante tinción de Gram o simplemente con azul de metileno. La detección de una sola levadura por campo (x100) puede ser sugestiva de candiduria, especialmente en infecciones diseminadas. En caso de positividad, puede ser conveniente la tinción del sedimento urinario para apreciar la concentración y características microscópicas de las células.

7.5. Cultivo

El cultivo de las muestras genitourinarias es imprescindible para aislar e identificar los hongos

responsables de infección y diferenciar los que pudieran confundirse morfológicamente por observación microscópica directa. Los medios de cultivo indicados para estas muestras son medios sólidos selectivos para el aislamiento de levaduras, sobre todo agar de Sabouraud suplementado con antibióticos (SDAC). También es de gran utilidad para las muestras genitourinarias el empleo de un medio cromogénico, como el CHROMagar Candida. Diversos estudios han demostrado la utilidad de este medio en el aislamiento primario y diferenciación de levaduras en la candidiasis vulvovaginal, unido al agar de Sabouraud o bien como medio único. Otros medios con sustratos fluorogénicos (Fluoroplate Candida, SDCA-MUAG agar) y cromogénicos (Albicans ID, Candiselect, Candichrom) orientados a la detección de la enzima β -galactosaminidasa, han supuesto un avance importante para la identificación presuntiva de *C. albicans* en los cultivos primarios de muestras vaginales, pero no pueden equipararse al medio CHROMagar Candida que diferencia, además, otras especies (Capítulo 3).

En la **candidiasis vaginal y uretritis**, el cultivo se realiza a partir del escobillón que contiene la muestra, sembrando directamente o tras dilución en 0,5 ml de agua destilada estéril. Se efectúa la descarga de la muestra en un extremo de la placa y se estria el resto con asa.

En la **balanitis**, el cultivo rutinario se realiza utilizando exclusivamente agar de Sabouraud con cloranfenicol o gentamicina para el aislamiento selectivo de levaduras.

El urocultivo convencional sigue constituyendo el método idóneo para el estudio de la **infección del tracto urinario**, permitiendo diferenciar cualitativa y cuantitativamente una contaminación microbiana accidental de una candiduria significativa. En caso de investigar específicamente una candiduria, se adiciona una placa de SDAC o de un medio cromogénico que permita la identificación presuntiva de las colonias. Para facilitar el recuento de colonias, la orina previamente homogeneizada se siembra con un asa calibrada de 0,01 ml (10 μ l) ó 0,001 ml (1 μ l) de capacidad, o bien, cuando se sospecha una candiduria intensa, se parte de diluciones de la orina en solución salina estéril (1/10, 1/100), las cuales se inoculan a razón de 0,1 ml por placa.

Los sistemas comerciales para el *screening* de orina que emplean una lengüeta, con los lados recubiertos por diferentes medios de cultivo, no deben utilizarse para la investigación de candiduria.

7.6. Incubación

Después de la inoculación de las muestras en los medios de cultivo, las placas deben incubarse lo más pronto posible, pues el retraso limita la capacidad de crecimiento de algunos microorganismos lábiles y favorece el desarrollo de contaminantes. Aunque la mayoría de las levaduras crecen óptimamente a temperatura ambiente (25-30 °C), los cultivos de muestras genitourinarias se incuban, habitualmente, en estufa a 35-37 °C, en atmósfera aerobia y durante 18-24 h, antes de proceder al examen de las colonias. La incubación se puede prolongar hasta 48 h para asegurar un cultivo negativo, manteniendo los medios micológicos a temperatura ambiente durante esta segunda incubación. No procede alargar más la incubación ya que las levaduras crecen habitualmente bien a las 48 h, tanto en los medios generales como en los específicos.

7.7. Lectura e interpretación

7.7.1. Examen microscópico

La observación directa de levaduras en muestras vaginales y de cérvix tiene un valor cuestionable, pues pueden ser parte de la flora comensal; sin embargo, la presencia de leucocitos polimorfonucleares es un dato sugestivo de infección. La tinción de Gram mejora bastante la observación en fresco, pues pueden distinguirse más fácilmente las células levaduriformes, como grampositivas y con su típica forma ovoide, así como la formación de blastoconidias, artroconidias, hifas y pseudohifas. En la candidiasis vaginal, la microscopía presenta, en general, una baja sensibilidad, a veces inferior al 50%, por lo que siempre debe ir unida al cultivo (Figuras 7.3 y 7.4).

El examen en fresco o por tinción del exudado balanoprepucial ofrece muy buena rentabilidad cuando se detecta la presencia de levaduras, pues se relaciona casi siempre con infección activa.

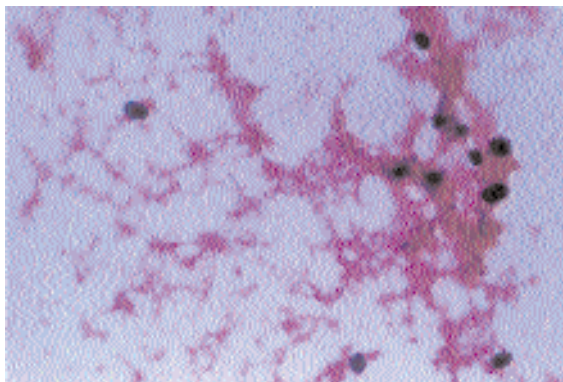


Figura 7.3. Tinción de Gram. Células levaduriformes (x1.000).

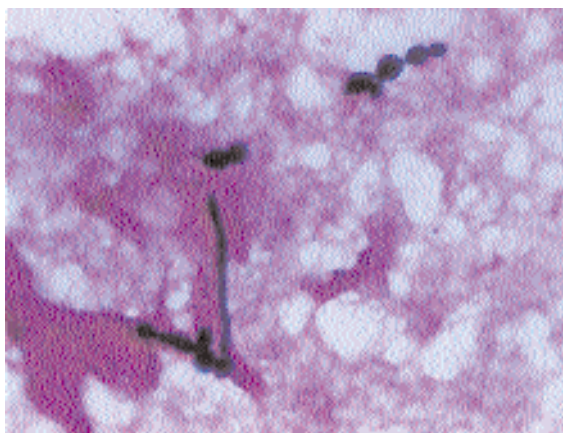


Figura 7.4. Tinción de Gram. Levaduras, elementos hifales y blastoconidias (x1.000).

En el examen en fresco del sedimento urinario, la leucocituria es un dato útil para afianzar una sospecha de infección pero debe ser interpretada con precaución. Aunque la mayoría de las infecciones del tracto urinario se acompañan de más de diez leucocitos por campo (x400), este dato representa un índice menos sensible que la cuantificación de la flora mediante cultivo. La observación microscópica de levaduras no constatada por cultivo es también muy discutible, debido, sobre todo, a la posibilidad de contaminación de la orina por una mala recogida o procesamiento inadecuado.

Para la detección de candiduria, se pueden utilizar otras técnicas, aparte del examen microscópico del sedimento urinario y el cultivo, pero todas tienen en común cierta falta de sensibilidad y especificidad. La detección de esterasa leucocitaria mediante tiras reactivas parece ser de utilidad para

predecir una posible bacteriuria, pero no tiene el mismo valor en el caso de una candiduria. Los sistemas automatizados que detectan el crecimiento microbiano por espectrofotometría y los que consiguen el mismo fin a partir de la detección de ATP por bioluminiscencia poseen buena sensibilidad y especificidad para las infecciones bacterianas pero no tanto para las fúngicas, aparte de que son lentos y obligan a conservar las muestras refrigeradas durante el tiempo que dura el proceso, lo cual, en principio, no aporta grandes ventajas.

7.7.2. Cultivo

En vulvovaginitis y uretritis, la positividad de un cultivo para levaduras ha de valorarse de acuerdo con las características de los pacientes y su situación clínica, pues las levaduras forman parte de la flora comensal en estas localizaciones y su aislamiento puede tener un significado clínico cuestionable.

En la balanitis, es posible la obtención de un cultivo negativo cuando las lesiones son mínimas, lo cual sugiere un proceso tóxico o alérgico, no infeccioso.

En la candiduria, es preciso realizar el recuento de las colonias crecidas, de acuerdo con el volumen de orina sembrado, para calcular el número de colonias por mililitro (expresado en UFC/ml). El número de colonias y la identificación de las especies implicadas, permiten establecer el significado clínico de la candiduria.

En los medios de cultivo bacterianos, las colonias de levaduras son pequeñas, blanquecinas, pudiéndose confundir con las colonias bacterianas, por lo que es necesaria la observación microscópica para su diferenciación (Figuras 7.5 y 7.6).

En agar Sabouraud, las colonias de levaduras tienen apariencia cremosa, pueden ser lisas o rugosas, de color blanco y raramente pigmentadas (Figura 7.7). Una vez comprobado el crecimiento de levaduras, debe procederse a la identificación de la especie causal (Capítulo 11).

En la infección fúngica del tracto urinario, el valor del recuento de colonias en la orina no está

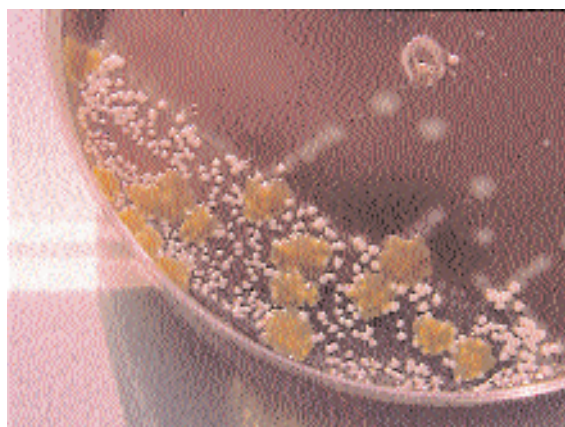


Figura 7.5. Agar sangre. Colonias de levaduras en cultivo mixto con estreptococos y pseudomonas.

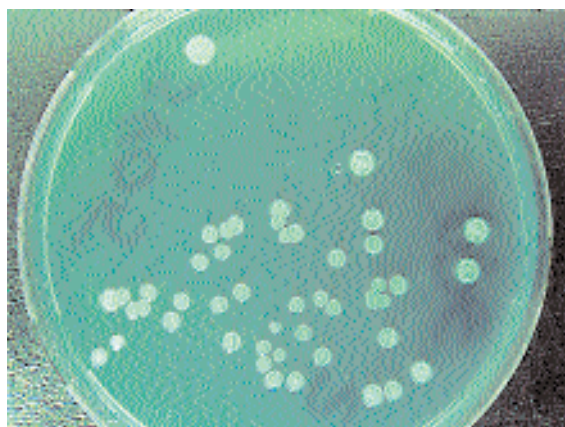


Figura 7.6. Medio CLED. Cultivo de orina con unas 5.000 UFC/ml.

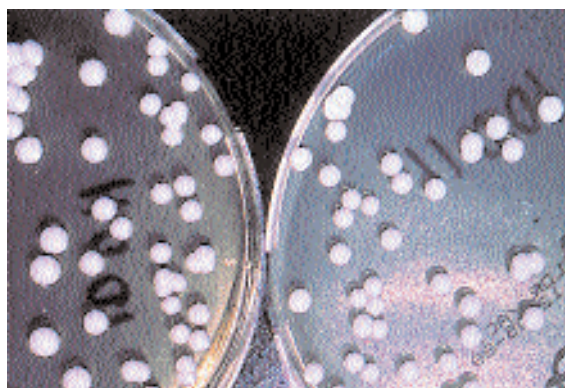


Figura 7.7. Agar de Sabouraud. Cultivos de orina con levaduras.

Tabla 7.3. Interpretación de la presencia de levaduras en un cultivo de orina.

Recuento de colonias (UFC/ml)	Características del cultivo	Método de recolección	Interpretación clínica
0	Cultivo puro	Cualquiera	Ausencia de infección
< 1.000		Micción directa	Ausencia de infección
		Cateterismo	Ausencia de infección
		Punción suprapúbica	Infección
1.000 - 10.000	Cultivo puro	Cualquiera	Posible infección
	Cultivo mixto	Micción directa	Contaminación
		Cateterismo	Repetir cultivo
> 10.000	Cultivo puro	Cualquiera	Infección
	Cultivo mixto		Repetir cultivo

bien establecido. Se acepta, en general, que un recuento de más de 10.000 UFC/ml es indicativo de infección urinaria o consecuencia de una candidiasis diseminada y que un recuento de colonias inferior a esta cifra suele ser producto de contaminación del tracto urinario inferior, no siendo significativo de infección. Sin embargo, algunos autores sugieren que ha de valorarse cualquier recuento de levaduras en orina como anormal y efectuar nuevos cultivos antes de descartar una infección. En todo caso, es importante valorar un cultivo positivo de acuerdo con las características de cada paciente. En general, ante un cultivo positivo de orina podemos considerar las siguientes situaciones (Tabla 7.3):

1. **Candiduria inferior a 1.000 UFC/ml:** se corresponde, generalmente, con ausencia de infección fúngica del tracto urinario, excepto si la orina se ha obtenido mediante punción suprapúbica.
2. **Candiduria entre 1.000 y 10.000 UFC/ml:** se considera de dudoso significado clínico y puede ser el resultado una simple contaminación en el acto de la micción, sobre todo si el cultivo contiene flora mixta. Pero no debe olvidarse, sin embargo, que todas las infecciones atraviesan este estado al iniciarse o al retroceder en intensidad, por lo que algunos autores consideran como indicativa de infección activa una candiduria superior a 1.000 UFC/ml. En ciertos pacientes (niños, diabéticos, cateterizados) un recuento bajo puede ser valorable, aunque conviene confirmar el resultado del cultivo con el estudio de otra muestra.
3. **Candiduria entre 10.000 y 50.000 UFC/ml:**

sugiere la existencia de infección del tracto urinario. La presencia de leucocitos en el sedimento urinario y la sintomatología del paciente pueden ayudar a valorar la candiduria. En caso de cultivo mixto de levaduras o cultivo asociado a bacterias, debe pensarse en una posible contaminación.

4. **Candiduria superior a 50.000 UFC/ml:** es indicativa de infección. Las infecciones mixtas son raras y, generalmente, resultado de una mala recogida de la muestra, salvo en pacientes con catéteres permanentes o anomalías anatómicas.

7.8. Validación e informes

Los estudios de sensibilidad a los antifúngicos no deben realizarse de forma rutinaria en las levaduras aisladas de muestras genitourinarias. Se reservan para las infecciones causadas por especies de *Candida* diferentes a *C. albicans* cuyo patrón de sensibilidad no esté bien establecido y para aquellas especies que suelen presentar resistencia a algunos antifúngicos de uso habitual. En las candidiasis recurrentes, en las infecciones urinarias complicadas y en las infecciones diseminadas, es muy importante efectuar una identificación correcta del agente causal y realizar estudios de sensibilidad para confirmar el tratamiento más adecuado.

El informe microbiológico debe contemplar la identificación de la(s) especie(s) de levaduras que se considere(n) responsable(s) de infección.

En las **muestras vaginales y uretrales**, si no se dispone de información clínica, la valoración del tratamiento dependerá únicamente de los hallazgos microbiológicos, por lo que es importante que el

Referencias

1. Ayeni O, Riederer KM, Wilson FM, Khatib R. Clinicians' reaction to positive urine culture for *Candida* organisms. *Mycoses* 1999; 42: 285-289.
2. Freydiere AM, Buchaille L, Gille Y. Comparison of three commercial media for direct identification and discrimination of *Candida* species in clinical specimens. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1997; 16: 464-467.
3. Freydiere AM, Guinet R. Rapid methods for identification of the most frequent clinical yeasts. *Rev Iberoam Micol* 1997; 14: 85-89.
4. García Martos P, Fernández del Barrio MT, Paredes Salido F. *Microbiología clínica aplicada*. 3ª ed. Madrid, Díaz de Santos, 1996.
5. González-Pedraza Avilés A, Ortiz Zaragoza C, Inzunza Montiel AE, Ponce-Rosas ER. Candidiasis vaginal: diagnóstico y tratamiento en el primer nivel de atención médica. *Atención Primaria* 1998; 21: 395-398.
6. Koneman EW, Roberts GD. *Micología práctica de laboratorio*. 3ª ed. Buenos Aires, Panamericana, 1987.
7. Isenberg HD. *Clinical microbiology procedures handbook*. Washington D.C., American Society for Microbiology Press, 1992.
8. Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH. *Manual of Clinical Microbiology*. 6th ed. Washington D.C., American Society for Microbiology Press, 1995.
9. Rippon JW. *Medical Micrology*. 3rd ed. Philadelphia, WB Saunders, 1991.
10. Stark RP, Maki DG. Bacteriuria in the catheterized patient. What quantitative level of bacteriuria is relevant? *N Engl J Med* 1984; 311: 560-564.

Guillermo Quindós
Rocío Alonso Vargas
María Teresa Ruesga Alonso

8.1. Fundamento

8.1.1. Micosis de la cavidad oral

Las micosis de la cavidad oral son frecuentes y habitualmente de carácter leve o moderado. La mayoría están producidas por *Candida albicans* y, en menor medida, por otras especies de *Candida* (Tabla 8.1). Se observan especialmente en pacientes portadores de prótesis o con inmunodeficiencias, considerándose que cuatro de cada mil pacientes que acuden a una consulta dental general presentan síntomas de infección oral candidiásica [1,2].

La mayor parte de las candidiasis orales son asintomáticas y más frecuentes en lactantes, ancianos y personas con factores predisponentes generales o locales. La infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) es un importante factor predisponente y, en personas con sida, estas lesiones pueden ser indicadoras de la evolución de la enfermedad.

Candidiasis pseudomembranosa aguda (muguet)

Es frecuente en niños y ancianos y puede observarse también en personas que son tratadas con corticoides en aerosol por procesos asmáticos u obstructivos pulmonares crónicos. Se caracteriza por la presencia de grumos o placas blancas o blanco-amarillentas (masas de hifas, levaduras y restos celulares) que tienden a confluir y asientan sobre una mucosa enrojecida (Figura 8.1).

Candidiasis eritematosa aguda

Es una complicación común del tratamiento con antibacterianos de amplio espectro. Se presenta como un área rojiza, sin grumos o placas, en el dorso de la lengua y el paladar (imagen clásica “en espejo”). Cuando la lengua está afectada, el dorso está depapilado, brillante y liso. El paciente se queja de dolorimiento o quemazón, tolera mal los alimentos sólidos y el consumo de líquidos causa dolor. Esta forma de candidiasis es la más común en los pacientes infectados por el VIH.

Candidiasis hiperplásica

Se confunde con los términos leucoplasia candidiásica y candidiasis nodular. Es la forma menos frecuente y se presenta como una lesión asintomática en placas o pequeños nódulos blancos adheridos firmemente a un área eritematosa, en las zonas retrocomisurales y, con menor frecuencia, en la lengua.

Queilitis angular (boqueras)

Se caracteriza por la aparición de eritema, grietas o fisuras en las comisuras labiales. Intervienen diferentes factores que van desde anomalías relacionadas con el envejecimiento (aparición de arrugas y pérdida de la dimensión vertical de la boca), humedad, defectos protéticos, etc. Lo habitual es que esté asociada a otras formas de candidiasis oral. En muchas ocasiones se trata de una infección mixta por estafilococos y *Candida*, con múltiples cofactores locales y sistémicos. En los pacientes con infección por VIH, la queilitis angular

Tabla 8.1. Principales especies fúngicas aisladas de muestras orales y otorrinolaringológicas.

a) Micosis orales

Comunes: *Candida albicans*

Menos comunes: *Candida dubliniensis*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*

Raras: *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Aspergillus fumigatus*

b) Otomicosis

Comunes: *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Candida parapsilosis*, *Candida albicans*, *Aspergillus flavus*

Poco habituales: *Candida guilliermondii*, *Candida krusei*, *Candida glabrata* y otras especies de *Candida*, *Exophiala castellanii*, *Exophiala jeanselmei*, *Fusarium solani* y otras especies de *Fusarium*, *Geotrichum candidum*, *Mucor* spp., *Scedosporium apiospermum*

c) Rinosinusitis fúngica

Comunes: *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*

Poco habituales: *Alternaria* spp., *Bipolaris* spp., *Fusarium* spp., *Mucor* spp., *Rhizopus* spp.

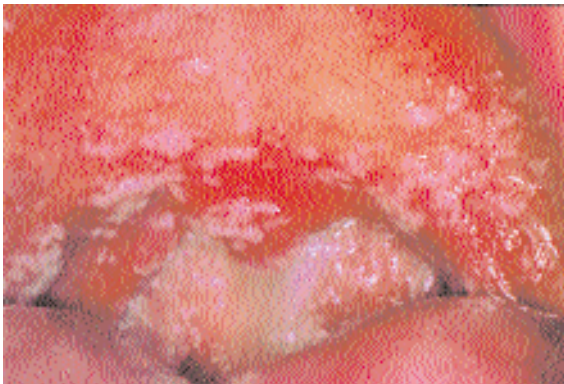


Figura 8.1. Candidiasis pseudomembranosa (Cortesía del Profesor Dr. José Manuel Aguirre Urizar, Departamento de Estomatología, Universidad del País Vasco, Bilbao).

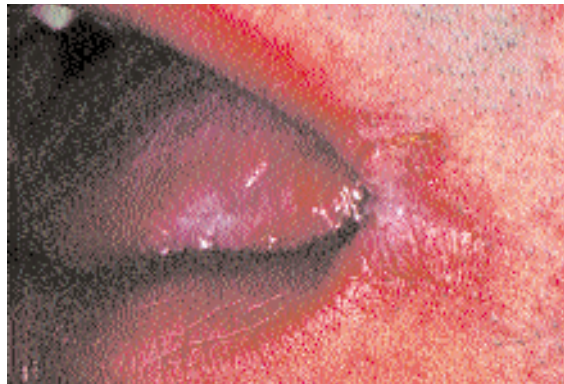


Figura 8.2. Queilitis angular (Cortesía del Profesor Dr. José Manuel Aguirre Urizar).

suele ser crónica (Figura 8.2).

Glositis rómbica

Es una lesión crónica no dolorosa que aparece como una depapilación en la región media del dorso lingual favorecida por una menor vascularización de esta zona central de la lengua. Es un proceso relativamente frecuente que afecta, aproximadamente, al 1% de la población; sobre todo, a varones fumadores y diabéticos.

Estomatitis protética

Es la forma más común de candidiasis oral (~ 70% de los portadores de prótesis), siendo más frecuente en las mujeres. Es habitualmente asintomática y se caracteriza por la presencia de una inflamación y enrojecimiento del área de soporte de una prótesis removible (preferentemente, superior palatina). Su etiopatogenia es multifactorial e incluye factores protéticos, higiénicos, microbiológicos, dietéticos y sistémicos (Figura 8.3).

Otras micosis

La histoplasmosis, blastomicosis, criptococosis, aspergilosis, etc. afectan con menor frecuencia a la cavidad bucal (habitualmente después de una primoinfección pulmonar). Las manifestaciones orales son más frecuentes en la histoplasmosis (*Histoplasma capsulatum* variedad *capsulatum*) y paracoccidioidomicosis (*Paracoccidioides brasiliensis*) y, mucho menos, en coccidioidomicosis (*Coccidioides immitis*) y blastomicosis (*Blastomyces dermatitidis*) [3,4].

Las lesiones orales en la **histoplasmosis** aparecen durante la llamada histoplasmosis generalizada crónica. Se puede observar macroglosia,

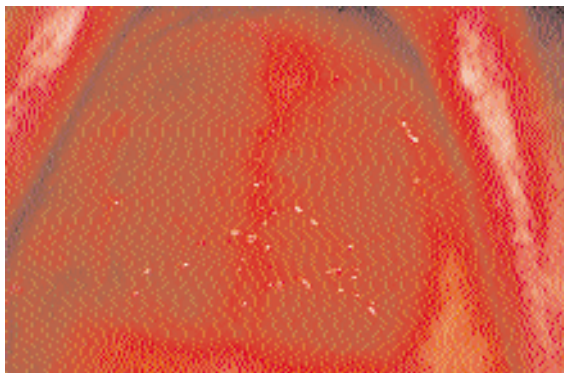


Figura 8.3. Estomatitis protética -candidiasis eritematosa- (Cortesía del Profesor Dr. José Manuel Aguirre Urizar).

macroqueilitis (principalmente en labio inferior), zonas erosivas y hemorrágicas gingivales, y lesiones necrobióticas y vegetativas, principalmente en paladar y lengua. También pueden observarse lesiones blanquecinas semejantes a las de las candidiasis y lesiones ulcerativas linguales. En la forma crónica tipo adulto de la **paracoccidioidomicosis** se puede observar una estomatitis moriforme, con periodontitis dolorosa y granulomas apicales y con una mucosa gingival con pequeñas vegetaciones y elementos vascularizados que sangran fácilmente. En la región palatina pueden producirse lesiones ulceradas y vegetativas que obligan a un diagnóstico diferencial con las lesiones neoplásicas. En algunos pacientes también se produce macroglosia, macroquelias y bloqueos linfáticos regionales. Estas formas progresivas de histoplasmosis y paracoccidioidomicosis se observan más frecuentemente en personas infectadas por el VIH que residen en zonas endémicas (América). En el caso de la histoplasmosis, también pueden encontrarse casos esporádicos en África y Asia. Se han descrito algunos casos clínicos en España y Europa en enfermos con estancia o resi-

dencia previa en zonas endémicas de infección por el VIH.

La **criptococosis** bucal se observa casi de manera exclusiva en pacientes con sida o linfoma y se caracteriza por la aparición de lesiones nodulares, vegetativas o ulceradas, de color rojo-violáceo, que tienen tendencia a necrosarse en personas inmunodeprimidas. Estas lesiones pueden ser primarias o habitualmente secundarias a infecciones meningoencefálicas o criptococemias.

Las lesiones bucales por otros hongos son mucho menos frecuentes, con la excepción de las **micormicosis** que pueden comenzar con lesiones en paladar (eritematosas, vegetantes y ulcerativas) que se van extendiendo por contigüidad, con gran destrucción tisular, a senos paranasales, órbita ocular, cráneo y cerebro, con alta mortalidad (micormicosis rinocerebral) [3,4]. Estas micosis se observan en pacientes con diabetes mellitus mal controlada y en enfermos en tratamiento con desferroxamina. El agente más frecuentemente aislado es *Rhizopus arrhizus*.

8.1.2. Micosis otorrinolaringológicas

Sinusitis

Habitualmente es una infección de etiología bacteriana o vírica y el papel que desempeñan los hongos en su etiología es poco importante, aunque en los últimos años han aumentado las sinusitis fúngicas [4]. Las sinusitis fúngicas invasoras se observan principalmente en pacientes inmunodeprimidos y se caracterizan por su rápida evolución y las dramáticas situaciones que plantean ya que pueden observarse casos de sinusitis fulminantes. Los síntomas iniciales suelen ser inespecíficos y las especies que predominan son *Aspergillus fumigatus* y *Aspergillus flavus* (Tabla 8.1).

Otomicosis

Representa el 15-20% de los casos de otitis externa. En la gran mayoría de los casos, el hongo es un invasor secundario a alteraciones o lesiones cutáneas del conducto auditivo externo: eccema, psoriasis, dermatitis seborreica, traumatismos, infección bacteriana, tratamiento antibacteriano o acumulación importante de cerumen. Los hongos implicados con más frecuencia son *Aspergillus niger*, *A. fumigatus*, *A. flavus*, *Candida parapsilosis* y *C. albicans* [5-7]. Otras especies fúngicas son poco significativas (Tabla 8.1). Las otomicosis **no invasoras** suelen ser asintomáticas o cursar con inflamación importante, otalgia moderada y secreción serosa. Las formas crónicas se caracterizan por

prurito, exudación inodora, incolora o amarillenta y descamación. Cuando el agente etiológico de la otomicosis es *Candida* spp., se observa la presencia de un epitelio húmedo e inflamado, con pequeños agregados blanquecinos que se adhieren al epitelio y la presencia de un exudado seroso inodoro. Las otomicosis **invasoras** cursan con inflamación del meato auditivo, otalgia severa y otorrea. *Aspergillus* es el género más frecuentemente implicado. En estas infecciones puede aparecer celulitis progresiva, condritis y osteomielitis en el conducto auditivo y base del cráneo. Estas alteraciones pueden implicar una paresia o parálisis del VII par craneal (nervio facial). La diabetes es la enfermedad subyacente del paciente en el 90% de los casos aunque también se han descrito estas otomicosis en enfermos con sida.

Tanto en las rinosinusitis como en las otitis invasoras, el diagnóstico radiológico (radiografía simple, TAC o resonancia magnética) juega un papel muy importante para evaluar el grado de invasión y destrucción tisular. El diagnóstico de certeza se realiza con una combinación de métodos histológicos y microbiológicos.

8.2. Recogida transporte y conservación de muestras

8.2.1. Recogida

Siempre que sea posible, se obtendrán las muestras antes de administrar fármacos antifúngicos.

Cavidad oral

Iría precedida de un enjuague con agua o solución salina. Las lesiones pseudomembranosas y las secreciones se recogen con una torunda o hisopo de algodón estéril.

Muestras rinosinusales

Se obtienen con torunda de diferente tamaño según la muestra deba tomarse de coanas, *cavum* o mucosa nasofaríngea, mediante aspiración o durante una intervención quirúrgica. Son muestras clínicas útiles tanto los exudados nasales, si los hay, como el contenido y el tejido de los senos afectados.

Muestras óticas

Debe efectuarse bajo visión directa con biomicroscopio y el material se extrae con una cucharilla o cureta para su estudio micológico. También pueden emplearse hisopos humedecidos en solución salina o medio de transporte, pero los resultados suelen ser menos satisfactorios. En este caso, el hisopo utilizado debe ser adecuado y suficientemente estrecho para pasar fácilmente por el conducto auditivo.

Biopsias o piezas quirúrgicas

Son de gran interés y utilidad en otitis y rinosinusitis invasoras y deben ser obtenidas de forma aséptica por métodos quirúrgicos [8-12]. Se deben obtener dos muestras o dividir en dos porciones la única muestra obtenida. Una de las muestras (para el estudio micológico) debe colocarse en un tubo o recipiente vacío o que contenga solución salina estéril para poder realizar las improntas y cultivos. La otra muestra se recoge en un recipiente con formol al 10% en solución salina tamponada (o PBS) para su posterior procesamiento y estudio anatomopatológico.

8.2.2. Transporte

Todas las muestras clínicas deben ser enviadas al laboratorio para ser procesadas lo antes posible (en menos de 2 h). Las torundas o hisopos de algodón se introducen en un medio de transporte para microorganismos aerobios (medio de Stuart modificado, Amies o similar). Las muestras recogidas mediante enjuague o lavado oral se transportan en un envase estéril. Estas muestras no necesitan ser refrigeradas para su transporte ya que la temperatura ambiente no va a afectar a la supervivencia de los hongos presentes en ellas.

Las muestras de biopsia deben transportarse, siempre que sea posible, en medio líquido, de lo contrario puede utilizarse un envase estéril o, en su defecto, gasas estériles empapadas en solución salina. En caso de que no se puedan transportar las muestras inmediatamente al laboratorio se deben mantener refrigeradas (4 °C) y no permitir que se alteren los tejidos por deshidratación (nunca deben transcurrir más de 24 h).

8.2.3. Conservación

Lo ideal es que todas las muestras clínicas sean procesadas lo antes posible una vez recibidas en el laboratorio [8-12]. De no ser posible, deben

conservarse a 3-6 °C hasta media hora antes de su procesamiento para observación directa al microscopio, tinción con Gram, PAS o colorantes fluorescentes y, también, para realizar el cultivo en un medio apropiado. El tiempo que se pueden mantener las muestras orales y otorrinolaringológicas refrigeradas es difícil de establecer, pero éste no debería sobrepasar las 48 h.

8.3. Examen directo

El examen microscópico directo de las muestras clínicas es un procedimiento diagnóstico de valor inestimable porque permite realizar con frecuencia un diagnóstico presuntivo (en ocasiones, definitivo) antes de que el crecimiento fúngico se observe en el cultivo. Además, la observación de células fúngicas sirve para establecer un criterio sobre la relación entre el hongo y la afección que se está produciendo.

La observación microscópica la podemos realizar en tres tipos de preparaciones [10,13,14]:

- en fresco, habitualmente utilizando un líquido de aclarado (KOH, NaOH), colorantes (tinta, azul de metileno, fucsina...), blanco de calcoflúor o similares (blankophor, Univitex);
- en frotis o improntas, teñidos con Gram, Giemsa, PAS;
- en tinciones histológicas con hematoxilina-eosina, PAS o plata metenamina de Gomori-Grocott (aunque la histopatología puede ofrecer un diagnóstico confirmatorio relativamente rápido, no siempre está indicada una toma biopsica o esta es posible).

La observación microscópica se puede hacer en fresco si la muestra es relativamente líquida, pero estas preparaciones en fresco son efímeras y no permiten exámenes prolongados. El empleo de colorantes nucleares como el azul de metileno o la fucsina puede tener utilidad, pero se facilita mucho más la observación microscópica si se añade sobre el portaobjetos una gota de un líquido de aclarado (solución salina o agua destilada con KOH o NaOH al 15-30%, lactofenol con azul de algodón o similares), se aplica un ligero calentamiento (cuando el material es más opaco o hay presencia importante de células) y se cubre con un cubreobjetos la preparación (Capítulo 14).

Si empleamos el blanco de calcoflúor, las levaduras, hifas y pseudohifas adquieren una fluorescencia blanco azulada o amarillo verdosa, según el filtro utilizado (Figura 8.4), resaltando nítidamente sobre el fondo más oscuro.

Con las muestras obtenidas también se puede realizar frotis o improntas. Estas preparaciones son más duraderas y permiten realizar lecturas posterior-



Figura 8.4. Blastosporas y tubos germinales de *Candida albicans* teñidos con blanco de calcoflúor, x1.000 (Cortesía de la Dra. Rosario San Millán, Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología, Universidad del País Vasco, Bilbao).

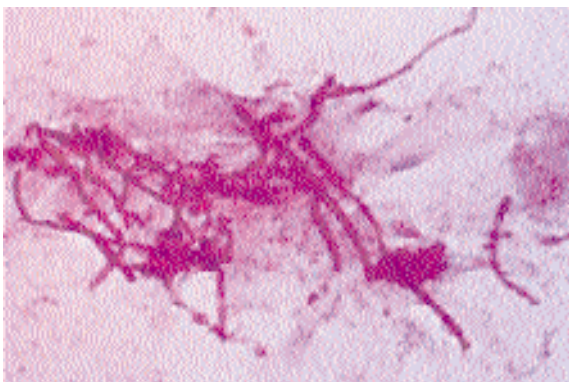


Figura 8.5. Hifas y blastosporas de *Candida albicans* en frotis oral (Tinción de PAS, x400) (Cortesía del Profesor Dr. José Manuel Aguirre Urizar).

res para confirmar o desechar anteriores conclusiones. Una tinción rápida de los frotis, como la de Gram, puede facilitar la visión de las levaduras y pseudomicelios de *Candida* o las estructuras de los hongos filamentosos que se tiñen de color violeta o azul oscuro intenso. También se puede utilizar una tinción de Giemsa (de utilidad más limitada) o de PAS que permite apreciar mejor las estructuras fúngicas (Figura 8.5) (Capítulo 14).

En caso de recibir en el laboratorio muestras de biopsia, una de las muestras (la recogida en formol-solución salina tamponada) será incluida posteriormente en parafina para efectuar cortes histológicos y realizar tinciones de hematoxilina-eosina, PAS o plata metenamina de Gomori-Grocott (Capítulo 14) [10,15,16].

8.4. Siembra, incubación e interpretación de los cultivos

8.4.1. Siembra

De la adecuada elección del recipiente para el medio de cultivo dependerá muchas veces el éxito del aislamiento. La utilización de placas con agar es más cómoda, permite disponer de una mayor superficie para la siembra y la manipulación de las muestras, se airea mejor y las colonias crecen más separadas, facilitando su posterior procesamiento. Sin embargo, la posibilidad de contaminación con esporas ambientales es mayor y, desde el punto de vista de la bioseguridad, son más peligrosas. El empleo de tubos dificulta la contaminación ambiental y del personal cuando crecen hongos filamentosos, pero hace más laborioso y lento el trabajo complicando la separación y diferenciación de las colonias. En cualquier caso, deben ser tubos o frascos con tapón de rosca y de boca relativamente ancha para facilitar la siembra (2 cm) [8,10,12,17].

La torunda de algodón y las muestras líquidas se siembran en césped o por agotamiento, dependiendo de la cantidad y de la potencial celularidad fúngica presente en la muestra, en placas con medios de cultivo que contengan antibióticos antibacterianos, como las placas de agar glucosado de Sabouraud con cloranfenicol o gentamicina o el agar con infusión de cerebro-corazón que permite el crecimiento selectivo de los hongos (Tabla 8.2) (Capítulo 3).

Los medios con cicloheximida (o actidiona) pueden ser muy útiles en el cultivo de muestras orales pero debe tenerse en cuenta que inhiben, además de a los hongos contaminantes, a un número importante de cepas de hongos patógenos como *Cryptococcus*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Scedosporium*, *Candida tropicalis* y *Candida krusei* [4,8,10,12]. Los medios con cicloheximida no se deben emplear para cultivar las muestras otorrinolaringológicas debido a que en la etiología de estas micosis predominan los hongos filamentosos, principalmente *Aspergillus* y zigomicetos, que pueden ser inhibidos por este antibiótico.

Tabla 8.2. Medios de cultivo apropiados para el aislamiento de hongos a partir de muestras orales y otorrinolaringológicas.

a) Medios sin antibacterianos

- Agar glucosado de Sabouraud (SDA) 2% (modificación de Emmons) y 4% de glucosa.
- Agar infusión cerebro-corazón (BHIA).

b) Medios con antibacterianos y/o cicloheximida

- SDA o BHIA con uno o varios de los compuestos siguientes: cloranfenicol (> 16 µg/ml), gentamicina (5-100 µg/ml), penicilina (20 U/ml), estreptomina (40 µg/ml), ciprofloxacina (5 µg/ml) y cicloheximida (500 µg/ml).

c) Medios selectivos y diferenciales

- CHROMagar Candida (CHROMagar Co.).
- Candida ID (bioMérieux).
- Albicans ID (bioMérieux).
- Fluoroplate Candida (Merck).
- Candiselect (BioRad).
- Chromalbicans agar (Biolife).

Debido a la posible infección polimicrobiana de la cavidad oral se pueden emplear otros medios de cultivo para las muestras orales, como son los medios cromogénicos, que facilitan la observación de las colonias de diferentes especies y permiten una identificación presuntiva y rápida (18 a 48 h) según el color de las colonias. Entre estos medios destacan el medio CHROMagar Candida y el Candida ID (Tabla 8.2).

Previamente a su cultivo, los tejidos y biopsias deben trocearse con un bisturí estéril, sembrando directamente los trozos obtenidos (de 1-2 mm) sobre el medio de cultivo. Este troceado es especialmente importante cuando sospechamos que el agente etiológico presente en la muestra (ótica o rinosinusal) puede ser un zigomiceto u otro hongo filamentoso. La homogenización con una trituradora puede afectar a la viabilidad de estos microorganismos por lo que no está recomendada en ningún caso [10,12,14].

8.4.2. Incubación

Las placas o tubos se incuban, en paralelo, a 30 °C y a 37 °C; si esto no fuera posible, las muestras orales se incubarán a 37 °C y las otorrinolaringológicas a 27-30 °C.

En caso de utilizar tubos, estos deben tener el tapón de rosca lo suficientemente abierto como para permitir su aireación y se depositan en la estufa en

posición horizontal durante las primeras 24 h de incubación.

La incubación total comprende un periodo de una semana, pero se prolongará hasta cuatro semanas en caso de sospecha de un hongo filamentoso.

En la mayoría de los casos, las colonias se pueden observar a las 24-48 h de incubación. En los medios cromogénicos selectivos el color de las colonias de levaduras es más nítido a las 48-72 h.

8.4.3. Lectura e interpretación

Examen microscópico

El examen microscópico de los frotis e improntas permite apreciar las estructuras fúngicas presentes, especialmente las hifas y micelios. Los zigomicetos se observan como tubos o cintas anchos de estructura anómala, ramificados pero no tabicados (sifonados). La presencia de hifas más estrechas y septadas no permite identificar con certeza el género fúngico implicado. La ramificación dicotómica en ángulos de 45° o la presencia de estructuras especiales, como en el caso de las bolas fúngicas, pueden orientar hacia hongos tipo *Aspergillus*. Los hongos dematiáceos presentarán hifas pigmentadas de colores más oscuros. *Candida* y otras levaduras muestran una combinación de blastosporas, pseudohifas y micelio. Los hongos filamentosos presentan con frecuencia, en las muestras óticas y sinusales, estructuras conidiales perfectamente formadas. En el caso de *Aspergillus* se pueden apreciar cabezas conidiales y conidiosporas similares a las que se observan en el medio de cultivo.

Lectura e interpretación de los cultivos

Una vez detectado el crecimiento en los medios de cultivo debe procederse a la identificación de la especie, o especies, implicada(s). La morfología de la colonia es el primer criterio que permite distinguir entre levaduras y hongos filamentosos (Figuras 8.6-8.9). La gran mayoría de las colonias cremosas corresponden a levaduras o, en contadas excepciones, a la fase levaduriforme de los hongos dimórficos (*Sporothrix*, *Histoplasma*, *Paracoccidioides*, *Blastomyces*, entre otros) y para la correcta identificación de la especie se recomienda seguir las indicaciones propuestas en el Capítulo 11.

Los hongos filamentosos suelen crecer formando colonias pulverulentas, vellosas, lanosas, aterciopeladas o con pliegues. La morfología colonial es más útil en la posterior identificación de los

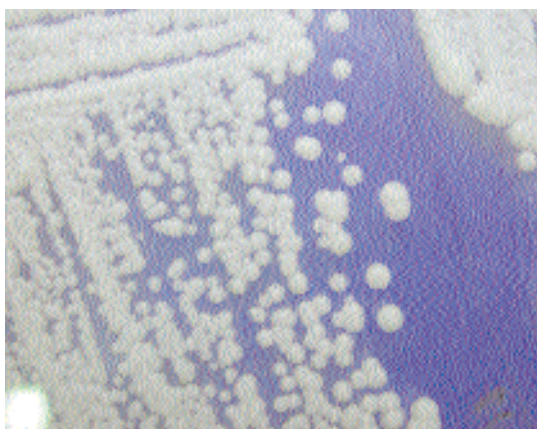


Figura 8.6. Colonias de *Candida albicans* en agar glucosado de Sabouraud.

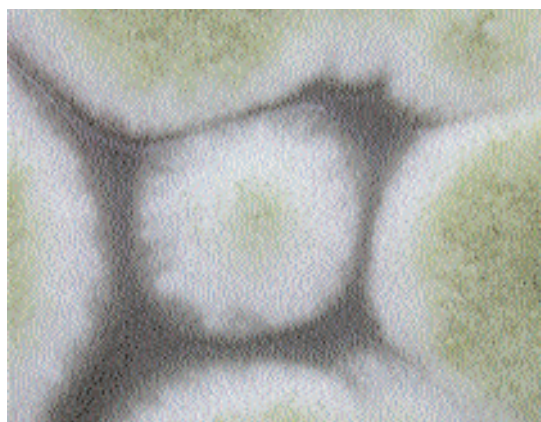


Figura 8.7. Colonias de *Aspergillus flavus* en agar glucosado de Sabouraud.

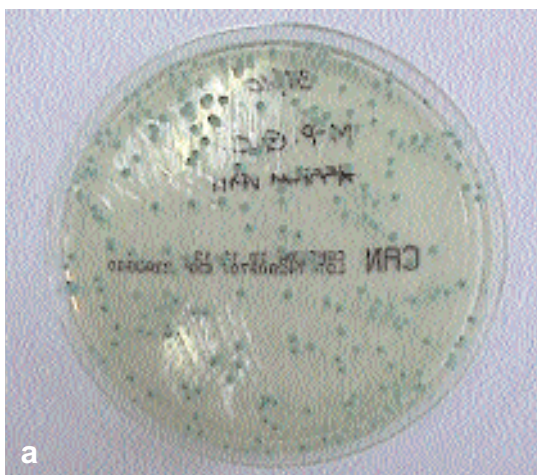


a) Los hongos mamentosos pueden tardar varios días en formar colonias que puedan ser vistas.

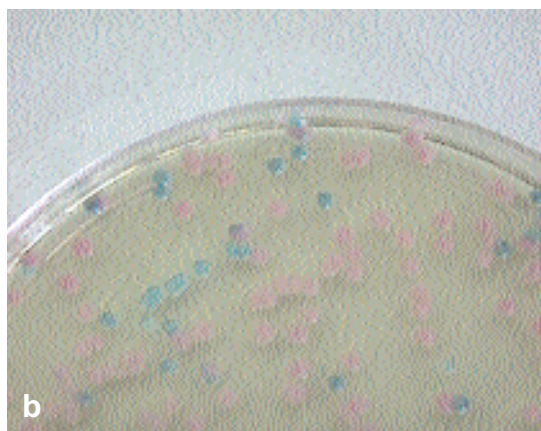


b) Las imágenes compatibles con estas. En los casos de

Figura 8.8. Colonias verdes de *Candida albicans* en el medio cromógeno CHROMagar Candida. a: Junto a colonias de otras especies de levaduras de interés médico; b: Junto a colonias de *Aspergillus*.



a)



b)

Figura 8.9. Medio cromógeno Candida ID (bioMérieux). a: *Candida albicans* (colonias azules); b: *Candida tropicalis* (colonias rosas).

estructuras fúngicas en el examen directo de la muestra es de gran utilidad para el clínico ya que, en estas infecciones, el diagnóstico precoz es muy importante para el tratamiento y pronóstico de la enfermedad.

En un segundo estadio (18-48 h) se puede informar sobre la densidad del crecimiento obtenido en el cultivo, la presencia de colonias de aspecto homogéneo o de cultivo mixto (polimicrobiano) y si la morfología colonial es compatible con la de un hongo levaduriforme o filamentosos. Los medios cromogénicos permiten, en el caso de colonias levaduriformes, la identificación presuntiva del aislamiento.

Posteriormente, una vez identificada la especie, se debe comunicar la identidad del hongo aislado, la evaluación sobre su posible implicación en la etiología de la infección y su sensibilidad *in vitro* a los antifúngicos, siempre que el aislamiento cumpla los criterios requeridos para efectuar este estudio (Capítulos 15 y 16).

Nunca se debe informar si el aislamiento corresponde a un hongo contaminante o saprobio sin tener una información clara de la situación clínica del paciente. Cualquier hongo es patógeno si las condiciones del enfermo son propicias para su desarrollo en los tejidos. Este hecho todavía refuerza más la necesidad de una estrecha colaboración entre los clínicos y los micólogos.

8.4.5. Dificultades

La cuantía de la muestra clínica condicionará los procedimientos diagnósticos; si esta es escasa, el cultivo, al ser más sensible, debe ser prioritario. En el caso de las biopsias, es casi seguro que una parte se habrá procesado para su estudio histológico, por lo que la toma de una decisión se ve facilitada.

El calentamiento de la muestra en contacto con KOH, para su posterior observación al microscopio, elimina las burbujas de aire atrapadas por el cubreobjetos pero también facilita la evaporación y la formación de cristales que pueden dificultar la lectura.

Cuando se empleen tinciones, se debe tener en cuenta que la tinción de hematoxilina-eosina no siempre tiñe bien los hongos y que las tinciones de PAS y de plata-metenamina pueden enmascarar el color natural del hongo, impidiendo ver los detalles internos de las hifas; además, algunas estructuras tisulares pueden teñirse de un color similar a las estructuras fúngicas (Capítulo 14).

La evaluación de un cultivo de muestras orales donde aparecen colonias fúngicas no puede realizarse de forma independiente de la presencia de lesiones compatibles con una candidiasis oral. Es importante valorar el número de colonias crecidas en las placas y su relación con lo observado en el frotis oral.

Los lavados orales proporcionan una orientación sobre la población fúngica presente en toda la cavidad oral, por lo que su utilidad diagnóstica es mucho menor que la de las muestras tomadas directamente de la lesión mediante torunda, espátula o cepillo citológico.

La presencia de infecciones polimicrobianas es bastante más difícil de detectar en medios como el agar glucosado de Sabouraud. Es recomendable utilizar un medio de agar cromogénico cuando exista la posibilidad de una infección polimicrobiana: las diferencias de color entre colonias facilitan la labor de aislamiento y posterior identificación de los aislamientos obtenidos.

En las muestras óticas y de senos paranasales, los hongos que se aíslan en el cultivo pueden ser tanto causantes de las lesiones como meros colonizadores saprobios. Por lo tanto, es imprescindible combinar los estudios micológicos con los histológicos para poder determinar la etiología de los cuadros invasores.

Referencias

- Quindós G, Pontón J. Candidiasis de la cavidad oral: Etiología, patogenia y diagnóstico de laboratorio. *Med Oral* 1996; 1: 85-95.
- Quindós G, Pontón J. Hongos de interés oral. En: Bascones A (Coordinador General). *Tratado de Odontología*. Tomo I (1ª Ed.). Madrid, Trigo Ediciones, S.L., 1998: 561-568.
- Negróni R. *Lecciones de clínica micológica*. Buenos Aires, La Agenda, 1997.
- Torres-Rodríguez JM, del Palacio-Hernanz A, Guarro-Artigas J, Negróni-Briz R, Pereiro-Miguens M (Eds). *Micología Médica*. Barcelona, Masson, 1993.
- Márquez A, García-Martos P, Marín P, Delgado D, García Cantos MD, Mira J. Otomicosis de etiología poco común. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1999; 17: 243-245.
- Tena D, Garau M, Sainz J, Arribi A, Carrillo A, del Palacio A. Otitis externa infantil. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1999; 17: 527-528.
- Garau M, Sánchez-Alor G, Toscano R, del Palacio A. Otitis invasora en un paciente inmunosuprimido. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2000; 18: 43-44.
- Finogold SM, Martín WJ. Bailey-Scott. *Diagnóstico microbiológico*. 6ª Ed. Buenos Aires, Editorial Médica Panamericana, 1983.
- Peña Yáñez J. *Micología clínica. Técnicas y diagnóstico de las micosis*. Madrid, Editorial Ciencia 3, 1983.
- Kwon-Chung KJ, Bennett JE. *Medical Mycology*. Philadelphia, Lea & Febiger, 1992.
- Miller JM, Holmes HT. Specimen collection, transport, and storage. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH (Eds.) *Manual of Clinical Microbiology*. 7th ed. Washington, ASM Press, 1999: 64-104.
- Negróni R, Gueifand L. *Manual de procedimientos para laboratorios de Micología Médica. Actualizaciones Médico-Bioquímicas*, Buenos Aires, 2000.
- Barenfanger J. Identification of yeasts and other fungi from direct microscopic examination of clinical specimens. *Clin Microbiol Newslett* 1990; 12: 9-15.
- Aslanzadeh J, Roberts GD. Direct microscopic examination of clinical specimens for the laboratory diagnosis of fungal infections. *Clin Microbiol Newslett* 1991; 15: 185-188.
- Puras Gil AM, Montes M, Fernández-Seara P, López Cousillas A. Expresión morfológica de las infecciones fúngicas graves. Participación del patólogo en el diagnóstico. *Rev Iberoam Micol* 2000; 17: 34-40.
- Rüchel R, Schaffrinski M. Versatile fluorescent staining of fungi in clinical specimens by using the optical brightener Blankophor. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 2694-2696.
- Reisner BS, Woods GL, Thomson RB Jr, Larone DH, García LS, Shimizu RY. Specimen processing. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH (Eds.) *Manual of Clinical Microbiology*. 7th ed. Washington, ASM Press, 1999: 64-104.
- de Hoog GS, Guarro J, Gené J, Figueras MJ. *Atlas of clinical fungi*. 2nd Ed. Reus, Universitat Rovira i Virgili, 2000.
- San Millán R, Ribacoba L, Pontón J, Quindós G. Evaluation of CHROMagar Candida medium for *Candida* identification. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1996; 15: 153-158.
- Quindós G, Alonso-Vargas R, Helou S, Arechavala A, Martín-Mazuelos E, Negróni R. Evaluación micológica de un nuevo medio de cultivo cromógeno (Candida ID) para el aislamiento e identificación presuntiva de *Candida albicans* y otras levaduras de interés médico. *Rev Iberoam Micol* 2001; 18: 23-28.

Elisa Amor
María José Gutiérrez
M^a Teresa Cutulí

9.1. Fundamento

La mayoría de los hongos encontrados en las muestras del tracto gastrointestinal son parte de la flora saprofita de las personas sanas y por lo tanto es difícil establecer su significado clínico.

Las levaduras son los hongos más comúnmente aislados en los especímenes del tracto gastrointestinal, tanto en sujetos normales como en pacientes hospitalizados, pero más frecuentemente en estos últimos. Su presencia es especialmente importante en pacientes inmunodeprimidos, donde producen, sobre todo, cuadros de esofagitis.

En algunas situaciones clínicas es útil conocer la colonización del tracto gastrointestinal por levaduras, ya que puede predecir una candidiasis invasora, sobre todo en pacientes hospitalizados con factores de riesgo [1]. En estos casos se pueden utilizar los cultivos cuantitativos de heces, así como en los estudios epidemiológicos en los que se investiga la flora intestinal normal y su posible alteración en determinadas circunstancias, como la utilización de antibióticos [2].

ratorio protegidos en recipiente limpio, seco y herméticamente cerrado.

Conservación

A temperatura ambiente. Deben examinarse lo antes posible (aconsejable menos de 2 h).

Examen directo

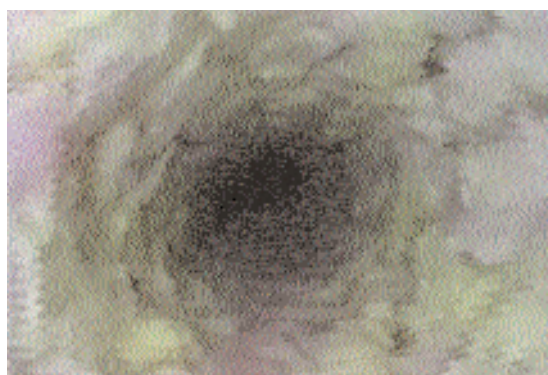


Figura 9.1. Imagen endoscópica de una esofagitis candidiásica masiva (Cortesía del Dr. Vicente Pons, Servicio de Medicina Digestiva, Hospital Universitario La Fe, Valencia).

Se realiza mediante la técnica de hidróxido potásico (KOH) o bien con blanco de calcoflúor (Capítulo 14). El material de cepillado esofágico no es adecuado para el cultivo de hongos.

Lectura e interpretación

Hay que valorar la presencia de levaduras e hifas.

Validación e informe

El resultado del examen microscópico puede emitirse inmediatamente, al ser una técnica rápida y sencilla de realizar.

9.2. Procesamiento de muestras esofágicas

9.2.1. Cepillado esofágico

Recogida

Mediante escobillón guiado por endoscopia, se recoge material preferentemente de las placas blanco-amarillentas o pseudomembranosas si las hubiese (Figura 9.1). Después, se frota el cepillo por la superficie de uno o varios portas limpios.

Transporte

Los portas se envían inmediatamente al labo-

9.2.2. Biopsia esofágica

Raramente es necesaria una biopsia esofágica para el diagnóstico de esofagitis candidiásica, ya que el cepillado esofágico ha demostrado ser muy sensible y específico para el diagnóstico de esta entidad [3]. Además, un cultivo positivo no diferencia entre colonización e infección. Sin embargo, si se sospecha una especie de *Candida* resistente u otro hongo patógeno (*Aspergillus*, *Histoplasma*), el cultivo puede ser útil [4].

Recogida

Es preferible tomar varias muestras de mucosa esofágica a través del gastroscopio para aumentar el rendimiento.

Transporte

En un recipiente estéril, añadiendo 4-5 ml de suero salino estéril.

Conservación

Refrigerado a 4 °C. Procesar lo antes posible (menos de 2 h).

Examen directo

Mediante KOH o blanco de calcoflúor.

Siembra

La manipulación de la muestra debe hacerse en campana de seguridad. El tejido se corta, mediante bisturí estéril, en pequeñas piezas (≈ 1 mm) que se depositan en la superficie del medio de cultivo, presionando suavemente para que queden implantadas en el agar. Los medios a utilizar deben incluir un agar Sabouraud con antibióticos y cicloheximida y otro sin cicloheximida, ya que esta última puede inhibir el crecimiento de *Cryptococcus* y algunas especies de *Candida*. Además, puede utilizarse un medio cromogénico para levaduras como Albicans ID o CHROMagar (Capítulo 11).

Incubación

A 30 °C en atmósfera aeróbica y durante 4 semanas.

Lectura e interpretación

La lectura de las placas se realiza diariamente durante la primera semana y tres veces por semana hasta el final de la incubación. Se investigará la presencia de colonias sugestivas de levaduras y posteriormente se realizará su identificación (Capítulo 11) y estudio de sensibilidad (Capítulos 15 y 16), si fuera necesario.

Validación e informe

Ante cualquier información valiosa deben emitirse informes preliminares (los informes telefónicos se acompañarán siempre de uno por escrito) y el informe definitivo de un cultivo positivo, al finalizar el trabajo de identificación. Los cultivos negativos se informan a las 4 semanas de incubación.

9.3. Procesamiento de muestras gástricas

9.3.1. Jugo gástrico o duodenal

El cultivo micológico del jugo gástrico sólo está indicado en estudios epidemiológicos para evaluar el valor predictivo de la colonización intestinal por *Candida* en la candidiasis sistémica.

Recogida

Mediante sonda nasogástrica, recoger unos 5 ml de aspirado gástrico en tubo estéril con cierre hermético.

Transporte

Inmediato al laboratorio.

Conservación

A su llegada al laboratorio neutralizar con un volumen igual de carbonato cálcico. Si no se puede procesar inmediatamente, conservar en nevera a 4 °C (menos de 24 h).

Examen directo

Se realiza con KOH o blanco de calcoflúor.

Siembra

Directa en agar Sabouraud con y sin cicloheximida y/o en un medio cromogénico.

Incubación

A 30 °C en atmósfera aeróbica durante 2-3 semanas.

Lectura e interpretación

Lectura diaria de las placas durante la primera semana y tres veces por semana hasta el final del período de incubación. Se investigará la presencia de colonias sugestivas de levaduras. Posteriormente se realizará su identificación (Capítulo 11).

Validación e informe

Emitir informes preliminares ante cualquier información valiosa (los informes telefónicos se acompañarán siempre de uno por escrito) y el informe definitivo de un cultivo positivo, al finalizar el trabajo de identificación. Los cultivos negativos se informan a las 4 semanas de incubación.

9.3.2. Biopsia gástrica

La metodología es la misma que la empleada en la biopsia esofágica (Apartado 9.2.2).

9.4. Procesamiento de heces

El procesamiento de heces para hongos no es aconsejable debido al escaso significado diagnóstico que tiene la presencia de levaduras en este tipo de muestra, ya que más del 40% de individuos sanos y más del 75% de pacientes inmunodeprimidos están colonizados por levaduras sin presentar trascendencia clínica alguna [5].

Sin embargo, el crecimiento de una gran cantidad de levaduras en las heces, posiblemente tiene un valor predictivo de micosis invasora en circunstancias clínicas concretas: trasplante de médula ósea, recién nacidos de muy bajo peso, pacientes oncológicos y pacientes ingresados en UCI.

Recogida

Recoger una cantidad aproximada de 10-20 g de heces recién emitidas, en frasco limpio sin conservante y herméticamente cerrado. No utilizar torundas.

Transporte

Lo antes posible (menos de 2 h).

Conservación

Siempre a 4 °C. Procesar lo antes posible ya que es una muestra altamente contaminada con bacterias.

Examen directo

No recomendado.

Siembra

Puede realizarse cuantitativa o semicuantitativamente:

- **Semicuantitativa:** Siembra directa en agar Sabouraud con cloranfenicol y en medio cromogénico para levaduras.
- **Cuantitativa:** Se homogeniza una porción de heces en suero salino para que la mezcla final contenga 0,1 g de heces por ml. Se mezcla en Vórtex durante 2 min y se hacen diluciones seriadas en proporción 1:10 en suero salino. Se inocula 100 µl de cada dilución en Sabouraud agar con cloranfenicol (SDAC).

Incubación

A 30 °C durante 48 h.

Lectura e interpretación

- **Técnica semicuantitativa:** Valorar la intensidad del crecimiento (ligero, medio o abundante).
- **Técnica cuantitativa:** Contar el número de colonias y multiplicar por el factor de dilución. Se considera normal una cifra igual o menor a 10^4 UFC/ml [1].

Validación e informe

Informar los resultados de la lectura realizada a las 48 h. A efectos epidemiológicos, también debe informarse la identificación de la especie aislada.

9.5. Dificultades

El procesamiento para el estudio micológico de las muestras del tracto gastrointestinal no reviste en sí mismo grandes dificultades. Sin embargo, la complicación puede surgir en el momento de valorar el significado clínico de la presencia de levaduras en estas muestras. El cultivo de jugo gástrico y

Unos consejos...

- Siempre que sea posible, evitar el procesamiento rutinario de estas muestras para cultivo micológico.
- El examen directo con KOH del cepillado esofágico es sencillo de realizar y fácil de interpretar, no necesitando microscopio de fluorescencia.

Referencias

1. Jarvis W. The epidemiology of colonization. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1996; 17: 47-52.
2. Samonis G, Gikas A, Anaisse E, *et al*. Prospective evaluation of effects of broad-spectrum antibiotics on gastrointestinal yeast colonization of humans. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37: 51-53.
3. Bonacini M, Young T, Laine L. The causes of esophageal symptoms in human immunodeficiency virus infection. *Arch Intern Med* 1990; 151: 1572.
4. Baehr P, McDonald G. Esophageal infections: risk factors, presentation, diagnosis and treatment. *Gastroenterology* 1994; 106: 509-532.
5. Reisner B, Woods G, Thomson Jr R, Larone D, García L, Shimizu R. Specimen processing. *Mycology*. En: Murray P, Baron E, Pfaller M, Tenover F, Tenover R (Eds.). *Manual of Clinical Microbiology*, 7th ed, Washington D.C., American Society for Microbiology Press, 1999: 85-89.

6. Slotman GS, Shapiro R, Moffa SM. Fungal sepsis: multisite colonization versus fungemia. *Ann Surg* 1994; 60: 107-113.
7. Muñoz P, Burillo A, Bouza E. Criterios clínicos y microbiológicos para decidir el inicio de un tratamiento antifúngico frente a *Candida* spp en pacientes de UCI. *Medicina Intensiva* 1999; 23: 47-53.

Bibliografía complementaria

- Jones JM. Laboratory diagnosis of invasive candidiasis. Clin Microbiol Rev 1990; 3: 32-45.
- Kwon-Chung K, Bennett J. Medical Mycology.

María Álvarez

10.1. Procesamiento de muestras oculares

10.1.1. Fundamento

El espectro clínico de las infecciones oculares fúngicas es tan variado como el de las infecciones bacterianas. Los hongos pueden afectar tanto a las estructuras oculares internas como a las externas o a sus anejos, produciendo cuadros de endoftalmitis, queratitis, conjuntivitis o blefaritis [1]. En todas ellas se pone de manifiesto la habilidad del clínico para la evaluación de las lesiones y su precisión en la recogida de la muestra adecuada para solicitar los estudios microbiológicos pertinentes [2].

Endoftalmitis

Una de las formas más frecuentes de micosis ocular es la endoftalmitis endógena producida por *C. albicans* asociada a diseminación hematógena. Hasta un 30% de pacientes con candidemia desarrollan endoftalmitis candidiásica produciendo numerosos microabscesos en coroides y retina. También está estrechamente relacionada con el uso prolongado de los catéteres venosos centrales así como con el uso de heroína marrón por drogadictos [3]. Los hongos filamentosos, sobre todo *Aspergillus*, pueden, a su vez, causar endoftalmitis endógena en pacientes inmunodeprimidos y los hongos dimórficos (*H. capsulatum*, *B. dermatitidis*, *S. schenckii*, *C. immitis*) y *C. neoformans*, en el curso de una infección diseminada. La endoftalmitis exógena, se origina por la inoculación directa del hongo (postraumática, postqueratitis, postquirúrgica) o en el curso de una mucormicosis.

Queratitis

Las queratitis fúngicas constituyen del 6 al 35% de todas las úlceras corneales. La mayoría son postraumáticas, se observan en trabajadores del campo o relacionadas con el uso de lentillas. Habitualmente, las lesiones son de evolución tórpida

[4], debido al crecimiento lento de los hongos, lo que suele retrasar su diagnóstico y el tratamiento específico. *Fusarium*, *Acremonium*, *Phialophora*, *Aspergillus*, *Arthrographis*, *Curvularia* y *Paecilomyces* son los géneros relacionados con la queratitis postraumática y *Candida* con el uso de lentes de contacto.

Conjuntivitis

La flora saprofita conjuntival está formada mayoritariamente por bacterias gram positivas aerobias; pero, en un 6-25% de la población sana también se aíslan levaduras (*C. parapsilosis*) de forma habitual, al parecer en relación con el uso de cosméticos contaminados, por lo que muchos autores recomiendan realizar la toma de muestras de ambos ojos, para comparar el crecimiento obtenido en el ojo sano con el afectado.

Blefaritis e infecciones del sistema lacrimal

Los párpados pueden ser asiento de infecciones fúngicas diversas. Los agentes causales más frecuentemente observados son *S. schenckii* y *B. dermatitidis* (lesiones ulceradas), *M. furfur* (dermatitis seborreica) y *C. albicans* (blefaritis ulcerativa). Los dermatofitos pueden aislarse en párpados y pestañas, pero como extensión de una dermatomycosis de la cara. Así mismo, la infección y obstrucción del canal lacrimal puede estar relacionada con levaduras, sobre todo en neonatos, donde *Candida* spp. y *Rhodotorula* spp. se aíslan en un 30% de las dacriocistitis congénitas.

Estructuras adyacentes

En los párpados y tejidos periorbitarios pueden observarse estructuras fúngicas a causa de una proptosis ocular, en el curso de una mucormicosis rino-orbito-cerebral o por extensión de una infección sinusal contigua. Las distintas especies de *Aspergillus* y mucorales tienen una marcada predilección por los senos paranasales y tejidos periorbitarios; la infección crónica por *Conidiobolus*

coronatus puede afectar tanto al ojo como a la órbita.

10.1.2. Recogida de muestras oculares

Exudado conjuntival

1. Emplear una torunda estéril, de algodón o de alginato cálcico, humedecida con medio de cultivo o suero salino estéril.
2. Frotar la zona lesionada suavemente e introducir la torunda en el medio de transporte.
3. Repetir la toma en el ojo contralateral con una torunda diferente. Si se dispone de medios de cultivo, es preferible inocularlos en el momento de la obtención de la muestra.

Raspado corneal

1. Obtener un exudado conjuntival de cada ojo.
2. Aplicar unas gotas de colirio anestésico.
3. Raspar la superficie de la lesión con un asa de Kimura (asa de platino de punta roma, flexible, ultrafina de enfriamiento rápido, que se puede esterilizar a la llama) o con un bisturí (esta operación debe realizarla el oftalmólogo, controlando la toma con microscopio o con lámpara de hendidura).

Unos consejos...

- Si la lesión es muy purulenta se puede recoger la muestra con una torunda.
- Si la lesión es muy profunda puede hacerse una incisión con microbisturí.
- Si la lesión está mal definida se puede pasar un hilo quirúrgico por el área infectada y luego usarlo para inocular los medios.

4. Sembrar los medios de cultivo en el acto de la recogida, con el mismo instrumento con que se obtiene la muestra y realizando una serie de cortes en forma de C o de X en el medio de cultivo.
5. Preparar dos o más extensiones en porta para teñir y fijar con alcohol.

Fluidos y aspirados oculares

En los casos de endoftalmítis y celulitis orbitaria, las muestras deben ser recogidas por el oftal-

mólogo en el quirófano, mediante punción aspiración o vitrectomía y controladas por microscopía.

1. Recoger el material mediante punción y aspiración del fluido (si la muestra es muy densa, se recoge con el bisturí y se coloca en un contenedor estéril).
2. Se recomienda la inoculación directa en los medios de cultivo y la preparación de dos o más extensiones para tinción.

Conductos lacrimales

1. Mediante una torunda, previamente humedecida con suero salino estéril, recoger material purulento presionando los párpados y el saco lacrimal.
2. Introducirla en un contenedor, con medio de transporte tipo Amies.

Lentes de contacto

Siempre que sea posible, enviar la lente al laboratorio; si no es posible prescindir de la lente, frotar con una torunda la superficie de contacto corneal.

Cuerpos extraños

Después de la extracción del cuerpo extraño causante de una lesión ocular, debe enviarse al laboratorio para su cultivo.

Hipopion

Suele estar constituido por material de detritus celular estéril por lo que no es útil para su cultivo.

10.1.3. Transporte de muestras oculares

- Enviar de inmediato al laboratorio, avisando del envío de la muestra.
- Las muestras recogidas con torunda, se introducen en un contenedor con medio de transporte (no se precisan medios especiales).
- Las muestras recogidas con bisturí se pueden humedecer con unas gotas de agua destilada estéril o con caldo de cultivo para evitar la desecación. Enviarlas en contenedor estéril, preferiblemente con tapón de rosca.
- Las muestras recogidas por punción-aspiración, se pueden enviar en la misma jeringuilla, blo-

queando la aguja con una goma estéril, dentro de un contenedor de seguridad.

- Todas las muestras, para su traslado dentro del hospital, deben ir debidamente identificadas en su envase y acompañadas del formulario de petición correspondiente.

10.1.4. Conservación de muestras oculares

Debido a sus peculiares características, este tipo de muestras debe procesarse de inmediato (mantener a temperatura ambiente como máximo 15 min); de lo contrario, deben conservarse refrigeradas a 4 °C hasta su procesamiento (máximo 24 h) intentando mantener las condiciones de humedad en su contenedor original.

10.1.5. Examen directo de muestras oculares

Paralelamente a su siembra, y siempre que la cantidad de la muestra sea suficiente, deben prepararse extensiones para su examen microscópico directo. La observación de elementos fúngicos y sus características proporciona un diagnóstico inicial de infección que debe confirmarse con el cultivo.

Las técnicas de examen directo más aconsejadas son las siguientes:

- Examen en fresco (KOH, blanco de calcoflúor).
- Tinción con naranja de acridina (útil cuando hay pocos elementos en la lesión), plata-metenamina (diferencia nítidamente las estructuras fúngicas) o Giemsa (permite evaluar la respuesta inflamatoria y ver elementos fúngicos).

Todas ellas se encuentran detalladas en el Capítulo 14. La elección de las mismas dependerá de la experiencia particular, de la cantidad de la muestra y de la sospecha clínica.

10.1.6. Cultivo de muestras oculares

Los medios en placa se utilizan habitualmente para el cultivo de muestras de fácil obtención, pero cuando la muestra es escasa o valiosa, es prefe-

rible emplear medios en tubo con tapón de rosca para evitar la desecación y las contaminaciones ambientales.

La selección de medios, está en función de la cantidad de muestra disponible que se vaya a procesar, como mínimo se debe emplear un medio de agar glucosado de Sabouraud (SDA), otro medio base enriquecido con sangre y un medio líquido (Capítulo 3).

- **Exudado conjuntival, palpebral, dacriocistitis, canaliculitis:** SDA con antibióticos.
- **Raspado, exudado corneal:** SDA con antibióticos (30 y 37 °C) + Caldo infusión de cerebro-corazón (BHI) con antibióticos.
- **Exudado intraocular:** SDA con antibióticos (30 y 37 °C) + Caldo infusión de cerebro-corazón (BHI) con antibióticos.

Cuando la muestra obtenida es muy escasa, añadir un medio líquido sin antibióticos a la muestra, hasta completar 0,5 ml de volumen, mezclar suavemente y utilizarlo para inocular los diferentes medios de cultivo y realizar las extensiones para tinción.

10.1.7. Incubación de muestras oculares

- SDA: a 30 °C y 37 °C (4 semanas).
- Caldo infusión de cerebro-corazón (BHI): a 37 °C (4 semanas).

Antes de descartar un cultivo, para detectar hongos de crecimiento lento (dimórficos), se recomienda ampliar la incubación hasta ocho semanas.

10.1.8. Lectura e interpretación

- La inspección de los cultivos, se realiza diariamente la primera semana, luego se van espaciando las observaciones (en los casos con sospecha de infección fúngica grave, los cultivos se examinan cada 12 h).
- Se recomienda la inspección con lupa de pocos aumentos, o con microscopio estereoscópico, debiendo registrarse el número y tipo de colonias.
- El crecimiento de colonias, tiene que aparecer sobre las marcas realizadas durante la siembra de los medios sólidos. Cuando está situado fuera de estas marcas, puede considerarse contaminación.
- Si el número de colonias es muy escaso, debe

descartarse la posibilidad de contaminación, durante la siembra e incubación.

- El crecimiento debe observarse en más de un medio de cultivo. Si sólo hay crecimiento en un medio, tiene valor si hubo detección del microorganismo en el examen directo de la muestra.
- Todos los organismos recuperados de estas muestras deben ser identificados (Capítulos 11 y 13).

10.1.9. Dificultades

- Si la muestra es muy escasa se puede diluir hasta 0,5 ml; si es líquida se debe inocular en dos

botellas de hemocultivos pediátricos.

- Como la sensibilidad de las tinciones es muy baja, cuando exista escasa muestra es preferible realizar sólo la siembra.
- Alguna vez es difícil decidir si el crecimiento detectado es contaminación o flora habitual. Para ello es recomendable observar la relación con el área sembrada y puntos de aparición del crecimiento, número de colonias, aparición secuencial, tipo de colonias, la detección y el tipo de elementos fúngicos en el examen directo. Siempre que sea posible, en estos casos se debe solicitar nueva muestra.
- Cuando los elementos fúngicos observados en el

Unos consejos...

- Excepto el exudado conjuntival, el resto de muestras oculares debe ser recogido por el oftalmólogo y, por su difícil obtención, se recomienda la siembra en el momento de la recogida.
- Es deseable una estrecha colaboración con los oftalmólogos, para que se esmeren en la recogida y den tratamiento prioritario o urgente al envío de la muestra, acompañada de los datos clínicos precisos y la solicitud debidamente cumplimentada.
- El personal del laboratorio debe avisar al microbiólogo responsable de la llegada de este tipo de muestras, para realizar el seguimiento de su procesado desde el inicio.
- Nunca emitir un informe con el mensaje: "Probable contaminante". Si existe evidencia de contaminación, no debe informarse al clínico.
- Nunca emitir un informe con el mensaje: "Hongo oportunista", "Hongo saprofita", estas afirmaciones confunden al clínico. Cualquier microorganismo puede invadir las estructuras oculares si se dan las condiciones adecuadas.
- Se recomienda el uso de campanas de flujo laminar para todos los pasos: siembra, inspección, subcultivos, pruebas de identificación, pruebas de sensibilidad, etc.
- Identificar el género y la especie de todos los aislamientos; si no es posible, enviar la cepa a un laboratorio de referencia. Mantener una colección de cepas de referencia e ir ampliándola para estar familiarizado con los nuevos agentes patógenos.
- Tener presente siempre la posibilidad de un brote cuando aparezcan dos casos de infección fúngica relacionados ocasionados por el mismo microorganismo.

examen directo no crecen:

- Pensar en la posibilidad de *Malassezia* que precisa medios enriquecidos con lípidos para su crecimiento.
- Prolongar a seis semanas el periodo de incubación.
- Modificar la temperatura de incubación de alguno de los medios (*Rhodotorula glutinis* crece mejor a 30 °C).
- Valorar un posible tratamiento antifúngico previo.

10.2. Procesamiento de catéteres intravasculares

10.2.1. Fundamento

En las sepsis, uno de los principales focos de microorganismos (*Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Candida*, etc.) son los catéteres intravasculares. Actualmente, se considera que una de cada cuatro septicemias hospitalarias está causada por un dispositivo intravascular, calculándose que la incidencia actual de infección relacionada con un catéter intravascular (IRCI) es del 0,3% de los episodios de cateterización [5].

Aproximadamente, el 15% de todos los episodios de IRCI están causados por *C. albicans*, pero también otros patógenos fúngicos han sido reconocidos como agentes causales de IRCI: *C. parapsilosis*, *Candida* spp., *Malassezia* spp., *Trichosporon beigelii*, *Fusarium* spp. y mucorales, entre otros [6].

Ante la sospecha de una IRCI, debe retirarse el catéter siempre que sea posible. Además, deben realizarse cultivos del exudado cutáneo pericatóter, del segmento subcutáneo y del interior de las conexiones, extrayendo también sangre por el mismo catéter y de otra vena, para realizar hemocultivos cuantitativos [7].

10.2.2. Recogida y transporte

Catéteres intravasculares

1. Desinfectar con alcohol la zona cutánea alrededor de la inserción del catéter.
2. Retirar el catéter y, asépticamente, cortar 5 cm del extremo distal, que se introduce en un contenedor estéril con tapón de rosca.
3. Rotular y enviar al laboratorio.

Exudados pericatóter

1. Realizar un frotis con torunda en una zona de 2 cm alrededor de la inserción del catéter.
2. Introducir la torunda en un medio de transporte.
3. Rotular y enviar al laboratorio.

Frotis de la conexión

1. Empleando una torunda fina, realizar un frotis de la vía intraluminal del catéter.
2. Introducir la torunda en un medio de transporte.
3. Rotular y enviar al laboratorio.

Extensiones para tinción

Es aconsejable realizarlas a la cabecera del enfermo, marcando con un círculo de 1 cm² la zona de la extensión.

10.2.3. Conservación

Se recomienda el procesado inmediato de todas estas muestras, debiéndose conservar a temperatura ambiente un máximo de 15 min. De lo contrario, deben almacenarse a 4 °C hasta su procesamiento un máximo de 24 h. Si los catéteres no van a ser procesados inmediatamente, se recomienda refrigerarlos sumergidos en solución salina estéril.

10.2.4. Examen directo

La tinción de Gram del frotis pericatóter y de las conexiones tiene un alto valor diagnóstico (predictivo negativo >95%). La tinción con naranja de acridina es más sensible cuando el número de organismos es muy bajo.

10.2.5. Siembra

Catéteres vasculares

Las técnicas más aconsejadas por su simplicidad de procesado, son:

1. **Técnica semicuantitativa de Maki.** Se realiza rodando 5 cm del segmento distal del catéter,

sobre placas de agar sangre y SDA cuatro veces, con la ayuda de una pinza estéril.

2. **Técnica cuantitativa de Brum-Buisson.** El extremo distal del catéter, se introduce en un medio de cultivo líquido, se agita en un Vórtex durante 1 min y se siembran 50 µl en placas de agar sangre y SDA.

Ante la sospecha de infección por *Malassezia*, utilizar el medio específico de cultivo de Dixon, SDA con ácido palmítico al 3% o aceite de oliva (Capítulo 3).

Exudado cutáneo y de la conexión

Sembrar en placas de agar sangre y SDA.

10.2.6. Incubación

1. Agar sangre: a 35-37 °C, 72 h.
2. Medios líquidos: a 35-37 °C, 72 h.
3. SDA: a 30 °C, para detectar el crecimiento de *Rhodotorula* spp., 15 días.
4. SDA-palmítico 3%: a 35-37 °C, para permitir el crecimiento de *Malassezia* spp., 15 días.
5. Si se sospecha la infección por hongos filamentosos, prolongar la incubación 30 días.

10.2.7. Lectura e interpretación

Las placas deben leerse cada 24 h durante la primera semana de incubación; posteriormente, cada 48 h. Con la técnica de Maki, más de 15 UFC de levaduras por placa debe valorarse como catéter infectado; recuentos inferiores tienen un valor más relativo para relacionar los catéteres intravasculares con el origen de la fungemia [8].

La adición de una placa de SDA tiene como objetivo evitar que las colonias de levaduras pasen desapercibidas cuando hay abundante crecimiento de estafilococos.

Ante la aparición de colonias de hongos filamentosos, hay que descartar una posible contaminación durante su procesamiento. Una vez descartada se debe informar al clínico para valorar la situación del paciente.

10.2.8. Validación e informe

El informe de hallazgos positivos en el examen directo debe realizarse sin demora, igual que debe emitirse un informe previo del crecimiento fúngico observado, sin esperar a completar la identificación de los aislamientos.

Cuando no se retira el catéter, la tinción de Gram del frotis de piel pericatóter, del segmento subcutáneo inmediato o del frotis endoluminal de las conexiones tiene un alto valor predictivo negativo.

10.2.9. Dificultades

Unos consejos...

- La metodología del procesamiento de catéteres debe ser minuciosamente realizada por el personal del laboratorio, por lo que se debe supervisar regularmente el procedimiento con el personal auxiliar.
- Cuando en las tinciones se observen levaduras que no crezcan en agar sangre ni en SDA, debe informarse al clínico y realizar nuevos cultivos añadiendo medios especiales para la recuperación de *Malassezia* spp.

Las técnicas cuantitativas son laboriosas, por eso la más empleada es la técnica de Maki.

Cuando el recuento de colonias fúngicas, en la placa de agar sangre, es menor de 15 UFC debe informarse igualmente y realizar un subcultivo más tinción de Gram del medio líquido, así como del segmento distal del catéter, para verificar los aislamientos.

Es frecuente la colonización cutánea por *Malassezia* spp. en los prematuros de alto riesgo y, secundariamente, la colonización del catéter intravascular. El diagnóstico de sepsis asociada a catéter por *Malassezia* spp. no es sencillo y requiere la detección del organismo (en las tinciones de sangre total o en la tinción del *buffy coat* de la sangre extraída por el catéter infectado), o su aislamiento en sangre periférica o en el cultivo del extremo distal del catéter (Capítulo 6).

10.3. Catéteres de diálisis peritoneal

continua ambulatoria

10.3.1. Fundamento

La diálisis peritoneal continua ambulatoria (DPCA) permite una mejor calidad de vida al paciente con insuficiencia renal crónica y, actualmente, es una alternativa a la hemodiálisis en muchas situaciones. El número de pacientes sometidos a DPCA en España supone un 11,4% de todos los dializados. Estos pacientes son portadores permanentes de un catéter de Tenckhoff, de implantación subcutánea abdominal, que se conecta a un sistema de doble bolsa en "Y" para permitir la entrada y salida del fluido de diálisis [9].

La peritonitis es la principal complicación de la DPCA; su incidencia estimada es de 0,5-0,6 episodios por paciente y año, aunque más de la mitad de los casos se observa en un 25% de los pacientes. Las peritonitis están causadas por estafilococos coagulasa negativos (40-60%), *Staphylococcus aureus* (10-20%), enterobacterias (5-20%) y un 5% por hongos, micobacterias y anaerobios [10,11].

La peritonitis fúngica afecta a pacientes con factores de riesgo de infección fúngica diseminada: antibióticos previos, inmunosupresión, hospitalización, etc. Está causada fundamentalmente por *C. albicans*, seguida por *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* y *Candida* spp. Las peritonitis fúngicas son difíciles de tratar y presentan más complicaciones que las bacterianas, siendo necesaria la retirada del catéter en >50% de los casos.

10.3.2. Recogida de muestras

Líquido de diálisis peritoneal

En condiciones de máxima asepsia, recoger por punción de la bolsa de diálisis 100 ml e introducir 10 ml en sendos frascos de hemocultivos. El resto de la muestra se introduce en un contenedor estéril con tapón de rosca, para recuento celular, cultivo y tinción de Gram.

Catéter de diálisis

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

10.3.3. Transporte y conservación

No precisa medio de transporte.

Se recomienda el procesado de inmediato, de lo contrario, conservar la muestra refrigerada a 4 °C (24 h máximo).

10.3.4. Examen directo

Líquido de diálisis

Tinción de Gram o con naranja de acridina.

Catéter

Hacer improntas sobre un porta-objetos estéril y realizar tinción de Gram o con naranja de acridina.

10.3.5. Siembra

Líquido de diálisis

Si no se ha inoculado en frascos de hemocultivo a la cabecera del enfermo, la muestra (mínimo 15 ml) debe concentrarse antes de su siembra mediante centrifugación (2.500 rpm, 15 min) o mediante el empleo de la técnica de lisis-centrifugación (Capítulo 6). Posteriormente, sembrar el sedimento en agar sangre, agar chocolate, SDA y caldo de tioglicolato (Capítulo 3).

Catéter peritoneal

Rodar el segmento subcutáneo del catéter tres veces sobre placas de agar sangre, agar chocolate y SDA, introducirlo en caldo de tioglicolato y agitar con Vórtex. Repetir con el segmento distal.

10.3.6. Incubación

Si se dispone de dos placas de SDA, incubar una a 25-30 °C y otra a 35-37 °C, durante 15 días.

Los frascos de hemocultivo se incuban durante ocho días.

10.3.7. Lectura e interpretación de los resultados

Leer los cultivos diariamente durante la primera semana de incubación teniendo en cuenta que *Candida* spp., *Aspergillus* spp., *Rhodotorula* spp., y *Trichosporon* spp. son los patógenos fúngicos más

Unos consejos...

- Además del cultivo, es recomendable realizar un recuento celular; si se observan más de 100 células/mm³, con un 50% de PMN, se interpreta como infección.
- La siembra en frascos de hemocultivo optimiza la recuperación de organismos.
- Nunca limitar el cultivo sólo a los líquidos de aspecto turbio.
- Los organismos aislados de los diferentes segmentos del catéter documentan si el origen de la infección es intraluminal, pericatóter, peritoneal o de otros focos.

frecuentemente relacionados con las infecciones por catéter en la DPCA.

10.3.8. Validación e informe

Los gérmenes habitualmente recuperados en el cultivo forman parte de la microflora cutánea, por lo tanto debe siempre valorarse su posible papel patógeno.

Los aislamientos deben identificarse completamente y realizar el correspondiente antibiograma.

10.3.9. Dificultades

Cuando se procesan líquidos de DPCA es importante establecer el volumen apropiado que se

debe procesar. Los estudios comparativos realizados indican que se obtienen mejores resultados procesando 20 ml de líquido peritoneal, repartido en una pareja de frascos de hemocultivo (aerobio y anaerobio), siguiendo el proceso habitual del laboratorio. Pese a todo, los cultivos son negativos en un 10% de las peritonitis infecciosas.

10.4. Material protético

10.4.1. Fundamento

En el contexto global, las infecciones por hongos del material protético son muy infrecuentes. Entre todas, las prótesis de válvulas cardíacas y las mallas de refuerzo de la pared abdominal son las más relacionadas con la infección fúngica. Hay que tener presente que la colonización de las prótesis por hongos está muy condicionada a su composición, ya que éstos se adhieren mejor a los materiales plásticos y orgánicos que a los metálicos.

Prótesis valvular

La endocarditis infecciosa (EI) es una de las complicaciones más graves de los pacientes portadores de válvula protética cardíaca. De todas ellas, un 0,1% tiene una etiología fúngica; la mayoría son secundarias a una fungemia, pero también las válvulas protéticas pueden infectarse durante el acto quirúrgico por conidios ambientales [12].

Prótesis articular

Globalmente, la infección de prótesis de cadera (1%) y de rodilla (2,5%) es baja. El diagnóstico clínico de infección es a veces la única evidencia de artritis ya que la radiología sólo presenta alteraciones después de varios meses de evolución y la gammagrafía ósea no es definitiva. La infección fúngica puede desarrollarse a partir de la flora endógena (piel, úlceras de presión, etc.) o por contaminación exógena intraoperatoria, mediante conidios fúngicos aerotransportados [13].

10.4.2. Recogida

Si el material lo permite (mallas, prótesis vasculares, material de donantes, etc.) es aconsejable que el troceado lo realice el mismo facultativo, en condiciones asépticas y en el momento de su extracción, para facilitar la siembra en los diferentes medios [14].

En contenedor estéril y a temperatura ambiente.

10.4.4. Examen directo

Cuando la pieza es grande, es posible realizar un frotis de la misma mediante torunda estéril, humedecida con agua, y hacer una extensión en un porta para tinción de Gram.

10.4.3. Transporte y conservación

10.4.5. Siembra

Referencias

1. Klotz SA, Penn CC, Negvesky GJ, Butrus SI. Fungal and parasitic infections of the eye. *Clin Microbiol Rev* 2000; 13: 662-685.
2. Wilhelmus KR, Liesegang TJ, Oato MS, Jones DB, Cumitech 13 A, Laboratory diagnosis of ocular infections. Specter SC (Co-ordinating Ed). Washington D.C., American Society for Microbiology Press, 1994.
3. Martínez-Vázquez C, Fernández Ulloa J, Bordón J, *et al.* *Candida albicans* endophthalmitis in brown heroin addicts: response to early vitrectomy preceded and followed by anti-fungal therapy. *Clin Infect Dis* 1998; 27: 1130-1133.
4. Sridhar MS, Garg P, Bansal AK, Gopinathan U. *Aspergillus flavus* keratitis after laser in situ keratomileusis. *Am J Ophthalmol* 2000; 129: 802-804.
5. León M, García M, Herranz MA, *et al.* Rentabilidad de la tinción de Gram de la piel pericatéter y conexión en la predicción de bacteriemia relacionada con el catéter intravascular. *Enferm Infect Microbiol Clin* 1998; 16: 214-218.
6. Marcom MJ, Poweell DA. Human infection due to *Malassezia* spp. *Clin Microbiol Rev* 1992; 5: 101-109.
7. Liñares J, Sitges-Serra A, Garau J, Perez JL, Martín R. Pathogenesis of catheter sepsis: prospective study with quantitative and semiquantitative cultures of catheter hub and segments. *J Clin Microbiol* 1985; 21: 357-360.
8. Khabit R, Clark JA, Briski LE, Wilson FM. Relevance of culturing *Candida* species from intravascular catheters. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 1635-1637.
9. Montenegro J, Aguirre R, Ocharan J. Peritonitis fúngica. En: Montenegro J, Olivares J (Eds.) *La diálisis peritoneal* (2ª ed), Madrid, Impresiones DIBE S.L., 1999.
10. Von Graevenitz A, Amsterdam D. Microbial aspects of peritonitis associated with continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Clin Microbiol Rev* 1992; 5: 36-48.
11. Peterson PK, Matzke G, Keane WF. Current concepts in the management of peritonitis in patients undergoing continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Rev Infect Dis* 1987; 9: 604-609.
12. Almirante B, Pahissa A. Preguntas y respuestas sobre la endocarditis infecciosa. *Enferm Infect Microbiol Clin* 1999; 17: 202-205.
13. Barberán J, Garroquino G, Gomis M. Preguntas y respuestas sobre infecciones de prótesis articulares. *Enferm Infect Microbiol Clin* 2000; 18: 370-375.
14. Doscher W, Krihnasastry KV, Deckoff SI. Fungal graft infections: case report and review of the literature. *J Vasc Surg* 1987; 6: 398-402.

Si la pieza es muy pequeña se introduce en un caldo de tioglicolato.

Si es de tamaño pequeño se pueden realizar improntas sobre las placas de agar sangre y agar chocolate y luego introducirlas en un contenedor estéril con tapón de rosca y añadir caldo de tioglicolato hasta que esté cubierta.

Si el tamaño de la pieza es muy grande se realizan frotis con torundas en las zonas seleccionadas y se siembran en placas de agar sangre, agar chocolate y caldo de tioglicolato.

Las prótesis metálicas o no troceables, se ruedan o se hacen improntas en las placas y luego se introducen en un contenedor estéril con medio de

María José Linares Sicilia
Francisco Solís Cuesta

11.1. Fundamento

La identificación de la especie de toda levadura aislada en sangre o en cualquier otro líquido corporal estéril está plenamente justificada. Sin embargo, debido a que los organismos levaduriformes forman parte de la flora normal de piel y mucosas, el aislamiento de levaduras a partir de hisopos nasofaríngeos, esputo, lavados bronquiales, orina, raspados de uñas, muestras vaginales o heces puede cuestionar su significado clínico. No obstante, el aislamiento reiterado de levaduras en diferentes muestras clínicas del mismo paciente es sugestivo de infección por el microorganismo aislado y requiere la identificación de la especie causal.

La identificación de las levaduras se puede llevar a cabo atendiendo a cuatro criterios diferentes: morfológicos, bioquímicos, inmunológicos o genéticos.

11.2. Identificación mediante criterios morfológicos

Los criterios morfológicos pueden ser, a su vez, macro o microscópicos.

11.2.1. Criterios macroscópicos

Estos criterios tienen en cuenta el aspecto de las colonias de levaduras al crecer en los diferentes medios de cultivo.

La mayoría de los organismos levaduriformes crecen fácilmente en un gran número de medios de cultivo usados rutinariamente en el laboratorio de Microbiología (agar sangre, agar chocolate, agar Cled, etc.). Sin embargo, el agar glucosado de Sabouraud (SDA), con o sin antibióticos añadidos, es el medio de aislamiento por excelencia para la

identificación de levaduras (Capítulo 3).

En el medio SDA las colonias de levaduras suelen ser completas, ligeramente abombadas o planas, de consistencia mantecosa, lisas (Figura 11.1) o rugosas (Figura 11.2), con olor dulzón agradable, volviéndose más pastosas a medida que envejecen.

Por lo general las colonias de levaduras no desarrollan micelio aéreo, aunque en ocasiones pueden aparecer prolongaciones aracneiformes en la periferia de las colonias. Si se observa un micelio aéreo definido, debe considerarse la posibilidad de que se trate de un hongo dimórfico o de ciertas especies de levaduras que pueden formar micelio verdadero como *Geotrichum* (Figura 11.3), *Trichosporon* (Figura 11.4) o *Blastoschizomyces*.

Una colonia de aspecto y consistencia mucóide sugiere la formación de cápsulas y puede ser el paso inicial para la identificación de *Cryptococcus neoformans* (Figura 11.5).

Las colonias de color rojo-anaranjado o naranja, de aspecto cremoso o rugoso, son características de las especies del género *Rhodotorula* (del gr. *rhodo*, rojo) (Figura 11.6), color que manifiesta esta levadura por su riqueza en carotenoides.

Pero no todas las colonias blancas y cremosas son levaduras; las especies de algas aclorofílicas del género *Prototheca*, tras incubación a 28 °C durante 3-4 días, desarrollan unas colonias blancas cremosas muy parecidas a las producidas por el género *Candida* (Figura 11.7).

11.2.2. Criterios microscópicos

Ciertas características microscópicas son muy útiles para la identificación de algunas especies de levaduras. Las más utilizadas en la práctica son las siguientes:

Prueba del tubo germinal o filamentación precoz

El tubo germinal es una extensión filamentososa de la levadura, sin estrechamiento en su origen,



Figura 11.1. Aspecto macroscópico de las colonias de *Candida albicans* en SDA.

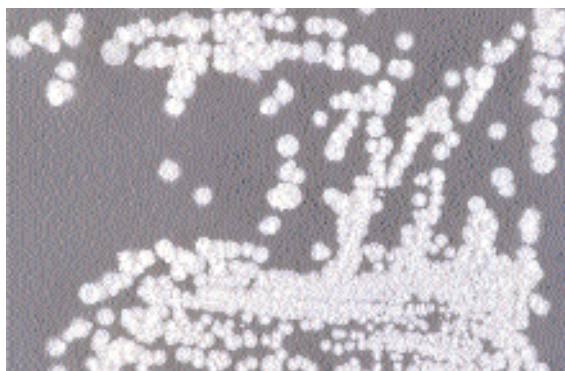


Figura 11.4. Aspecto macroscópico de las colonias de *Trichosporon beigelii* en SDA.

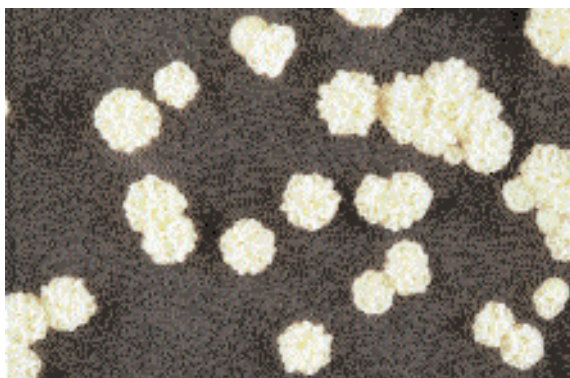


Figura 11.2. Aspecto macroscópico de las colonias de *Candida parapsilosis* en SDA.

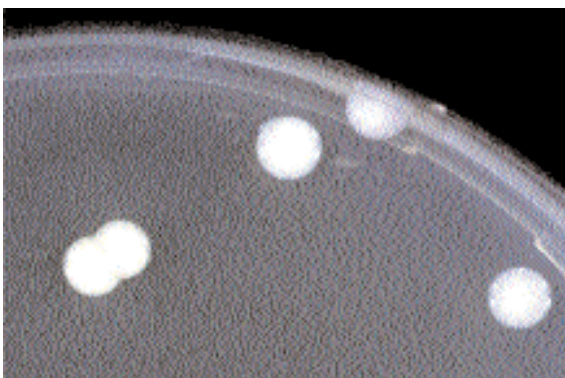


Figura 11.5. Aspecto macroscópico de las colonias de *Cryptococcus neoformans* en SDA.

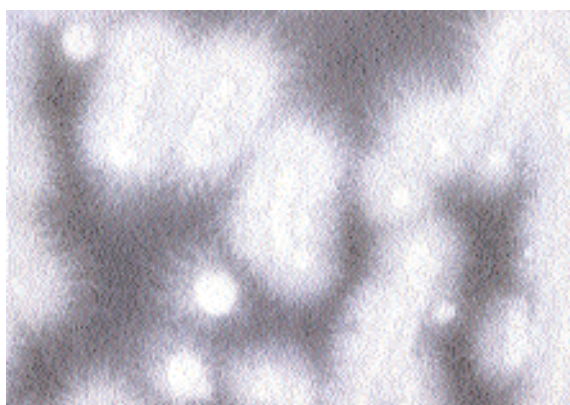


Figura 11.3. Aspecto macroscópico de las colonias de *Geotrichum candidum* en SDA.

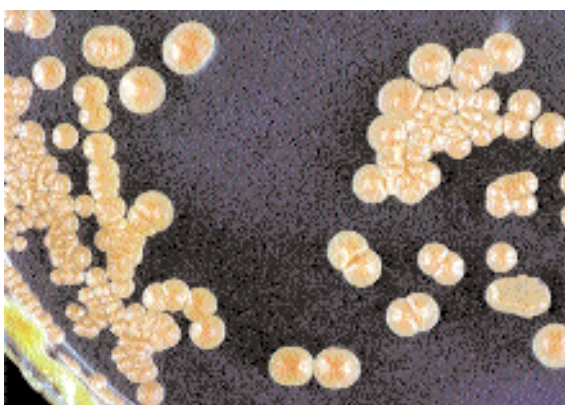


Figura 11.6. Aspecto macroscópico de las colonias de *Rhodotorula rubra* en SDA.

cuyo ancho suele ser la mitad de la célula progenitora y su longitud tres o cuatro veces mayor que la célula madre (Figura 11.8).

Sólo *C. albicans* es capaz de producir verdaderos tubos germinales; sin embargo, otras especies como *C. tropicalis* pueden producir pseudohifas precoces de aspecto similar a los tubos germinales pero con una zona de constricción característica

Falsos negativos

- Aproximadamente un 5% de cepas de *C. albicans* son negativas para tubos germinales.
- Si se utiliza un inóculo demasiado abundante de levaduras, también pueden obtenerse falsos resultados negativos.

adyacente a la célula madre, por lo que esta prueba es útil para diferenciar *C. albicans* del resto de las especies de *Candida*, aunque no está exenta de falsos negativos.

Metodología

1. Emulsionar una porción de la colonia aislada en 0,5 ml de suero humano o de conejo.
2. Incubar a 35 °C durante 2 h.
3. Depositar una gota de la emulsión sobre un portaobjetos limpio y desengrasado, colocar un cubre-objetos y visualizar a x100, x400 ó x1.000.

Interpretación

La prueba es positiva si se visualizan tubos germinales (Figura 11.8).

Variantes

Además de la técnica con suero, el test de filamentación puede realizarse utilizando otros medios de cultivo:

- a) Plasma de conejo:** Berardinelli y Opheim [1] describieron un medio de inducción de tubos germinales constituido por tres partes de coagulasa plasmática de conejo con EDTA (BBL Microbiology Systems) y dos partes de caldo Try-Soy (Scott Laboratories, Inc). La inoculación, incubación e interpretación son similares a la técnica con suero.
- b) Medio de cultivo sólido Oxgall-Tween-ácido cafeico (TOC):** [Oxgall 10 g, agar 20 g, Tween 80 (solución al 10%) 10 ml, ácido cafeico 0,3 g, agua destilada 1.000 ml]. La utilización de este medio permite la visualización del tubo germinal y también de clamidosporas [2]. Para su realización se estría una pequeña porción de la colonia sobre al agar TOC y a continuación se

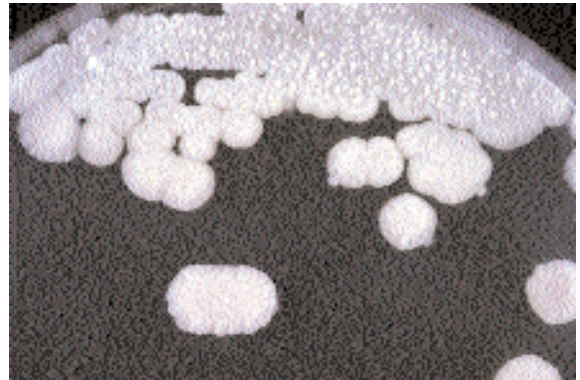


Figura 11.7. Aspecto macroscópico de las colonias de *Prototheca wickerhamii* en SDA.

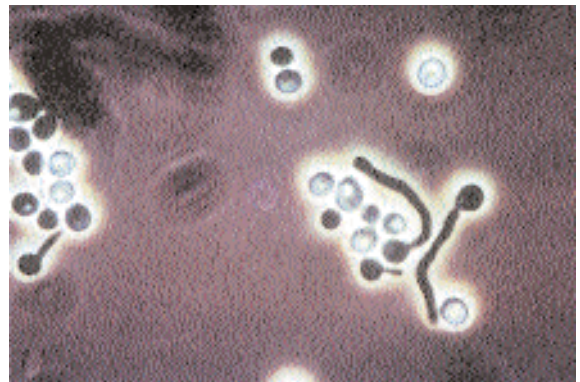


Figura 11.8. Producción de tubo germinal o filamentación precoz por *Candida albicans*.

coloca con suavidad un cubre-objetos estéril (flameándolo suavemente) sobre la superficie inoculada (para evitar la acumulación de humedad es preciso no presionar el cubre-objeto sobre la superficie del agar). Se incuba a 35 °C, en 10% de CO₂, durante 2 h, manteniendo la tapa de la placa ligeramente abierta para que todo el cultivo sea alcanzado por el CO₂. La prueba es positiva si se visualizan los tubos germinales en la zona de inoculación a bajo aumento (x100-x400).

Formación de hifas, blastoconidias, clamidosporas y artrosporas

La formación de hifas, blastoconidias, clamidosporas o artrosporas por parte de las levaduras constituye una característica morfológica de gran importancia para la identificación de algunas especies de levaduras.

Ante la presencia de estructuras con aspecto de **hifas**, lo primero que hay que determinar es si se trata de pseudohifas (resultantes del proceso de for-

mación de blastoconidias y, por tanto, con puntos regulares de estrechamiento) o, por el contrario, son verdaderas hifas que se fragmentan en artroconidias. Si el desarrollo en medios especiales (ver más adelante) revela la presencia de pseudohifas y blastoconidias, la levadura a identificar pertenece a alguna especie del género *Candida*. Si por el contrario, revela verdaderas hifas y artroconidias, lo más probable es que se trate de especies de *Trichosporon*, *Geotrichum* o *Blastoschizomyces*.

Trichosporon y *Blastoschizomyces* producen tanto **artroconidias** como **blastoconidias**; estas últimas nacen en brotes de los ángulos de las artroconidias adquiriendo la forma característica de “oreja de conejo” (Figura 11.9). Las especies del género *Geotrichum* también producen blastoconidias a partir del ángulo de la artroconidia, pero, en este caso, forman una estructura denominada “palo de hockey” (Figura 11.10). *C. tropicalis* produce pequeñas cantidades de blastoconidias, muy esparcidas o en pequeños grupos a lo largo de las hifas. Sin embargo, *C. parapsilosis*, *C. kefyr* y *C. krusei* se ordenan a lo largo de una corriente de blastoconidias, siendo esta la característica que permite su identificación; además, algunas cepas pueden producir hifas gigantes.

Las **clamidosporas** son formas de resistencia, redondas u ovales, de 6-12 μm de diámetro y pared gruesa, con aspecto de esporas laterales o terminales. Su producción es característica y diagnóstica de *C. albicans* [3] (Figura 11.11). También puede hacerse una identificación presuntiva de esta especie si se observa la formación de grupos compactos de blastoconidias, a intervalos regulares, a lo largo de la pseudohifa.

Metodología

Agar harina de maíz

Agar harina de maíz

Procedimiento

1. La inoculación se debe realizar, según la técnica de Dalmau [4], haciendo tres cortes paralelos en el agar (separados 1 cm) manteniendo el asa en un ángulo aproximado de 45°.
2. Colocar un cubre-objeto sobre la superficie de agar cubriendo una parte de las estrías de siembra.
3. Incubar las placas sembradas a 30 °C durante 24-48 h y luego examinar al microscopio a través del cubre-objetos a x100, x400 ó x1.000 (Figura 11.11).

A este medio comercializado (Oxoid) debe agregarse Tween 80 (polisorbato) a una concentra-

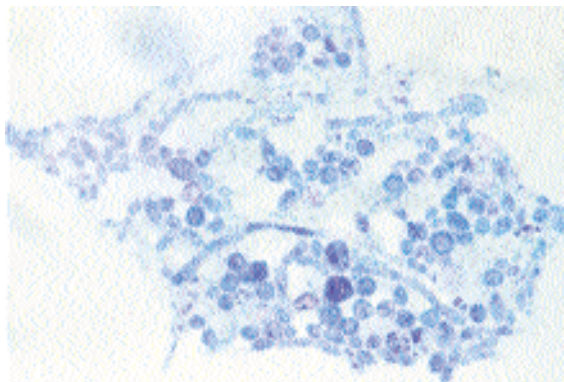


Figura 11.9. Aspecto microscópico de *Trichosporon beigeli* (x1.000) que muestra artrosporas y blastosporas.

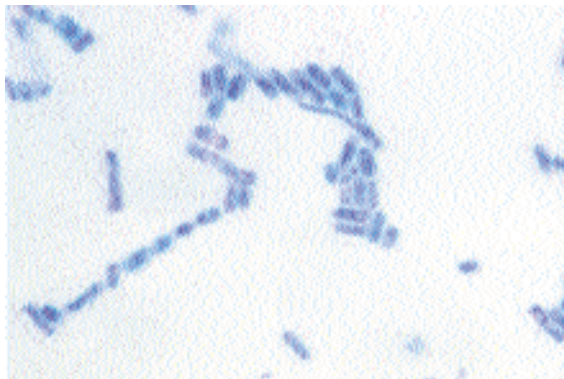


Figura 11.10. Aspecto microscópico de *Geotrichum candidum* (x1.000).

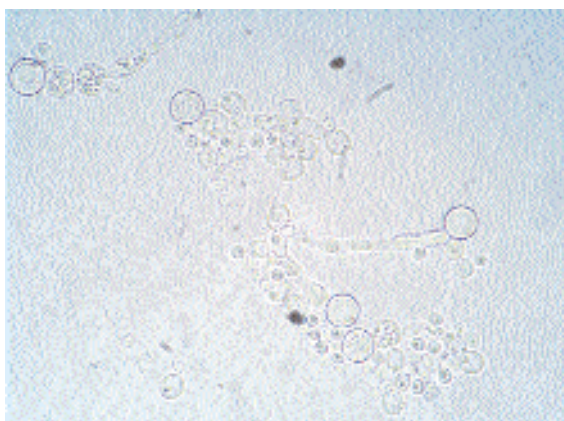


Figura 11.11. Formación de pseudomicelio y clamidosporas por *Candida albicans* (x400).

ción final de 0,02% para reducir la tensión superficial y aumentar la formación de hifas y blastoconidias (Capítulo 3) [3].

TOC

Este medio confirma la determinación de tubo germinal y clamidosporas en agar. Si no se observan tubos germinales una vez realizada la primera lectura a las 2 h de incubación, a 35 °C y en atmósfera de O₂, la placa puede incubarse durante 24-48 h más para visualizar el desarrollo de clamidosporas [2].

Leche diluida

En 1976 Feo y Pacheco [5], estudiando por separado el perfil de los componentes del medio lactimel (leche + harina de trigo + miel) en la formación de clamidosporas, comprobaron que la

Leche diluida
<p>Procedimiento</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Emulsionar una colonia joven en 3-4 ml del medio. 2. Incubar a 28-30 °C durante 24-48 h. 3. Observar al microscopio a x100 ó x400 una gota de la emulsión. <p>Interpretación</p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>C. albicans</i> desarrolla abundantes pseudomicelios y clamidosporas (Figura 11.11).

leche entera (pasteurizada y homogeneizada) favorecía la producción de las mismas, por lo que propusieron un nuevo medio para su detección: el medio de leche diluida (leche natural 170 ml, agua destilada 1.000 ml, cloranfenicol 0,25 g).

Según nuestra experiencia, el medio de leche diluida es excelente para la investigación de clamidosporas, blastoconidias, hifas, pseudohifas y artrosporas. Estas características unidas a su fácil obtención y bajo coste le convierten en un medio muy recomendable en la rutina de un laboratorio de Micología para la detección de estas formaciones microscópicas [3].

Tinciones

El estudio microscópico de los organismos levaduriformes o microorganismos relacionados (género *Prototheca*) se puede llevar a cabo mediante tinciones, ya sea tinción simple (Figuras 11.12 y 11.13) o tinción de Gram (Figura 11.14); con esta tinción, las levaduras suelen comportarse como Gram positivas (Capítulo 14).

Mediante estas tinciones también se puede

observar la formación de blastosporas, artrosporas, hifas, pseudohifas o endosporas (autoesporas esféricas de 4-11 µm de diámetro incluidas en una teca, que puede visualizarse también vacía); estas últimas son típicas de las especies del género *Prototheca* (Figura 11.15).

11.3. Identificación mediante criterios bioquímicos

11.3.1. Criterios bioquímicos enzimáticos

Medios cromogénicos

Estos medios están diseñados para el aislamiento e identificación de algunas especies del género *Candida* tras su incubación a 30-37 °C durante 24 a 48 h.

El fundamento de los mismos se basa en la detección de determinadas actividades enzimáticas por parte de las levaduras mediante la hidrólisis específica de un sustrato cromogénico en presencia de un indicador de la enzima. Una de las principales ventajas de estos medios es permitir diferenciar fácilmente los cultivos mixtos.

Estos medios pueden ser utilizados como medios de aislamientos primarios o con fines de identificación, después del aislamiento de los organismos levaduriformes en los medios convencionales. Aunque, según nuestra experiencia, sólo debería utilizarse como medio de aislamiento primario en aquellas muestras con alta sospecha de micosis por levaduras.

CHROMagar Candida®

El medio CHROMagar Candida (CHROMagar) fue descrito por Odds y Bernaerts en 1994 para identificar las especies clínicamente importantes del género *Candida* [6]. CHROMagar Candida permite diferenciar *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, y *C. glabrata* en función de los colores que desarrollan en este medio.

La siembra se realiza según las técnicas tradicionales y las placas se incuban a 30-37 °C durante 48 h para que las levaduras desarrollen completamente el color. Al cabo de este tiempo, las colonias de *C. albicans* son lisas y de color verde esmeralda, a diferencia de *C. dubliniensis* que desarrolla un color verde oscuro y que, además, es incapaz de crecer a 45 °C [7]. *C. tropicalis* produce

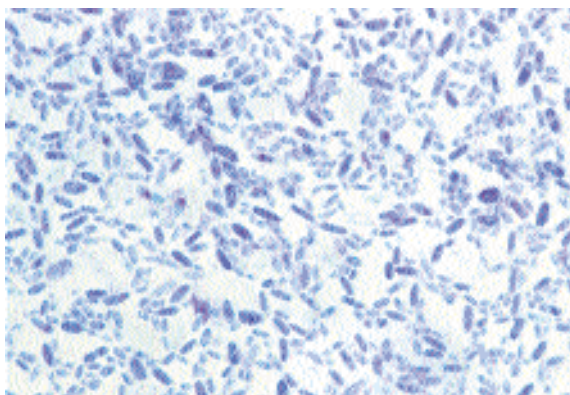


Figura 11.12. Aspecto microscópico de *Candida parapsilosis*. Tinción simple con azul de metileno (x1.000).

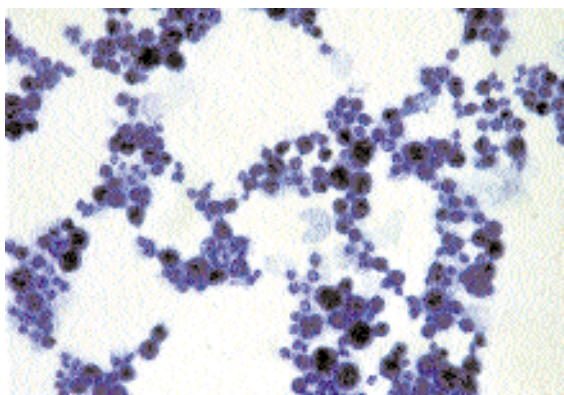


Figura 11.15. Aspecto microscópico de *Prototheca wickerhamii* (x1.000). Se observan las endosporas y las tecas vacías.

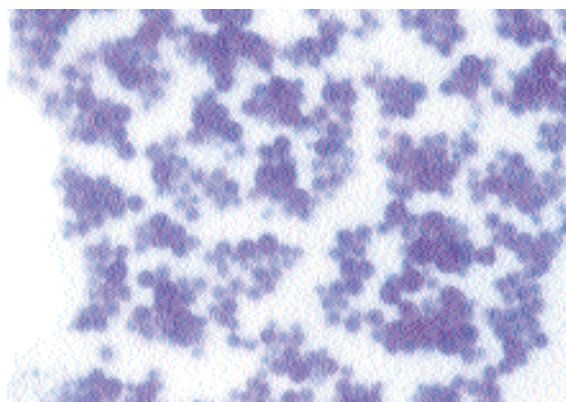


Figura 11.13. Aspecto microscópico de *Cryptococcus neoformans*. Tinción simple con azul de metileno (x1.000).



Figura 11.16. Crecimiento en CHROMagar Candida de *C. albicans* (verde) *C. tropicalis* (azul), *C. krusei* (rosa y rugosa), *C. parapsilosis* (rosacea-lisa), *Prototheca wickerhamii* (crema).

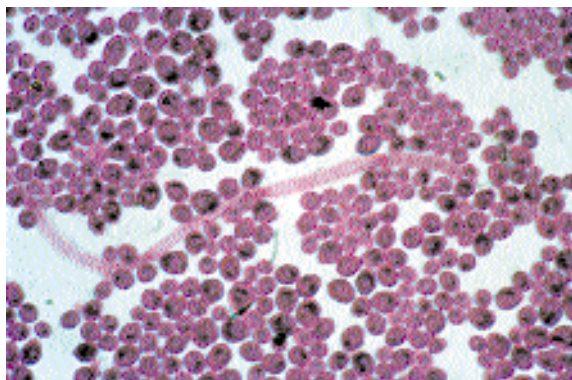


Figura 11.14. Aspecto microscópico de *Candida albicans*. Tinción de Gram (x1.000).

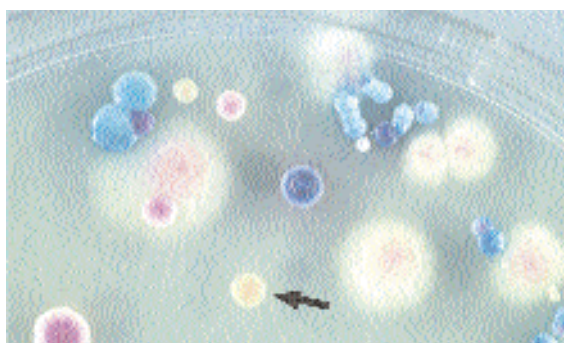


Figura 11.17. Crecimiento en CHROMagar Candida de *C. albicans* (verde) *C. tropicalis* (azul), *C. krusei* (rosa y rugosa), *C. parapsilosis* (rosacea-lisa) y *Prototheca wickerhamii* (crema, flecha).

colonias azul oscuro con un halo púrpura-marrón en el agar que la rodea. *C. krusei* forma colonias rugosas con el centro rosado y el borde blanco. *C. glabrata* manifiesta un color violeta morado. Las demás especies desarrollan colores y tonalidades diversas que no permiten su identificación por este medio (Figuras 11.16 y 11.17).

Cromogen Albicans®

Cromogen Albicans (Biomedics) es un medio diferencial y selectivo utilizado para el aislamiento e identificación de *C. albicans* en muestras vaginales, rectales, escamas, orina, pus, escobillonados bucales, etc.

La siembra se realiza según las técnicas habituales y las placas se incuban a 30-37 °C, según el origen de las muestras, durante 24-48 h.

Las colonias de *C. albicans* adquieren un color azul verdoso característico, dependiendo del periodo de incubación y la temperatura, con formas redondeadas, lisas y ligeramente elevadas. Las otras especies de levaduras aparecen de color blanco cremoso y necesitan una identificación bioquímica posterior.

Candida ID®

El medio Candida ID (bioMérieux) es un medio cromogénico que permite el aislamiento de organismos levaduriformes, la identificación presuntiva de *C. albicans* y cierta orientación para la identificación de otras especies no *albicans*.

La inoculación e incubación son similares a las descritas para otros medios cromogénicos. En Candida ID, las colonias de *C. albicans* son redondeadas, ligeramente convexas, lisas, de bordes netos y de color azul (cuya intensidad varía en función del tiempo de incubación). Las colonias de *C. tropicalis*, *C. lusitaniae*, *C. guilliermondii* y *C. kefyr* desarrollan un color rosa a las 48 h de incubación. Otras especies, como *C. famata*, *C. humicola*, y *Cryptococcus neoformans*, pueden originar colonias rosas más o menos intensas. El resto de las especies desarrolla un color blanco-crema, requiriendo una identificación bioquímica posterior (Figura 11.18).

Albicans ID2®

El medio Albicans ID2 (bioMérieux) es muy parecido al anterior. Se ha enriquecido la fórmula para facilitar el aislamiento y la identificación de las colonias de *C. albicans* que desarrollan un color azul más intenso. Además, permite la identificación presuntiva de *C. tropicalis* ya que presenta una tonalidad verdosa en este medio. Las colonias de las demás especies son de color blanco.

La inoculación e incubación son similares al medio anterior.

CandiSelect®

El medio CandiSelect (Bio-Rad) es un medio selectivo que permite la identificación de *C. albicans* mediante la hidrólisis del sustrato cromogénico presente lo que origina el desarrollo de un color azul



Figura 11.18. Crecimiento de *Candida albicans* (colonias azules) en el medio Candida ID (bioMérieux) el resto de las especies se manifiesta de color rosa o blanco.

por las colonias de esta especie.

La inoculación e incubación son similares a los otros medios cromogénicos. *C. albicans* se identifica por la presencia de colonias lisas azules y el resto de las levaduras manifiesta un color blanco en sus colonias. A las 48 h de incubación, algunas cepas de *C. tropicalis* y *Trichosporon* spp. pueden también desarrollar colonias azules, pero morfológicamente son diferentes a *C. albicans*.

Fluoroplate Candida®

El Agar Fluoroplate Candida (Merck) permite identificar macroscópicamente *C. albicans* por su capacidad de hidrolizar el sustrato 4-metilumbeliferil-N-acetil-β-D-galactosaminida, por la enzima N-acetil-galactosaminidasa (NAGasa), originando una fluorescencia blanquecina al iluminar la placa con luz ultravioleta. El resto de las especies no presenta fluorescencia.

La siembra en este medio se realiza de forma convencional y las placas se incuban a 30-37 °C durante 18-24 h. La lectura se realiza, en la oscuridad, colocando las placas sobre un transiluminador de luz ultravioleta de 365 nm (Linus).

Agar SDCA-MUAG®

El agar SDCA-MUAG (Biolife) es un medio muy parecido al anterior en cuya composición está presente, como sustrato, el 4-metilumberiferil-2-acetamida-2-desoxi-b-D-galactosaminida. Se interpreta de igual forma por la aparición de fluorescencia difusible de las colonias de *C. albicans*, emitida al iluminarse con luz ultravioleta a 365 nm.

Sistemas enzimáticos comercializados para la identificación rápida de *C. albicans*

En el mercado existen varios sistemas enzimáticos comercializados para la identificación rápida de *C. albicans* a partir de una colonia aislada en cualquiera de los medios convencionales. En todos ellos se detecta una o dos enzimas (β -galactosaminidasa y L-prolina aminopeptidasa), sólo presentes en *C. albicans* [8].

Para la detección de estas enzimas, los sistemas comerciales pueden utilizar sustratos fluorogénicos o cromogénicos.



Figura 11.19. Sistema BactiCard Candida (Remel).

Sistemas enzimáticos que utilizan sustratos fluorogénicos

Para su utilización, todos estos sistemas requieren el empleo de una lámpara de luz ultravioleta de 365 nm (Linus).

BactiCard Candida®

La tarjeta BactiCard Candida (Remel) integra

BactiCard	
Procedimiento	
<ol style="list-style-type: none">1. Inocular sólo una cepa en cada tarjeta.2. Rehidratar cada círculo de la tarjeta con 1 gota del fluido rehidratante BactiCard Candida (sin sobrepasar el área del test).3. Inocular cada círculo de la tarjeta con un inóculo visible del aislamiento a identificar utilizando la varilla aplicadora.4. Incubar la tarjeta inoculada durante 5 min a temperatura ambiente.5. Añadir 1 gota de BactiCard <i>Color Developer</i> al círculo del test PRO y observar el color desarrollado a los 30 segundos:<ul style="list-style-type: none">•Positivo: Color rojo.•Negativo: No hay cambio de color.6. Añadir 1 gota del reactivo MUGAL BactiCard al círculo del test MUGAL.7. Observar este último círculo en oscuridad con una lámpara de luz ultravioleta:<ul style="list-style-type: none">•Positivo: Azul fluorescente brillante.•Negativo: No hay fluorescencia.	
<ul style="list-style-type: none">• Además de BactiCard Candida, existen otros sistemas comercializados [8] que detectan estas enzimas y cuyo procesamiento e interpretación de resultados es muy similar (Tabla 11.1).	

Tabla 11.1. Sistemas enzimáticos comercializados para la identificación rápida de <i>C. albicans</i> utilizando sustratos cromogénicos ^a .		
Nombre comercial	Sustrato	Tiempo incubación (Temperatura)
Albicans-Sure (Clinical Standars Labs)	4MU ^c N-acetil galactosaminida P-dimetilcinnamaldehido	5 min (ambiente)
Albistrip (Lab M. Ltd)	4MU N-acetil galactosaminida Prolina-p-nitroanilida	5 min (37 °C)
BactiCard Candida (Remel)	4MU N-acetil galactosaminida P-dimetilcinnamaldehido	5 min (ambiente)
RapID Albicans (Biolife)	4MU N-acetil galactosaminida P-dimetilcinnamaldehido	2 h (37 °C)
MUAG test ^b (Biolife)	4MU N-acetil galactosaminida	3 min (ambiente)
<small>a: Detectan β-galactosaminidasa y L prolina aminopeptidasa. Se necesita lámpara de luz ultravioleta. b: Sólo detecta β-galactosaminidasa. c: Metil Umbeliferil.</small>		

dos tests independientes para detectar la presencia de las enzimas β -galactosidasa (MUGAL) y L-prolina aminopeptidasa (PRO). La enzima MUGAL tiene la capacidad de hidrolizar el sustrato 4-metilumbeliferil-N-acetil- β -D-galactosaminida y producir la liberación de 4-metilumbeliferona que es una sustancia fluorescente capaz de ser detectada al iluminarse con luz ultravioleta de 365 nm. La enzima PRO hidroliza al sustrato L-prolina- β -naftilamida y reacciona con el *Color Developer* originando un color rojo (Figura 11.19).

Sistemas enzimáticos que utilizan un sustrato cromogénico

Estos sistemas utilizan sustratos cromogénicos para detectar las enzimas MUGAL y PRO por lo que no requieren el uso de la lámpara de luz ultravioleta. Entre ellos destacan:

Candida albicans Screen (Remel)

Utiliza como sustratos p-nitrofenil-N- β -acetil β -D galactosaminida y p-dimetilcinnamaldehído. Requiere una incubación de 90 min a temperatura ambiente.

Murex *C. albicans* CA50 (Murex Diagnostic)

Utiliza como sustratos p-nitrofenil-N- β -acetil β -D galactosaminida y p-dimetilcinnamaldehído. Requiere una incubación de 30 min a 37 °C.

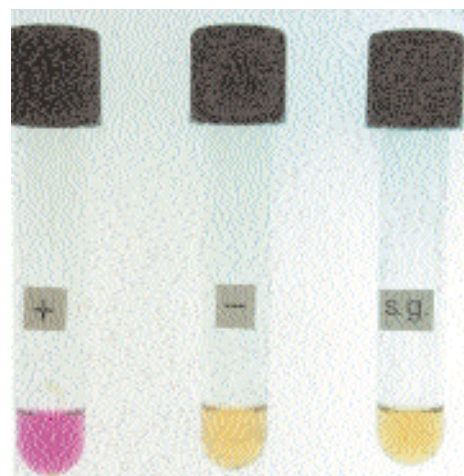


Figura 11.20. Prueba de la ureasa.

Identificación de *Cryptococcus neoformans* por métodos enzimáticos

Detección de ureasa

Una levadura con reacción positiva a la prueba de la ureasa es sugestiva de pertenecer al género *Cryptococcus*. Concretamente, las cepas de *C. neoformans* que son grandes productores de ureasa, comienzan a provocar cambio de color a las 2 h de

Ureasa
<p>Procedimiento</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Pasar la punta de un aplicador de algodón, impregnado con agar base ureasa de Christensen, sobre la superficie de dos o tres colonias aisladas del microorganismo a estudiar, de un cultivo de 48 a 72 h en cualquiera de los medios habituales. 2. Colocar el aplicador inoculado en un tubo con 3 gotas de cloruro de benzalconio al 1% (ajustar el pH a 4,8). 3. Presionar con fuerza la punta del hisopo contra el fondo del tubo para que se desprendan los microorganismos contenidos en las fibras de algodón. 4. Tapar el tubo e incubar a 45 °C. 5. Examinar el tubo a los 10, 15, 20 y 30 min. <p>Interpretación</p> <ul style="list-style-type: none"> • El desarrollo de un color rojo-púrpura, indica el resultado positivo de la prueba (Figura 11.20).

Nitrato-reductasa
<p>Procedimiento</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Pasar la punta de un aplicador por la superficie de 2-3 colonias aisladas de un cultivo de 48-72 h de crecimiento en cualquiera de los medios habituales. El hisopo inoculado se presiona con firmeza contra el fondo de un tubo vacío para que se desprendan los microorganismos contenidos en la fibra de algodón. 2. Incubar el tubo con el hisopo a 45 °C durante 10 min. 3. Sacar el hisopo y agregar al tubo 2 gotas de alfa-naftlamida y 2 gotas de ácido sulfanílico. 4. Reintroducir el hisopo en el tubo para que absorba los reactivos. <p>Interpretación</p> <ul style="list-style-type: none"> • El desarrollo inmediato de un color rojo indica una reacción positiva (Figura 11.21).

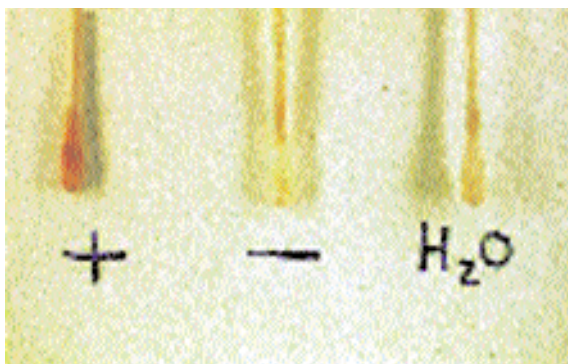


Figura 11.21. Prueba de la nitrato-reductasa.

incubación a 35 °C.

Esta prueba también puede utilizarse para diferenciar *Trichosporon* de *Geotrichum*; la mayoría de las especies de *Trichosporon* son ureasa (+) mientras que las de *Geotrichum* son ureasa (-).

Fenol-oxidasa
Procedimiento <ol style="list-style-type: none"> 1. Sembrar 2-3 colonias de un cultivo joven en el medio de TOC. 2. Incubar a 37 °C durante 3-5 días.
Interpretación <ul style="list-style-type: none"> • El desarrollo de una pigmentación marrón oscura alrededor del crecimiento es característico de <i>C. neoformans</i>. (Figura 11.22).



Figura 11.22. Prueba de la fenol-oxidasa (Medio de TOC). Producción de pigmento marrón oscuro por *C. neoformans*.

Prueba de la enzima Nitrato-reductasa

La capacidad de *C. neoformans* de reducir nitratos a nitritos es una prueba de utilidad cuando se pretende identificar esta levadura (Figura 11.21).

Prueba de la Fenol-Oxidasa

C. neoformans produce fenol-oxidasa, una enzima necesaria para el metabolismo de la 3,4-dihidroxifenilalanina (DOPA) y otros compuestos fenólicos en la síntesis de la melanina. Esto se evidencia por la producción de un pigmento marrón oscuro o negro alrededor de la colonia de *C. neoformans* en el medio de TOC (Apartado 11.2.2).

11.3.2. Identificación basada en métodos de asimilación de nutrientes

Auxonograma convencional

Se fundamenta en la aplicación por separado de diferentes nutrientes, hidrocarbonados o nitroge-

Auxonograma
Procedimiento <ol style="list-style-type: none"> 1. La levadura en estudio se siembra previamente en caldo glucosado de Sabouraud más cloranfenicol a 28 °C durante 48 h. 2. Agitar para mezclar el cultivo y tomar 1 ml como inóculo del medio sintético fundido. Enfriar a 50 °C, mezclar y verter en placa. 3. Preparar las soluciones estériles de los nutrientes, los azúcares al 10% y las sustancias nitrogenadas al 1%. 4. Una vez solidificado el agar, y con la ayuda de un tubo de cristal, agujerear 5-6 pocillos por placa. Sobre cada pocillo se vierten dos gotas de los distintos nutrientes en estudio. 4. ^{bis} Si se utilizan discos de papel absorbente, deben confeccionarse de distintos colores o rotularse previamente. Una vez esterilizados, y antes de su empleo, se empapan con dos gotas de las soluciones acuosas de los nutrientes (al 20% para los azúcares y al 2% para los substratos nitrogenados). Se secan en estufa y se aplican sobre el medio con pinzas estériles. 5. Incubar a 28 °C. (2-4 días).
Interpretación <ul style="list-style-type: none"> • En la zona circulante a los pocillos o los discos, crecen abundantes colonias de levaduras si utilizan el nutriente correspondiente; por el contrario, no aparecen en los contornos de los no utilizados. • La intensidad del cultivo periférico se expresa mediante cruces: 5 mm de radio (+), 5-10 mm (++), >10 mm (+++).

nados, sobre un medio sintético base para apreciar el crecimiento selectivo de una levadura en la cercanía de los nutrientes necesarios para su desarrollo.

Para su realización pueden emplearse soluciones acuosas esterilizadas por filtración, cilindros de Oxford en pocillos hechos en el agar o bien discos de papel absorbente empapados con el nutriente. Sin embargo, las pruebas de asimilación en medios líquidos no ofrecen ninguna ventaja adicional sobre los medios sólidos, resultando mucho más laboriosas y costosas.

Medios de cultivo base: Se prepararan según la técnica habitual y no necesitan ajustar el pH. Se expenden deshidratados como medios base de levaduras. Los más utilizados son los siguientes:

1. Medio sin carbono: Sulfato amónico (5 g/l), Fosfato monopotásico (1 g/l), Sulfato de magnesio (0,5 g/l), Agar (20 g/l).
2. Medio sin nitrógeno: Glucosa (20 g/l), Fosfato monopotásico (1 g/l), Sulfato de magnesio (0,5 g/l), Agar (20 g/l).



Figura 11.23. Sistema Auxacolor® (Bio-Rad).

La galería Auxacolor (Bio-Rad) es un sistema de identificación basado en la asimilación de 13 azúcares que permite identificar 26 especies diferentes de levaduras. El crecimiento de la levadura se visualiza por el cambio de un indicador de pH. La

Auxacolor
Procedimiento
<ol style="list-style-type: none">1. Realizar una suspensión, equivalente a 1 McFarland con un cultivo joven (24-48 h) de la levadura a identificar, en el vial con medio de suspensión facilitado por el fabricante.2. Inocular la galería y cubrir con papel adhesivo.3. Incubar a 30 °C durante 24-48 h (prolongar hasta 72 h si fuese necesario).
Interpretación
<ul style="list-style-type: none">• El cambio de color (amarillo) se interpreta como crecimiento positivo para el azúcar en cuestión. Los 15 caracteres bioquímicos de la galería se agrupan en tripletes para obtener un código numérico. Para ello, se adjudica un valor de 1 para la posición 1ª del triplete, 2 para la 2ª y 4 para la 3ª. La identificación de la levadura se consigue comparando el código numérico resultante con los suministrados por el fabricante.

Como fuente de carbono se puede ensayar todos los azúcares y alcoholes conocidos. Como sustrato de nitrógeno se suele emplear peptona, asparagina, urea, sulfato amónico, nitrato de potasio y aminoácidos diversos.

Auxacolor®

Uni-Yeast-Tek
Procedimiento
<ol style="list-style-type: none">1. A partir de un cultivo de 24-48 h en medios habituales, realizar una suspensión en agua destilada estéril equivalente a 4 McFarland. Inocular cada uno de los compartimentos con una gota de esta suspensión.2. El compartimiento con agar harina de maíz se siembra, con una pequeña porción de la colonia, haciendo dos o tres surcos paralelos con aguja de inoculación. Seguidamente, se coloca un cubreobjeto flameado sobre el área inoculada.3. Incubar a 30-35 °C durante 2-7 días.
Interpretación
<ul style="list-style-type: none">• La observación de cambio de color del azul al amarillo indica asimilación de los hidratos de carbono.• El medio de nitrato se interpreta como reducción cuando el color azul original vira al color verde o verde azulado.• La detección de hifas, blastosporas y clamidosporas en el agar harina de maíz se detecta mediante visualización a x400.



Figura 11.24. Sistema Uni-Yeast-Tek (Remel).

galería incorpora, además, una prueba de resistencia a la actidiona y otra para la detección de la actividad fenol-oxidasa de *C. neoformans* (Figura 11.23).

Sistema Uni-Yeast-Tek®

El sistema Uni-Yeast Tek (Remel) está constituido por una placa plástica con múltiples compartimentos que contienen un medio con agar para la asimilación diferencial de siete hidratos de carbono. También incorpora una cubeta central con agar harina de maíz-Tween 80 para determinar el crecimiento micelial y la producción de clamidosporas. Además, está provisto de agar urea, agar para la asimilación y reducción de nitratos y de un caldo con extracto de carne al 2,6% (con 0,05% de glucosa) para realizar la prueba del tubo germinal (Figura 11.24).



Figura 11.25. Sistema API 20C AUX (bioMérieux).

API 20C AUX

Procedimiento

1. A partir de un cultivo joven de la levadura a identificar, realizar una suspensión en 2 ml de agua destilada estéril hasta obtener una turbidez igual a 2 de McFarland.
2. Transferir 100 µl (2 gotas) de esta suspensión a una ampolla de C Medium y homogeneizar evitando la formación de burbujas.
3. Llenar las cúpulas con la suspensión anterior evitando la formación de burbujas y creando un nivel horizontal para generar resultados correctos.
4. Incubar a 30 °C durante 48-72 h.

Lectura e interpretación

- Observar el crecimiento de las levaduras en comparación con la cúpula del control negativo. Una cúpula más turbia que el testigo indica una reacción positiva que debe anotarse en la hoja de resultados. En esta última, los diferentes nutrientes están separados en grupos de tres y se adjudica a cada uno, en caso de ser positivo, un valor diferente: 1 para el primero, 2 para el segundo y 4 para el que ocupa el tercer lugar. Sumando cada triplete se obtiene un número de siete cifras que constituye el perfil numérico.
- La identificación debe hacerse mediante el Catálogo Analítico o el Programa Informático de Identificación suministrado por el fabricante.

11.3.3. Sistemas semiautomáticos

En la actualidad se han comercializado diversos métodos de asimilación de nutrientes que simplifican tanto su uso como su interpretación [9].

API 20C AUX®

La galería API 20 C AUX (bioMérieux) se compone de 20 cúpulas con sustratos deshidratados que permiten realizar 19 pruebas de asimilación. Las cúpulas se inoculan con un medio mínimo semi-sólido y las levaduras sólo se reproducen si son capaces de utilizar el sustrato correspondiente (Figura 11.25). Permite identificar un total de 34 especies diferentes.

La lectura de estas reacciones se hace por comparación con un control de crecimiento y la identificación se obtiene, a partir de un código numérico, mediante un catálogo analítico o un programa informático.

Galería ID 32C®

Galería ID 32C

Procedimiento

1. Realizar una suspensión de un cultivo joven de la levadura a identificar en 2 ml de agua destilada estéril, hasta obtener una turbidez igual a 2 de McFarland.
2. Transferir 250 µl (5 gotas) de esta suspensión a una ampolla de C Medium y homogeneizar.
3. **Inoculación manual:** Dispensar 135 µl de la suspensión anterior en cada cúpula.
- 3^{bis}. **Inoculación automática:** Colocar sobre el portagalerías del inoculador ATB la galería y la suspensión en la ampolla de C Medium; el inoculador realizará automáticamente la homogeneización de la ampolla y el llenado de las cúpulas (135 µl/cúpula).
4. Incubar a 30 °C. durante 24-48 h.

Lectura e interpretación

1. **Lectura visual:** Observar el crecimiento de las levaduras en comparación con la cúpula 0 (testigo negativo). Una cúpula más turbia que el testigo indica una reacción positiva que debe anotarse en la hoja de resultados. En esta última, los tests están separados en grupos de tres y se adjudica a cada uno en caso de positividad un valor diferente, 1 para el primero, 2 para el segundo y 4 para el que ocupa el tercer lugar; sumando cada triplete se obtiene un número de siete cifras que constituye el perfil numérico. La identificación se obtiene con el programa de identificación (Figura 11.27).
2. **Lectura automática con ATB Expression o mini API:** El lector busca en cada cúpula la presencia de crecimiento y transmite los datos al ordenador que, una vez procesados, propone la identificación de la especie.

La galería ID 32 C (bioMérieux) está compuesta por diferentes pruebas de asimilación y por una base de datos especialmente adaptada (Figura 11.26). Permite identificar 63 especies diferentes de organismos levaduriformes o relacionados y puede ser utilizada manualmente o bien de forma automatizada mediante los sistemas ATB Expression o mini API.

La galería se compone de 32 cúpulas: 29 contienen cada una un sustrato carbonado deshidratado, una es el control negativo, otra detecta la sensibilidad a la cicloheximida y la última es una prueba colorimétrica para la esculina.

El procedimiento para la inoculación de la galería, incubación e interpretación es similar al descrito para el sistema API 20 C AUX. La única diferencia es la posibilidad de realizar la lectura de la galería, de forma automática, mediante el sistema ATB Expression o mini API.



Figura 11.26. Galería ID 32C (bioMérieux).

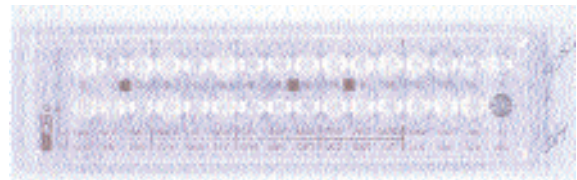


Figura 11.27. Lectura visual e interpretación de los resultados de la galería ID 32C.

Sistema Vitek

Procedimiento

1. Realizar una suspensión de un cultivo joven de la levadura a identificar en un tubo con 1,8 ml de solución salina estéril, hasta conseguir una turbidez 2 de McFarland.
2. Introducir la tarjeta y la suspensión de levaduras en el módulo de llenado, para que la inoculación de la tarjeta se realice de forma automática.
3. Colocar la tarjeta inoculada en el módulo incubador (30 °C).
4. A las 24 h, la lectura de la turbidez de las celdillas se realiza automáticamente y se transfieren los datos al ordenador.

Interpretación

- Una vez que el patrón de las lecturas de turbidez se compara con los perfiles de la base de datos, se imprime la identificación del microorganismo.
- Una identificación aceptable es la que alcanza una confiabilidad 85%. Las levaduras identificadas con menos del 85% de confiabilidad deben ser evaluadas posteriormente valorando su morfología y otras pruebas suplementarias para lograr una identificación aceptable.

Sistema Vitek®

Las tarjetas Yeast Biochemical Card (YBC) del sistema Vitek (bioMérieux) permiten la identificación de organismos levaduriformes y afines de forma automatizada. Son unas tarjetas plásticas desechables que incluyen 30 celdillas: 26 pruebas bioquímicas convencionales y 4 controles. Por otra parte, el sistema Vitek consta de un módulo con cámara de vacío para inoculación de las tarjetas, un lector/incubador, un sistema automático de manipulación de tarjetas, un fotómetro para medir la densidad óptica, un ordenador central y una impresora.

El sistema Vitek permite identificar 36 especies diferentes de levaduras: 16 especies del género *Candida*, 6 *Cryptococcus*, 3 *Rhodotorula*, 2 *Trichosporon*, 3 *Geotrichum*, 2 *Prototheca*, *Hansenula anomala*, *Pichia ohmeri*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Yarrowia lipolytica*.

Sistema Vitek 2

Procedimiento

1. A partir de un cultivo joven de la levadura a estudiar, preparar una suspensión en solución salina (0,45%), ajustándola a la escala 2 de McFarland.
2. La inoculación de las tarjetas, el sellado y la incubación (30 °C) se realiza de forma totalmente automatizada.
3. A las 15 h se realiza la lectura e interpretación de los resultados, también de forma automática.

Rapid Yeast Identification Panel MicroScan

Procedimiento

1. A partir de un cultivo joven (18-24 h) en SDA, realizar una emulsión en 3 ml de agua destilada hasta conseguir la turbidez del Patrón MicroScan (aproximadamente 7-8 de la escala de McFarland).
2. Añadir, de forma automatizada, 50 µl de la suspensión anterior a cada uno de los pocillos que contienen sustratos y a los pocillos controles.
3. Cubrir el panel e incubarlo en atmósfera de CO₂ a 35-37 °C durante 4 h.

Lectura e Interpretación

- Añadir los reactivos correspondientes a cada pocillo, incluyendo los controles.
- La lectura se puede realizar de forma visual o automatizada. Los resultados se convierten en un número de nueve dígitos y la identificación se realiza utilizando el libro de Códigos de biotipos para levadura de MicroScan.

11.3.4. Sistemas automáticos

Sistema Vitek 2®

Biolog YT MicroPlate

Procedimiento

1. Subcultivar cada levadura a identificar en agar BUY (Biolog) durante 24-48 h a 25 °C.
2. Realizar una suspensión, ajustándola a 44-51% de transmitancia.
3. Inocular cada pocillo de la MicroPlate.
4. Incubar la placa a 30 °C durante 24, 48 y 72 h.
5. Transcurrido el tiempo indicado, leer mediante lector de placa a 590 nm de longitud de onda.

Interpretación

- La lectura e interpretación se realiza automáticamente mediante un software de análisis y un sistema experto avanzado.

El sistema Vitek 2 (bioMérieux) es un sistema totalmente automático para la detección del metabolismo fúngico que puede identificar levaduras y organismos afines en tan sólo 15 h. Está basado en tecnología de fluorescencia y se compone de las tarjetas de análisis con 63 pocillos, una consola satélite para la recogida de información, un módulo incubador, un módulo principal donde se procesa la información gracias a un software de análisis y un sistema experto avanzado.

El sistema Vitek 2 permite la identificación de 51 especies diferentes, incluida *C. dubliniensis*, y, al igual que los sistemas semiautomáticos, requiere pruebas adicionales (fundamentalmente morfológicas) en caso de baja discriminación.

Sistema Biolog YT MicroPlate®

El sistema Biolog YT MicroPlate (Biolog) permite la identificación de organismos levaduriformes mediante 94 pruebas bioquímicas, llegando a identificar hasta un total de 267 especies diferentes pertenecientes a 53 géneros.

Rapid Yeast Identification Panel MicroScan®

El Rapid Yeast Identification Panel MicroScan (Dade Behring) es un método automatizado para la identificación rápida de 40 especies de levaduras y otros microorganismos afines. Se basa



Figura 11.28. Sistema RapID Yeast Plus System (Remel).

RapID Yeast Plus System

Procedimiento

1. A partir de un cultivo joven, preparar un inóculo con turbidez 3 de McFarland en 2 ml del Rapid Inoculation Fluid.
2. Inocular el panel con la suspensión anterior, inclinando y agitando el dispositivo para conseguir una distribución pareja del inóculo. Sellar la bandeja.
3. Incubar el panel a 30 °C durante 4-5 h.

Lectura e interpretación

- Leer directamente los primeros seis pocillos que contienen hidratos de carbono en busca de un cambio de color. Los pocillos 7-14 se leen después de agregar el reactivo "A" y los restantes tras agregar el reactivo "B" (Figura 11.29).
- Las reacciones se anotan en un formulario especial, obteniéndose un código de 8 dígitos. Este código se compara con la serie de perfiles numéricos incluida en el libro de compendio suministrado por el fabricante.



Figura 11.29. Lectura del Sistema RapID Yeast Plus System.

en la utilización de pruebas convencionales y cromogénicas en una placa de microdilución de 96 pocillos que utiliza 27 sustratos deshidratados.

11.3.5. Identificación rápida de levaduras mediante pruebas

Fongiscreen 4H

Procedimiento

1. Obtener una suspensión de la levadura a identificar a partir de un cultivo joven (24-48 h) en cualquiera de los medios habituales. La turbidez de la suspensión debe ser equivalente a la del testigo suministrado por el fabricante, aproximadamente 4 McFarland.
2. Inocular 3 gotas de la suspensión anterior en cada uno de los 6 pocillos de la microplaca y cubrir con el adhesivo suministrado por el fabricante.
3. Incubar a 37 °C durante 4 h.

Lectura e Interpretación

- La lectura se lleva a cabo mediante la adición de reactivos o por lectura directa.
- Los resultados se interpretan comparando el perfil obtenido con los perfiles específicos suministrados por el fabricante.



Figura 11.30. Sistema Fongiscreen® (Bio-Rad).

bioquímicas y enzimáticas

RapID Yeast Plus System®

El RapID Yeast Plus System (Remel) es un sistema compuesto por un panel de 18 pocillos; cada uno contiene un sustrato convencional o cromogénico que detecta la asimilación de carbohidratos, ácidos orgánicos o aminoácidos, así como la hidrólisis de la urea y de ácidos grasos. Permite identificar hasta 43 especies de levaduras (Figura 11.28).

mans (Figura 11.30). La utilización de sustratos deshidratados por las enzimas fúngicas se manifiesta por un cambio de color, ya sea espontáneamente o después de añadir un reactivo revelador.

11.4. Identificación mediante criterios inmunológicos

11.4.1. Bichro-latex albicans®

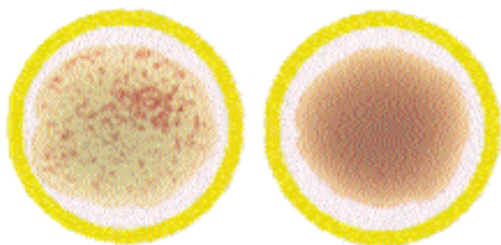


Figura 11.31. Sistema Bichro-latex albicans (Fumouze).

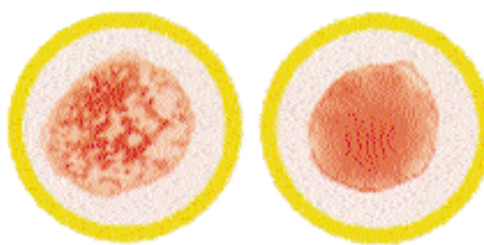


Figura 11.32. Sistema Krusei-color (Fumouze).

Bichro-latex albicans

Procedimiento

1. Reconstituir un vial del agente disociante, con el volumen de agua destilada indicada.
2. Depositar 20 µl del agente disociante sobre un círculo del portaobjetos.
3. A partir de un cultivo de 24-48 h en SDA, u otro medio habitual, recoger 3-4 colonias de la levadura a identificar y emulsionarlas en el agente disociante.
4. Homogeneizar la suspensión del látex antes de su uso.
5. Añadir una gota del reactivo látex en el círculo.
6. Mezclar y extender con el agitador suministrado por el fabricante hasta que la suspensión sea homogénea.
7. Agitar en un agitador durante 5 min.

Interpretación

- Reacción positiva: Aparición de aglutinados rojos sobre un fondo verde: *C. albicans*.
- Reacción negativa: No se observa aglutinación, mantiene su color marrón.

Krusei color

Procedimiento

1. Resuspender el látex antes de su uso.
2. Por cada cepa a identificar dispensar una gota del reactivo de látex en el círculo del portaobjetos.
3. Mediante una pipeta Pasteur o un asa de platino, añadir 2 ó 3 colonias a la gota de látex y homogeneizar la emulsión.
4. Agitar en un agitador (5 min).

Interpretación

- Reacción positiva: Apariencia de aglutinación clara y evidente de color rojo indicativa de *C. krusei*.
- Reacción negativa: Ausencia de aglutinación. La suspensión mantiene su aspecto original.
- Ciertas cepas de otras especies (Ej. *C. parapsilosis*), pueden producir agregados de color blanco que no deben ser confundidos con los agregados rojos.

Fongiscreen 4H®

Fongiscreen 4H (Bio-Rad) es un sistema basado en el estudio del perfil enzimático de algunas levaduras, permitiendo identificar en 4 h *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* y *C. neoformans*.

Bichro-latex albicans (Fumouze) es un método para la identificación rápida de aislamientos *C. albicans* por aglutinación de partículas látex utilizando un anticuerpo monoclonal específico de *C. albicans* [10] (Figura 11.31).

La prueba se realiza con dos reactivos distin-

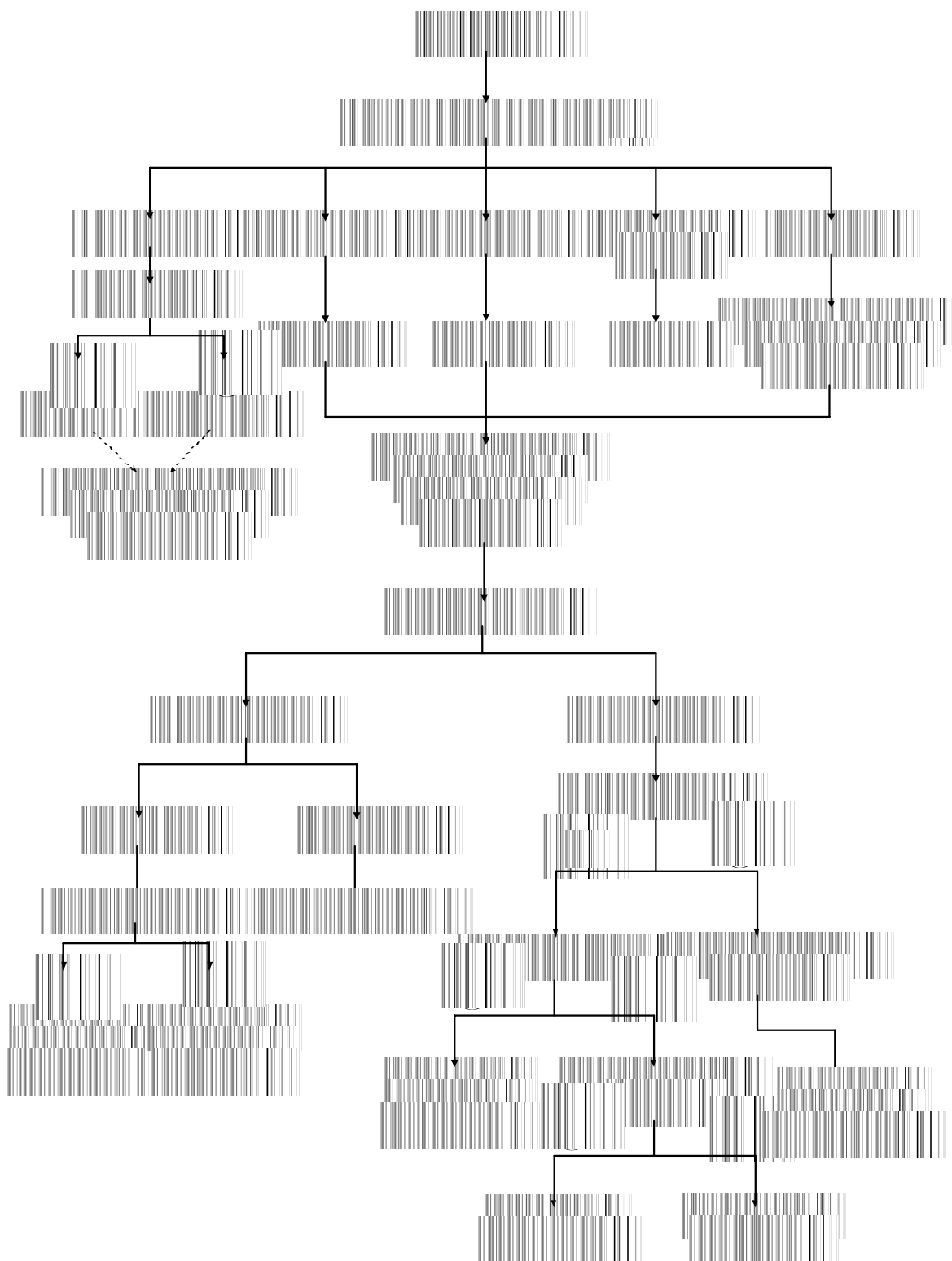


Figura 11.33. Esquema de identificación y diagrama diagnóstico para las levaduras más frecuentemente aisladas en muestras clínicas.
a: En muestras con alta sospecha de micosis por hongos levaduriformes se puede utilizar como medio de aislamiento primario.
b: Si son colonias rojas o anaranjadas en el medio de SDA se trataría de especies de *Rhodotorula*.

tos: a) bolas de látex recubiertas con anticuerpos monoclonales que reaccionan específicamente con el antígeno de *C. albicans* localizado en su pared celular, y b) un agente disociante que permite la exposición al antígeno.

11.4.2. Krusei-color®

Krusei-color (Fumouze) es un método para la identificación de aislamientos de *C. krusei* por aglutinación de partículas de látex, mediante un anticuerpo monoclonal que reacciona específicamente con el antígeno localizado en su pared (Figura 11.32).

El kit contiene un reactivo Krusei-color y 5 portaobjetos.

Como resumen, en la Figura 11.33 se expone un esquema y un diagrama diagnóstico para la identificación de las levaduras más frecuentemente aisladas en la clínica.

11.5. Identificación de levaduras lipófilas

Debido a su requerimiento de ácidos grasos, las levaduras lipófilas no pueden ser identificadas con los sistemas y medios habituales para otras levaduras, por lo que su identificación merece un comentario diferenciado.

Durante mucho años se ha venido utilizando el binomio *Malassezia furfur* para designar la fase micelial de las levaduras lipófilas encontradas en la

Tabla 11.2. Características fisiológicas de las especies de *Malassezia*.

Especie	Catalasa	SDA ^a 32 °C	mDixon ^b			Tween		
			32 °C	37 °C	40 °C	80 (0,1%)	40 (0,5%)	20 (10%)
<i>Malassezia furfur</i>	+	-	+	+	+	+	+	+
<i>Malassezia pachydermatis</i>	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>Malassezia sympodialis</i>	+	-	+	+	+	+	+	-
<i>Malassezia globosa</i>	+	-	+	-	-	-	-	-
<i>Malassezia obtusa</i>	+	-	+	+	-	-	-	-
<i>Malassezia restricta</i>	-	-	+	+	-	-	-	-
<i>Malassezia slooffiae</i>	+	-	+	+	+	-	+	+

a: crecimiento en agar Sabouraud sin ningún suplemento lipídico
b: crecimiento en agar Dixon modificado a 32, 37 y 40 °C

Nuestro más sincero agradecimiento a D^a Josefa Gonzalez López, Técnico Especialista de Laboratorio, por la ayuda prestada en la identificación de tantas, tantas y tantas levaduras y al Dr. Esteban Tarrada Merino por la ayuda informática y la realización iconográfica de este Capítulo.

Referencias

- Berardinelli C, Opheim DJ. New germ tube induction medium for the identification of *Candida albicans*. J Clin Microbiol 1994; 22: 861-862.
- Fleming III WH, Hopkins DM, Land GA. New culture medium for the presumptive identification of *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans*. J Clin Microbiol 1977; 5: 236-243.
- Casal M, Linares MJ. Comparisons of six media for production of chlamydospore by *Candida albicans*. Mycopathologia 1981; 76: 125-128.
- Koneman E, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC. Micología. En: Diagnóstico Microbiológico. Buenos Aires, Panamericana Ed. Med. 1999: 955-1037.
- Feo M, De Pacheco A. *Candida albicans*: La leche en la producción de clamidosporas. Am Microbiol 1976; 18: 23-24.
- Odds FC, Bernaerts R. CHROMagar Candida a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important *Candida* species. J Clin Microbiol 1994; 32: 1923-1929.
- Pinjon E, Sullivan D, Salkin I, Shanley D, Coleman D. Simple, inexpensive, reliable method for differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. J Clin Microbiol 1998; 36: 2093-2095.
- Freydière AM, Guinet R. Rapid methods for identification of the most frequent clinical yeasts. Rev Iberoam Micol 1997; 14: 85-89.
- Freydière AM, Guinet R, Boiron P. Yeast identification in the clinical microbiology laboratory: phenotypic methods. Med Mycol 2001; 39: 9-33.
- Quindós G, San Millán R, Robert R, Bernard C, Pontón J. Evaluation of Bichro-latex Albicans a new method for rapid identification of *Candida albicans*. J Clin Microbiol 1997; 35: 1263-1265.
- Guillot J, Guého E, Lesourd M, Midgley G, Chévrier G, Dupont B. Identification *Malassezia* species. A practical approach. J Mycol Med 1996; 6: 103-110.
- Guého E, Midgley G, Guillot J. The genus *Malassezia* with description of four new species. Antonie van Leeuwenhoek 1996; 69: 337-355.

F. Javier Cabañes Saenz

12.1. Introducción

Los dermatofitos son un grupo de hongos relacionados entre sí que presentan la capacidad de invadir los tejidos queratinizados (piel, pelo, uñas) del hombre y de los animales, produciendo una enfermedad que se denomina dermatofitosis o, más comúnmente, tiña.

Si bien no se conoce la fase sexual (perfecta o teleomorfo) de la mayoría de estos hongos, se ha demostrado que son ascomicetos por distintas técnicas. Taxonómicamente se engloban en la división Ascomycota y pertenecen a la clase Plectomycetes, orden Onygenales y familia Arthrodermataceae [1]. Actualmente, un único género denominado *Arthroderma* incluye todas las especies de teleomorfos.

La taxonomía de los dermatofitos y su identificación rutinaria en el laboratorio de Micología clínica se basa fundamentalmente en criterios morfológicos, macro y microscópicos, relacionados con la fase de reproducción asexual (fase imperfecta, anamorfo, mitospórico) de estos hongos. Los géneros que agrupan a las especies productoras de dermatofitosis son: *Epidermophyton*, *Microsporum* y *Trichophyton*.

fitosis (verdaderos dermatofitos). Estas especies no se suelen aislar con la misma frecuencia en todos los laboratorios, ya que existe una clara variabilidad climática, geográfica, socioeconómica etc., que origina cambios en los patrones de distribución de los agentes etiológicos de las dermatofitosis. Algunas especies son de distribución geográfica limitada: *T. concentricum* se encuentra fundamentalmente en Oceanía o *T. soudanense* en África. No obstante, los flujos de emigración pueden hacer ocasionalmente frecuentes los aislamientos de algunas especies en países en los que no se aíslan habitualmente [2].

Otras especies se distribuyen de forma más o menos regular por todo el mundo. En efecto, tan sólo 10 especies (Tabla 12.1) se aíslan con una frecuencia elevada en la mayoría de los laboratorios de Micología clínica humana, representando el 99% de los cultivos positivos. De estas, únicamente seis especies: *E. floccosum*, *M. canis*, *M. gypseum*, *T. rubrum*, *T. mentagrophytes* y *T. tonsurans*, pueden llegar a ser las responsables de más del 90% de los casos. Algunos de estos dermatofitos (ej. *T. mentagrophytes*, *M. gypseum*) son en realidad complejos de especies ("species complex") que incluyen distintas variedades o incluso grupos de especies.

Tabla 12.1. Dermatofitos aislados más frecuentemente del hombre.

<i>Epidermophyton</i>	<i>E. floccosum</i>
<i>Microsporum</i>	<i>M. canis</i>
	<i>M. gypseum</i>
	<i>M. audouinii</i>
<i>Trichophyton</i>	<i>T. rubrum</i>
	<i>T. mentagrophytes</i>
	<i>T. tonsurans</i>
	<i>T. verrucosum</i>
	<i>T. violaceum</i>
	<i>T. schoenleinii</i>

12.2. Especies más habituales

En la actualidad, aproximadamente unas 40 especies se encuentran incluidas en estos géneros. El número de especies se reduce a unas 30 cuando se considera únicamente a las productoras de dermato-

¿Todas las especies incluidas en estos géneros son dermatofitos?

Existen especies que presentan una morfología y situación taxonómica común con los dermatofitos, pero sin embargo no se han descrito como agentes etiológicos de dermatofitosis o sus descripciones como tales son dudosas. En este caso no son consideradas como verdaderos dermatofitos y se les reservan denominaciones como "tipo dermatofito", ("*dermatophyte-like fungi*"), dermatofitoides o congéneres de los dermatofitos según distintos autores. Ejemplos de estas especies son: *Epidermophyton stockdaleae*, *Microsporum cookei* y *Trichophyton (Keratinomyces) ajelloi*.

12.3. Distribución en el hombre y en los animales

No todos los dermatofitos se aíslan con la misma frecuencia en las distintas localizaciones que pueden presentar las dermatofitosis en el hombre. En la [Tabla 12.2](#) se incluyen las principales especies según la localización o tipo, indicando su denominación. Aunque otras especies no incluidas en esta tabla pueden participar en estos procesos, conocer la distribución de las más frecuentes puede ser de utilidad a la hora de realizar la identificación.

Algunas de estas especies se han especializado en producir dermatofitosis en el hombre y se aíslan exclusivamente de muestras humanas (*T. rubrum*, *E. floccosum*, *T. tonsurans*, *T. mentagrophytes* var. *interdigitale*, ...), denominándose especies antropófilas. Estas en muy raras ocasiones se aíslan como causantes de dermatofitosis en los animales. No obstante, el hombre puede presentar infección por especies zoófilas que, característicamente, producen dermatofitosis en los animales (*M. canis*, *T. mentagrophytes* var. *mentagrophytes*, *T. verrucosum*). En la [Tabla 12.3](#) se relacionan los dermatofitos que más frecuentemente se aíslan de los animales domésticos [3]. Otras especies que presentan su hábitat normal en los suelos (denominadas geófilas, ej. *M. gypseum*) también pueden producir procesos patológicos, tanto en el hombre como en los

animales.

Tabla 12.3. Principales dermatofitos en diferentes especies animales.

Animal	Dermatofitos
Gatos y perros	<i>M. canis</i> Otras: <i>T. mentagrophytes</i> <i>M. gypseum</i> <i>M. persicolor</i>
Caballos	<i>T. equinum</i> Otras: <i>M. canis</i> <i>M. equinum</i> <i>M. gypseum</i> <i>T. mentagrophytes</i> <i>T. verrucosum</i>
Vacas, cabras y ovejas	<i>T. verrucosum</i> Otras: <i>M. canis</i> <i>M. gypseum</i> <i>T. mentagrophytes</i> <i>T. equinum</i>
Conejos	<i>T. mentagrophytes</i> Otras: <i>M. canis</i>
Cerdos	<i>M. nanum</i> Otras: <i>M. canis</i> <i>M. gypseum</i> <i>T. mentagrophytes</i> <i>T. verrucosum</i>
Aves de corral	<i>M. gallinae</i> Otras: <i>T. simii</i>

©2001 Revista Iberoamericana de Micología - ISBN: 84-607-3050-6

Tabla 12.2. Dermatofitosis humanas. Principales agentes etiológicos según tipo y/o localización.

- Tinea capitis*:** cuero cabelludo, cejas, pestañas.
• *T. tonsurans*, *M. canis*, *T. violaceum*, *M. audouinii*
- Tinea corporis*:** piel lampiña del tronco, cuello, brazos, piernas y dorso de las manos y los pies.
• *T. rubrum*, *E. floccosum*, *T. mentagrophytes*, *T. tonsurans*, *T. verrucosum*
- Tinea cruris*:** ingles, perineo, región perianal.
• *T. rubrum*, *E. floccosum*, *T. mentagrophytes*
- Tinea unguium*:** uñas.
• *T. rubrum*, *E. floccosum*, *T. mentagrophytes*
- Tinea faciei*:** piel glabra de la cara.
• *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*.
- Tinea barbae*:** barba y bigote.
• *T. mentagrophytes*, *T. violaceum*, *T. verrucosum*, *T. rubrum*
- Tinea pedis* (pie de atleta):** planta del pie, dedos y región interdigital.
• *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *E. floccosum*
- Tinea manuum*:** región interdigital y palmas de las manos.
• *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *E. floccosum*
- Tinea favosa* (favus)^a:** cuero cabelludo y piel glabra.
• *schoenleinii*, *T. mentagrophytes* var. *quinckeanum*
- Tinea imbricata*:** (Tokelau, circinada tropical)^b
• *T. concentricum*.

a: Delimitada geográficamente fundamentalmente a Europa, Asia y África.
b: Delimitada geográficamente a determinadas islas del Pacífico en Oceanía, Sudeste asiático y determinadas zonas de México, América Central y Sudamérica.

12.4. Identificación mediante su morfología

12.4.1. Características macroscópicas

A partir de los cultivos realizados en medios selectivos para el aislamiento de dermatofitos (medios tipo SDA+ antibiótico+ cicloheximida, o DTM) (Capítulo 3) se pueden identificar las especies más frecuentes. Los dermatofitos son hongos hialinos que forman colonias que presentan en general colores claros, con gamas de color restringidas a tonos blanquecinos, amarillentos y marronáceos (Figura 12.1). En pocas ocasiones se observan colonias con colores oscuros u otras tonalidades (azules, verdosas, negras, etc.) (Figura 12.2). Si bien la coloración de las colonias y su textura puede ayudar a identificar estas especies, las características microscópicas son las que determinan su identificación en la mayoría de los casos.

12.4.2. Características microscópicas

Existen diferentes estructuras microscópicas a tener en cuenta para la identificación de estos hongos (clamidosporas, distintos tipos de hifas, etc.). No obstante, la forma y distribución de macroconidios y microconidios es fundamental a la hora de definir los géneros y especies (Figura 12.3). Por este motivo, para utilizar la clave de identificación que se adjunta (pág. 12-5), es preciso la caracterización de estas estructuras en la cepa que se pretende identificar.

Para determinar la presencia de estas estructuras a partir del cultivo, se realiza una preparación entre porta y cubre con un pequeño fragmento de una de las colonias con el fin de observarla al microscopio. Se aconsejan líquidos de montaje tipo lactofenol de Amman, lactofenol azul de algodón o lactofucsina (Capítulo 14). En algunos casos, especialmente en el primocultivo y en caso de utilizar medios de cultivo con actidiona (incorporada en la mayoría de medios selectivos para dermatofitos), es difícil observar la formación de estos conidios. O bien no presentan la forma característica, o simplemente no se han formado. En este caso se deberá realizar paralelamente un subcultivo en un medio carente de inhibidores (tipo SDA, PDA) y/o un microcultivo con el fin de observar más adecuadamente la conidiogénesis (Capítulo 13).



Figura 12.1. Primocultivo de una muestra de dermatofitosis. Se observan colonias de *T. mentagrophytes* en cultivo puro desarrollándose sobre los pelos inoculados.

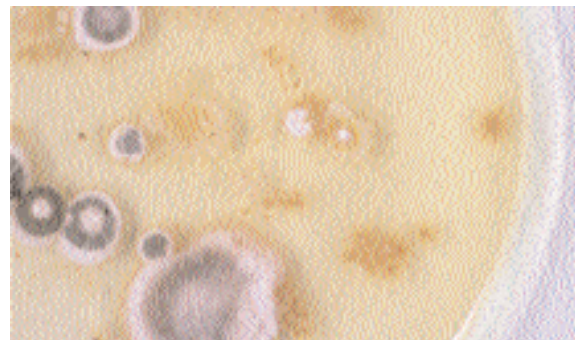


Figura 12.2. Primocultivo de una muestra de dermatofitosis. Se observan colonias amarillentas (dermatofitos) y otras de diversos colores más oscuros (hongos contaminantes).

12.5. Identificación mediante técnicas adicionales

Existen especies que no forman, o lo hacen raramente, macroconidios y/o microconidios (ej. *T. violaceum*). Por otra parte, algunas cepas pertenecientes a determinadas especies identificables morfológicamente por producir algún tipo de estas estructuras, no las suelen producir. Así, por ejemplo, aislamientos de *T. mentagrophytes* o *T. rubrum* pueden no formar macroconidios.

Cuando existen dificultades en la identificación de estos hongos utilizando sus características morfológicas, ya sea por semejanza entre las espe-

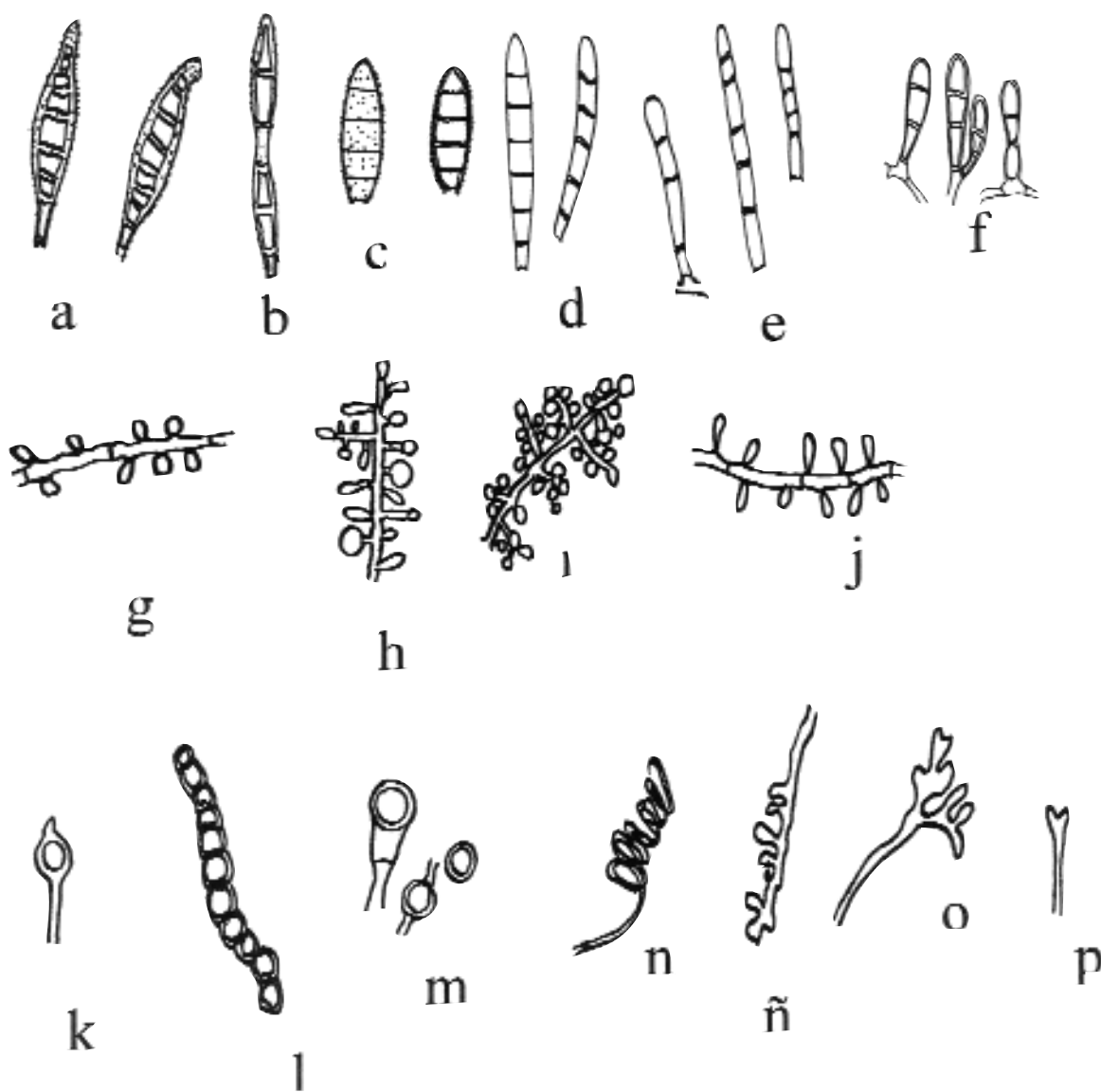


Figura 12.3. Diferentes tipos de macroconidios (a-f), microconidios (g-j), clamidosporas (k-m) e hifas (n-p) (consultar clave).

Clave para los dermatofitos aislados más frecuentemente del hombre ^a

1	Macroconidios presentes	2
	No se observan macroconidios	6
2	Macroconidios en forma de huso, de paredes gruesas y rugosas y frecuentemente con un pico terminal característico. Están formadas normalmente por más de 6 células (Figura 12.3a)	<i>M. canis</i> (Figura 12.4)
	Macroconidios, cuando se presentan, similares a los de <i>M. canis</i> , aunque de mayor longitud y con paredes más lisas. Se observan formas con una constricción en la zona central del macroconidio (Figura 12.3b). Con frecuencia la presencia de macroconidios es escasa, o no se llegan a observar. Clamidosporas terminales (Figura 12.3k) e hifas pectinadas características (Figura 12.3ñ). En contraste con <i>M. canis</i> , no se desarrolla o presenta crecimiento escaso en el medio de arroz	<i>M. audouinii</i>
	Macroconidios de paredes delgadas	3
3	Macroconidios de paredes rugosas	4
	Macroconidios de paredes lisas	5
4	Macroconidios abundantes, fusiformes y simétricos, conteniendo hasta 6 células (Figura 12.3c)	<i>M. gypseum</i> (Figura 12.5)
5	Macroconidios alargados en forma de cigarro habano (Figura 12.3d) no siempre presentes. Abundantes microconidios redondeados formando grupos que asemejan racimos de uva inmadura (Figura 12.3i). Presencia de hifas espiriladas (Figura 12.3n). Ureasa positivo. Ensayo de perforación del pelo positivo.	<i>T. mentagrophytes</i> ^b (Figura 12.6)
	Microconidios piriformes, estrechos, en forma de lágrima, aislados y dispuestos lateralmente en las hifas (Figura 12.3j). Macroconidios generalmente no presentes. Cuando se presentan, similares a los de <i>T. mentagrophytes</i> (Figura 12.3e). Reverso de la colonia rojizo; se estimula la producción de este pigmento rojizo en PDA. Ureasa negativo. Ensayo de perforación del pelo negativo.	<i>T. rubrum</i> ^c
	Macroconidios ovales en forma de porra, aislados o en racimos (Figura 12.3f). Ausencia de microconidios. Clamidosporas abundantes	<i>E. floccosum</i> (Figura 12.7)
6	Microconidios abundantes	7
	Microconidios escasos o no se observan.	8
7	Abundantes microconidios redondeados formando grupos que asemejan racimos de uva inmaduros (Figura 12.3i). Presencia de hifas espiriladas (Figura 12.3n). Ureasa positivo. Ensayo de perforación del pelo positivo	<i>T. mentagrophytes</i> ^b
	Microconidios piriformes y estrechos, en forma de lágrima, aislados y dispuestos lateralmente en las hifas (Figura 12.3j) Reverso de la colonia rojizo; se estimula la producción de este pigmento en PDA. Ureasa negativo. Ensayo de perforación del pelo negativo	<i>T. rubrum</i> ^c
	Microconidios de mayor tamaño, en forma de porra más o menos alargados. Algunos en forma de globo (Figura 12.3h). Crece poco en ausencia de tiamina. Infección del pelo tipo endotrix	<i>T. tonsurans</i> (Figura 12.8)
8	Crecimiento moderadamente rápido (Colonias > 15 mm de diámetro en 7 días)	9
	Crecimiento lento (Colonias < 10 mm de diámetro en 7 días)	10
9	Microconidios, si se detectan, pequeños, en bajo número y en forma de porra. Similares a los de otras <i>Microsporum</i> spp. (Figura 12.3g). Clamidosporas terminales (Figura 12.3k) e hifas pectinadas características (Figura 12.3ñ). No se desarrolla o presenta un crecimiento escaso en el medio de arroz	<i>M. audouinii</i>
10	Colonias color púrpura oscuro, violeta. No se detectan conidios. Escaso crecimiento en ausencia de tiamina. Infección del pelo tipo endotrix.	<i>T. violaceum</i>
	Colonias con coloraciones claras, blanquecinas, grisáceas, marronáceas	11
11	Clamidosporas en cadenas largas densamente compactadas (Figura 12.3l). Algunas hifas en candelabro (Figura 12.3o) y/o terminadas en cabeza de clavo (Figura 12.3p). La mayoría de cepas requieren tiamina ^d o tiamina e inositol. Infección del pelo tipo ectotrix megasporado.	<i>T. verrucosum</i> (Figura 12.9)
	No se observan conidios. Típicas hifas en candelabro (Figura 12.3o) y/o terminadas en cabeza de clavo (Figura 12.3p). No requieren tiamina. Infección del pelo tipo fálico	<i>T. schoenleinii</i>

a: Para un tratamiento más detallado de los dermatofitos incluidos en esta clave y otras especies no incluidas, se recomiendan las claves propuestas por Rebell y Taplin [5] y Kane *et al.* [4].

b: *Trichophyton mentagrophytes* está considerado como un complejo de especies (*T. mentagrophytes* var. *mentagrophytes* (variedad granular), *T. mentagrophytes* var. *erinacei*, *T. mentagrophytes* var. *interdigitale*, *T. mentagrophytes* var. *nodular* (*T. kraidenii*), *T. mentagrophytes* var. *quinckeanum*). Según autores algunas de estas variedades son consideradas como especies independientes o sinónimos de *T. mentagrophytes*. En contraste con *T. mentagrophytes* var. *mentagrophytes*, *T. mentagrophytes* var. *erinacei* y *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* pueden presentar microconidios alargados (en forma de porra de pequeño tamaño) en vez de redondeados.

c: *T. rubrum* está considerado como un complejo de especies. Para algunos autores las especies *T. fischeri*, *T. kanei*, *T. raubitschekii*, son consideradas como variedades o sinónimos de *Trichophyton rubrum*. Algunas de las diferencias que presentan son: *T. fischeri* (especie no patógena), *T. kanei* (ausencia de microconidios; ureasa positivo débil), *T. raubitschekii* (ureasa positivo).

d: Se han descrito cepas aisladas de tiñas de ovejas que no necesitan tiamina e/o inositol (*T. verrucosum* var. *autotrophicum*) [3]. En un estudio [8] sobre los requerimientos nutricionales de esta especie se cita que el 84% de las cepas se desarrollaron en el medio conteniendo tiamina e inositol, el 16% en el medio conteniendo tiamina y ninguna cepa se desarrolló en el medio sin vitaminas.

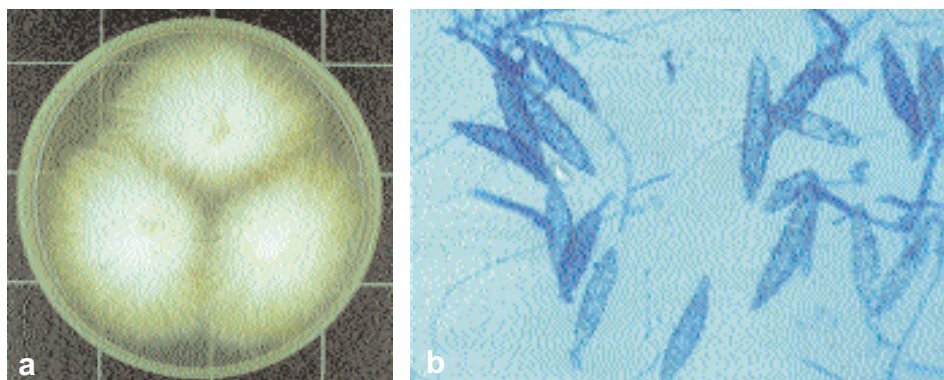


Figura 12.4. a: Anverso de colonias pertenecientes a

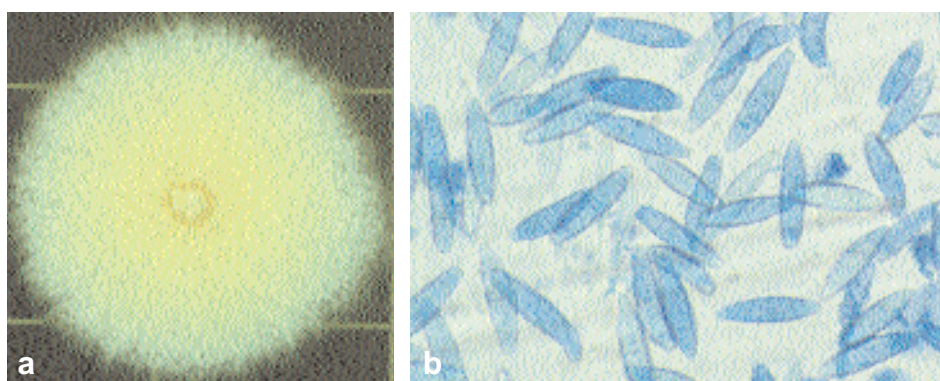


Figura 12.5. a: Anverso de una colonia perteneciente a *M. gypseum*; b: Macroconidios típicos de *M. gypseum*.

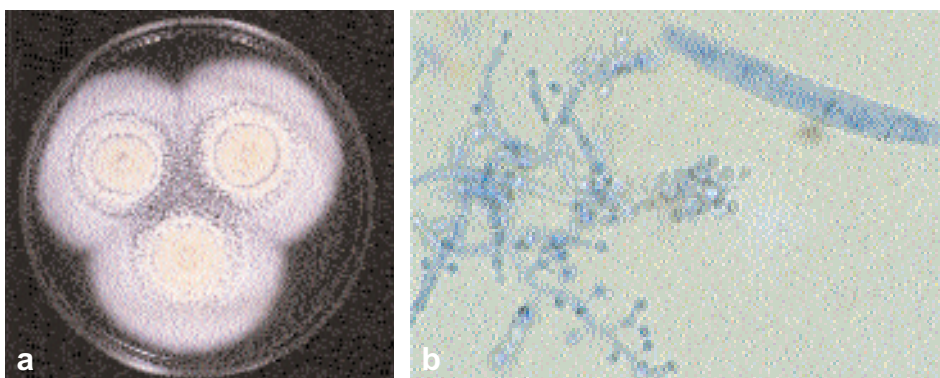


Figura 12.6. a: Anverso de colonias pertenecientes a *T. mentagrophytes* var. *mentagrophytes*; b: Macroconidio y microconidios típicos de *T. mentagrophytes* var. *mentagrophytes*.

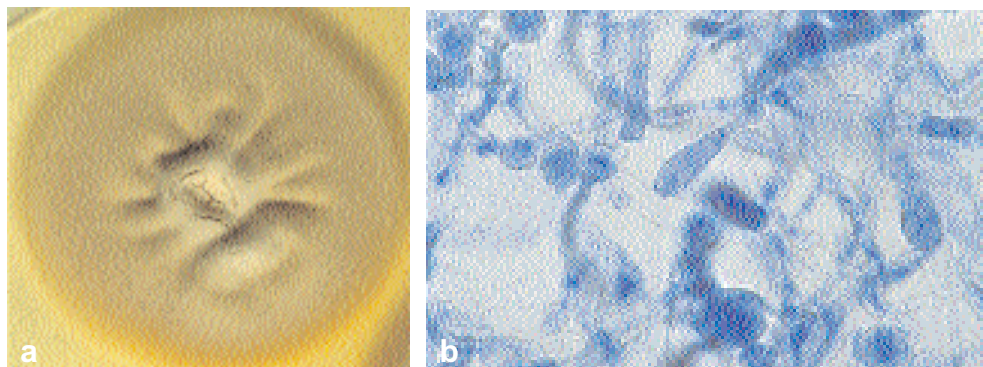


Figura 12.7. a: Anverso de una colonia perteneciente a *E. floccosum*; b: Macroconidios y clamidosporas típicos de *E. floccosum*.

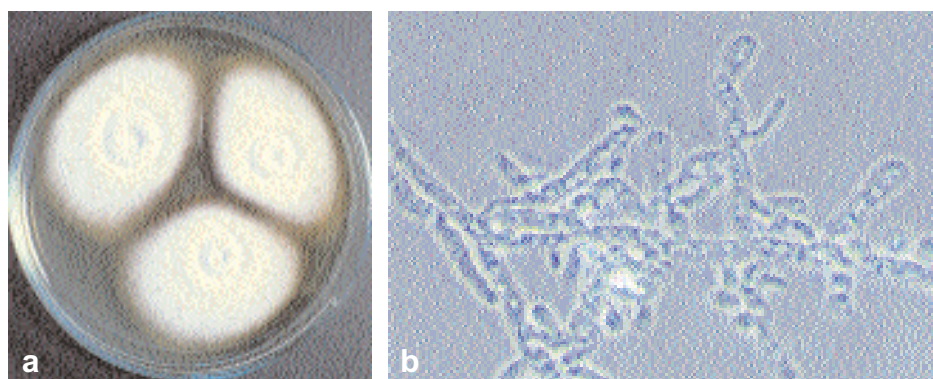


Figura 12.8. a: Anverso de colonias pertenecientes a *T. tonsurans*; b: Aspecto microscópico típico de *T. tonsurans*.



Figura 12.9. Aspecto microscópico típico de *T. verrucosum*.

cies o por falta de estructuras útiles para su identificación, se suelen utilizar otros caracteres distintos a los morfológicos, haciendo uso de técnicas que incluyen pruebas bioquímicas, fisiológicas, ensayos nutricionales, ensayo de perforación del pelo *in vitro*, etc., como las que se describen a continuación.

12.5.1. Tipo de infección del pelo *in vivo*

La observación microscópica directa de la muestra (pelos, escamas, uñas), además de confirmar en pocos minutos un caso de dermatofitosis, según el tipo de infección que produzca el hongo, puede ayudar a identificar la especie causante. Hay dermatofitos (ej. *E. floccosum*) que no infectan el pelo *in vivo*. Otros presentan diferentes patrones de infección:

Ectotrix

Infección principalmente externa del pelo (Figura 12.10). Existen diferentes subcategorías de este tipo según distintos autores. Por ejemplo:

- **Microspórico:** Arthroconidios redondeados muy pequeños (2-3 μm) formando una vaina alrededor del pelo difícilmente dissociable con KOH. Fluorescencia con lámpara de Wood. (ej. *M. canis*, *M. audouinii*).
- **Microide:** Arthroconidios redondeados pequeños (2-4 μm), fácilmente dissociables con KOH. No fluorescencia. (ej. *T. mentagrophytes*)
- **Megasporado:** Arthroconidios grandes redondea-

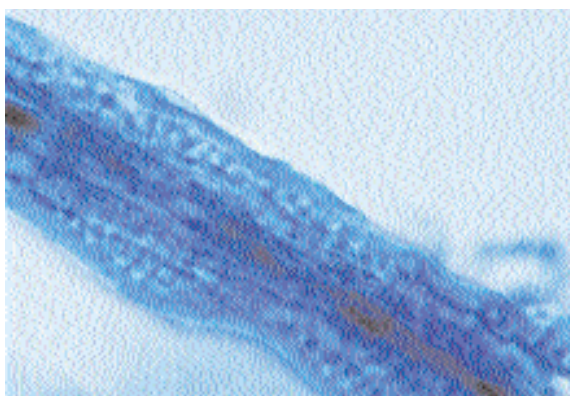


Figura 12.10. Observación microscópica de un pelo con una infección de tipo ectotrix.

dos (4-8 μm). No fluorescencia. (ej. *T. verrucosum*).

Endotrix

Infección en el interior del pelo. Los artroconidios redondeados llenan el interior del pelo. (ej. *T. tonsurans*, *T. violaceum*).

Fálico

Se observan algunas hifas (filamentos) polimórficos en el interior del pelo. También se observan gotas de aire en esta localización cuando se utiliza KOH (ej. *T. schoenleinii*).

12.5.2. Prueba de la ureasa

La principal aplicación de esta prueba es la diferenciación entre *T. mentagrophytes* (ureasa positiva) y *T. rubrum* (ureasa negativa) (ver clave, pág. 12-5). Uno de los medios de cultivo más utilizados

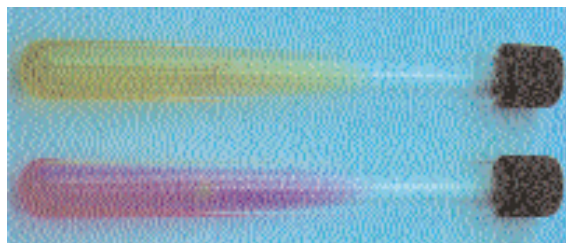


Figura 12.11. Prueba de la ureasa de Christensen. Tubo color amarillento: prueba negativa. Tubo color rojizo: prueba positiva.

para realizar esta prueba es el medio Agar-urea según Christensen (Capítulo 3). Es especialmente útil por incorporar un indicador de pH en el medio de cultivo y facilitar la detección de posibles contaminaciones. Las cepas ureasa positivas hacen virar en pocos días el indicador de pH, adquiriendo el medio de cultivo un color rojizo (Figura 12.11).

T. rubrum está considerado como un comple-

Unos consejos...

- Para evitar falsos positivos, hay que tener la precaución de que el cultivo que ensayemos sea puro y no esté contaminado con bacterias.
- Algunos autores recomiendan el caldo urea de Christensen por ser más sensible en la detección de esta actividad. En este caso debe obtenerse un cultivo puro de la cepa a ensayar, con el fin de evitar la presencia de bacterias (ureasa positivas) que frecuentemente acompañan a estas especies. Estas bacterias no se detectan fácilmente en los medios de aislamiento, por estar inhibidas por los antibióticos que incorporan [4].

jo de especies. Un bajo porcentaje de cepas pertenecientes a esta especie se citan como ureasa positivas. Para algunos autores estas cepas se podrían corresponder con las especies de este complejo: *T. raubitscheckii* (ureasa positiva) y *T. kanei* (ureasa positiva débil) [4].

12.5.3. Medio de arroz

Es muy útil para la diferenciación entre *M. canis* y *M. audouinii* (Capítulo 3). *M. audouinii* crece de forma escasa sobre los granos produciendo un pigmento marrónceo. *M. canis* crece abundantemente y suele secretar un pigmento amarillento. Existen distintas formas de prepararlo y dispensarlo [4,5].

12.5.4. Medio de agar glucosado de patata (PDA)

Es un medio que estimula la producción del pigmento rojizo característico de *T. rubrum*, siendo muy útil para diferenciarlo de *T. mentagrophytes* (Capítulo 3).

En este medio *M. audouinii* produce un reverso de la colonia de color asalmonado y *M. canis* de color amarillento. Además, su utilización es altamente recomendada por favorecer la esporulación de todos los dermatofitos.

12.5.5. Otras técnicas fisiológicas

Se ha descrito la utilización de otros medios como el agar glucosa-sólidos lácteos-púrpura de bromocresol (BCP-milk solids-glucose agar-BCPMSG) y algunas variaciones con extracto de levadura (BCP-milk solids-yeast extract agar) entre otros medios, en lo que se denomina el sistema de identificación de Kane/Fisher [4]. La utilización del BCPMSG es especialmente útil para la diferenciación de *T. mentagrophytes* (crecimiento abundante y alcalinización del medio: color púrpura) y *T. rubrum* (crecimiento limitado sin reacción alcalina) [6] (Capítulo 3).

12.5.6. Ensayo de perforación del pelo *in vitro*

Es una técnica muy interesante para diferenciar *T. mentagrophytes* y *M. canis* (perforación positiva) de *T. rubrum* y *M. audouinii* (perforación negativa).

Consiste en hacer crecer la cepa del dermatofito a identificar en fragmentos de pelo previamente esterilizados y, posteriormente, observar al microscopio el efecto que ha producido el hongo en dicho sustrato. Los dermatofitos se dividen en dos grupos (perforación positiva o negativa) en función de si producen un tipo característico de perforaciones o no. Este resultado varía según la técnica que se utilice.

La técnica de referencia es la descrita por Ajello y Georg [7]. Consiste en disponer fragmentos cortos de pelo humano (unos 20-25 de 15-20 mm de longitud), previamente esterilizados, en una placa de Petri que contiene 25 ml de agua estéril con 2 ó 3 gotas (0,15 ml) de extracto de levadura al 10% pre-



Figura 12.12. Ensayo de perforación del pelo *in vitro*. Dermatofito desarrollándose sobre pelos según la técnica descrita por Ajello y Georg [7].

viamente esterilizado. Se inocula con fragmentos de la colonia de la cepa a ensayar y se incuba en oscuridad a 25 °C durante 3 semanas (Figura 12.12). Se recomienda que el cabello esté desengrasado, o se utilice de prepúber ya que los ácidos grasos capilares pueden tener un efecto inhibitor en el desarrollo.

Un consejo...

Para realizar el montaje de la preparación es preferible reblandecer y aclarar el pelo previamente con solución de KOH al 20%. Se puede teñir posteriormente con lactofenol azul de algodón u otro colorante, lo que permite observar la formación de los órganos perforantes.

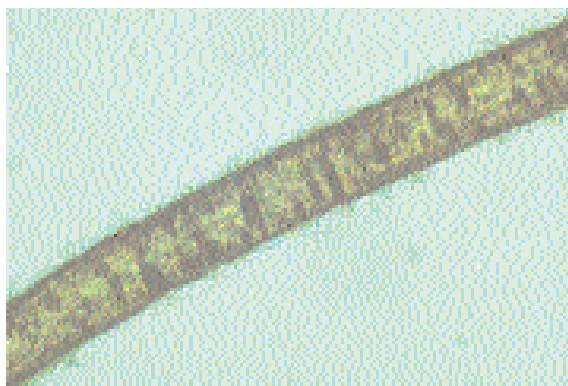


Figura 12.13. Ensayo de perforación del pelo *in vitro* positivo. Observación microscópica de un pelo con típicas perforaciones.

llo de la cepa. También se ha recomendado utilizar pelo de caballo previamente desengrasado y esterilizado. En otras revisiones de esta técnica se recomienda prolongar la incubación hasta 4 semanas.

Las perforaciones que producen *T. mentagrophytes* o *M. canis* son fácilmente detectables. Son transversales, de forma cónica y pueden llegar a atravesar el pelo de lado a lado (Figura 12.13). *T. rubrum* y *M. audouinii* no las suelen producir o tan sólo erosionan la superficie del pelo.

12.5.7. Ensayos nutricionales

Estas técnicas se basan en la diferenciación de las especies de dermatofitos según los requerimientos específicos que tienen algunas de ellas por ciertas vitaminas y otros factores de crecimiento [8].

El ensayo nutricional con tiamina y con tiamina e inositol permite diferenciar nutricionalmente las especies incluidas en la clave de este Capítulo. Para su realización se requieren los siguientes medios de cultivo (Capítulo 3):

Un consejo...

Estos medios de cultivo están comercialmente disponibles con el nombre de agar *Trichophyton* (Difco). Referencias: Medio base sin vitaminas (agar #1), Medio con tiamina (agar #4), Medio con tiamina e inositol (agar #3) (Capítulo 3).

- *Trichophyton* agar # 1.

- *Trichophyton* agar # 4 (con tiamina).
- *Trichophyton* agar # 3 (con tiamina e inositol).
- Preparar tubos con cada uno de los tres medios. Concentración final en el medio:
Tiamina 0,2 mg/ml, Inositol 50 mg/ml.
- Sembrar los distintos medios con un pequeño fragmento de la colonia libre de medio de cultivo.

12.6. Conservación de las cepas de dermatofitos

Para la identificación de dermatofitos puede ser de utilidad disponer de una colección de cepas de las especies más representativas. Para mantener una



Figura 12.14. Colonia de un dermatofito con un sector donde se detecta pleomorfismo (micelio blanquecino).

colección de dermatofitos hay que tener presente que no todas las especies soportan las técnicas de conservación y mantenimiento habituales. La resiembra continuada de estos hongos en un medio de mantenimiento como el SDA tiende a degenerar los cultivos observándose un fenómeno frecuente en estos hongos denominado pleomorfismo (Figura 12.14). El mantenimiento de cepas a temperatura de refrigeración (4 °C) tampoco está recomendado para algunas especies ya que acaban siendo no viables (*E. floccosum*, *T. verrucosum*). Lo mismo ocurre con los procesos de congelación y/o liofilización.

Una de las técnicas más recomendadas para la conservación de estos hongos consiste en mantener una densa suspensión del hongo en agua destilada estéril a temperatura ambiente (Técnica de Castellani [10]). Para ello, a partir de los cultivos se

recogen fragmentos de las colonias (intentando no arrastrar mucho medio de cultivo) y se introducen en tubos conteniendo agua destilada estéril. Es conveniente que el tubo cierre herméticamente para evitar la desecación.

También suele recomendarse su conservación en medios de cultivo sin glucosa, o con baja concentración de glucosa, y mantenerlos mediante subcultivo. Otros medios que además aportan fuentes de carbono distintas, como el PDA o el agar Oatmeal, también pueden ser útiles (Capítulo 3).

12.7. Dificultades

En el caso de los dermatofitos, el término pleomorfismo está relacionado con la pérdida de su capacidad de esporulación. En muchas ocasiones se observa a las pocas resiembras, siendo más acentuado este proceso en algunas especies. Las colonias pierden su color y características habituales y se vuelven blanquecinas (Figura 12.14). Al final acaba formándose un micelio compacto carente de conidios o con muy pocas estructuras de reproducción.

Para evitar el pleomorfismo, y/o regenerar cepas pleomorfizadas, se han propuesto distintas técnicas y medios de cultivo. Parece ser que la glucosa que contiene el SDA (u otros medios similares) potencia este proceso de envejecimiento. Por ello los medios utilizados tienden a reducir la concentración de glucosa, eliminarla de su composición o sustituirla por otra fuente de carbono. Medios como el PDA o el agar Oatmeal se recomiendan para este fin y para aumentar la esporulación. No obstante hay que advertir que este proceso puede ser irreversible y se puede acabar perdiendo la cepa. Disponer de un buen sistema de conserva-

ción y mantenimiento de las cepas puede ser de gran ayuda para evitar este problema. A continuación se describen algunas de las técnicas y medios de cultivo propuestos para evitar el pleomorfismo y/ o estimular la esporulación de estos hongos:

- PDA: Esporulación y mantenimiento.
- Agar de harina de avena con sales (Medio de Weitzman y Silva Hutner, "Oatmeal-salts agar"[4,9]). Esporulación y mantenimiento: MgSO_4 1 g, KH_2PO_4 1,5 g, NaNO_3 1 g, Copos de avena 10 g, Agar 18 g, Agua destilada c.s.p. 1.000 ml).
- Medio de Sabouraud de conservación [10]: Neopeptona (Difco) 3 g, Agar 2 g, Agua destilada c.s.p. 100 ml.
- Medios que incorporan tierra (deben ser autoclavados tres veces, en días consecutivos).
 - Medio de Sabouraud tierra [10]: Neopeptona (Difco) 1g, Tierra de jardín 20 g, Agar 2 g, Agua destilada c.s.p. 100 ml.
 - Medio agar tierra [10]: Agar 2 g, Tierra de jardín 20 g, Agua destilada c.s.p. 100 ml.
- Medio de Agar Sabouraud diluido o de Takashio [10]: Glucosa 2 g, Neopeptona (Difco) 1 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 g, KH_2PO_4 1 g, Agar 20 g, Agua destilada c.s.p. 1.000 ml.
- Agar glucosado de Sabouraud con NaCl al 3% o al 5% [4]: Glucosa 4 g, Bacto peptona (Difco) 1g, NaCl (3 g (3%) o 5 g (5%)), Agar 1,5 g, Agua destilada c.s.p. 100 ml. Previene el pleomorfismo y despleomorfiza cepas de *E. floccosum* y otras especies. Estimula la producción de macroconidios en *T. mentagrophytes*, *M. audouinii* y *M. persicolor*.

Los dermatofitos como grupo modelo de estudio entre los hongos son especialmente interesantes. Los diferentes aspectos comentados en este capítulo así como otros relacionados con la patolo-

Referencias

1. Kushwaha RKS, Guarro J (Eds.) Biology of dermatophytes and other keratinophilic fungi. Bilbao, Revista Iberoamericana de Micología, 2000.
2. Kwon-Chung KJ, Bennett JE. Medical mycology. Philadelphia, Lea &Febiger, 1992.
3. Cabañes FJ. Dermatophytes in domestic animals. En: Kushwaha RKS, Guarro J (Eds.) Biology of dermatophytes and other keratinophilic fungi. Bilbao, Revista Iberoamericana de Micología, 2000: 104-108.
4. Kane J, Summerbell R, Sigler L, Krajden S, Land G. Laboratory handbook of dermatophytes: a clinical guide and laboratory handbook of dermatophytes and other filamentous fungi from skin, hair, and nails. Belmont, Star Publishing Co., 1997.
5. Rebell G, Taplin D. Dermatophytes, their recognition and identification. Coral Gables, University of Miami Press, 1979.
6. Kane J, Summerbell RC. *Trichophyton*, *Microsporum*, *Epidermophyton* and agents of superficial mycoses. En: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH (Eds) Manual of Clinical Microbiology. Washington D.C., American Society for Microbiology Press, 1999.
7. Ajello L, Georg LK. In vitro hair cultures for differentiating between atypical isolates of *Trichophyton mentagrophytes* and *Trichophyton rubrum*. Mycopath Mycol Appl 1957; 8: 3-17.
8. Georg LK, Camp LB. Routine nutritional tests for the identification of dermatophytes. J. Bacteriol 1957; 74: 113-121.
9. Weitzman I, Summerbell RC. The dermatophytes. Clin Microbiol Rev 1995; 8: 240-259.
10. Vanbreuseghem R, De Vroey C, Takashio M. Guide pratique de mycologie médicale et vétérinaire. Paris, Masson, 1978.

José Pontón
Marta E. García Sánchez
Ramiro López-Medrano

14.1. Fundamento

En muchas ocasiones, las precarias condiciones de los pacientes con micosis sistémicas desaconsejan la obtención de muestras profundas o no permiten esperar el tiempo necesario para el aislamiento y posterior identificación del agente causal. Por ello se han desarrollado diversos métodos alternativos al cultivo para proporcionar al clínico información rápida y fiable ante la sospecha de una micosis invasora. Entre estos métodos se encuentran la observación directa de la muestra clínica, la serología y la detección de componentes fúngicos no antigénicos. Algunos de ellos ya se han convertido en herramientas básicas en el laboratorio de Microbiología Clínica actual, como la observación de levaduras capsuladas, la detección del antígeno capsular de *Cryptococcus neoformans* y, quizás en breve plazo, la detección de galactomanano en pacientes neutropénicos con aspergilosis invasora.

14.2. Examen microscópico

Este examen debe realizarse a petición del clínico o siempre que dispongamos de suficiente muestra una vez realizado el cultivo. El examen microscópico de la muestra clínica puede ser de utilidad en el diagnóstico de cualquier micosis, pero su utilidad está comprobada en el estudio del LCR en todo paciente con sospecha de meningitis criptocócica y en el estudio de muestras respiratorias en pacientes con sospecha de neumonía por *Pneumocystis carinii*.

14.2.1. Aplicaciones a las micosis habituales en nuestro medio

Criptococosis

La detección de *C. neoformans* puede realizarse de forma directa sobre la muestra clínica, especialmente cuando se trata de meningitis cripto-

cócica. En estos casos el espécimen de elección es el LCR extraído tras punción lumbar no traumática. La elección de la técnica de visualización a emplear (examen directo, tinta china o calcoflúor) varía según la experiencia del observador y la práctica que se tenga en cada laboratorio.

Neumocistosis

El examen microscópico se utiliza para detectar los trofozoítos y quistes de *P. carinii* en esputo y lavado broncoalveolar (LBA). Es importante tener en cuenta que el esputo debe ser inducido, por cuanto que los pacientes con neumonía por *P. carinii* normalmente presentan tos seca, no productiva, por lo que el microorganismo es muy raramente detectado en esputo espontáneo. Incluso en el esputo inducido, muchas veces no se consigue apreciar este microorganismo, por lo que si se sospecha una neumonía por *P. carinii* debe procederse a la realización de un LBA.

Candidiasis

En los pacientes con candidiasis, el examen directo puede servir para identificar presuntivamente el hongo e informar acerca de la cantidad relativa de células de *Candida* presentes en la muestra. En las preparaciones histológicas teñidas con PAS o Plata-metnamina, la infección por *Candida albicans* puede sospecharse al observar una mezcla de levaduras, pseudohifas e hifas en el tejido, mientras que la observación solamente de células levaduriformes sugiere la infección por *C. glabrata*. Las tinciones histológicas a menudo presentan una sensibilidad baja para demostrar la infección tisular por *Candida*, ya que concentraciones por debajo de 10^3 UFC/g de tejido generalmente son negativas en el examen histológico. Un aumento de la sensibilidad de estas técnicas puede lograrse con la utilización de fluorocromos como el blanco de calcoflúor, el Blankophor P o el rojo Congo [1-4].

Aspergilosis

La aplicación fundamental del examen microscópico al diagnóstico de la aspergilosis consiste en la observación de fragmentos de hifas de *Aspergillus* en muestras respiratorias y en preparaciones histológicas. Aunque las muestras clínicas del tracto respiratorio más frecuentes son los espu-

tos, las que presentan una mayor rentabilidad diagnóstica son el LBA o las obtenidas mediante fibrobroncoscopia.

14.2.2. Tipos de observación microscópica

Observación directa

Es una técnica sencilla que consiste en tomar una gota de LCR, colocarla entre porta y cubre y examinarla a x400 en un microscopio de campo claro. La observación de levaduras redondas, algunas de las cuales presentando gemas, es característica de *C. neoformans*. Pueden asimismo observarse formas capsuladas, hecho que se hace más evidente al emplear contraste de fases. Los problemas que presenta la interpretación de la visualización microscópica directa tienen que ver sobre todo con la experiencia del observador, dado que otras formas redondas que pueden verse en los LCR, como las gotas de grasa o los hematíes (más habituales en punciones traumáticas) pueden confundir a observadores inexpertos.

Tinta china

Es la técnica más ampliamente recogida en la literatura para poner de manifiesto la cápsula de

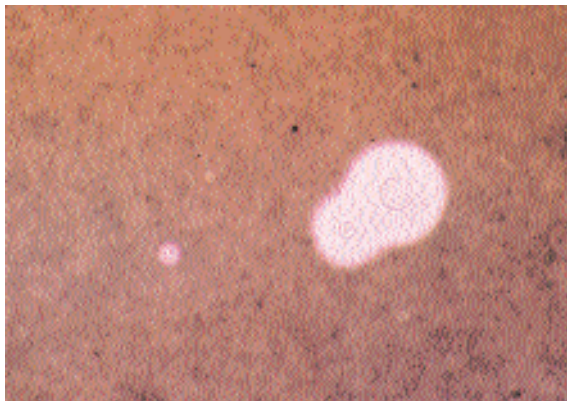


Figura 14.1. Tinción con tinta china para observar la cápsula de *C. neoformans*.

C. neoformans. La cápsula aparece como un halo claro y nítido en torno a una levadura redonda, delimitado por las partículas de carbón en suspensión coloidal de la tinta china, exhibiendo un nítido contraste (Figura 14.1).

Los problemas que pueden aparecer con

esta técnica tienen sobre todo que ver con la experiencia del observador, ya que puede haber numerosos artefactos (hematíes, burbujas de aire, leucocitos, partículas de talco y gotas de grasa) que pueden confundir, sobre todo cuando las formas de *C. neoformans* carecen de cápsula. La cantidad de tinta no debe ser ni excesiva ni escasa, ya que, en ambos casos, el riesgo de artefactos se incrementa. Es importante manipular con cuidado el frasco de tinta evitando todo contacto con la muestra clínica que pueda contaminarlo y así producir falsos positivos. La sensibilidad de la tinta china es del 50% en los pacientes no-HIV y del 70-88% en los pacientes HIV con meningitis criptocócica.

Reactivos

- Tinta china de buena calidad (nigrosina, tinta Pelikan India Ink o Parker Black Ink, entre otras).

Procedimiento

Depositar sobre un porta limpio y desengrasado una gota de LCR y una de tinta china, mezclarlas bien evitando formar burbujas y colocar el cubre. El color de la preparación deberá ser marrón, no negro. La observación se realiza a x100 ó x400. La presencia de formas redondas rodeadas de un halo grande y transparente son sugestivas de *C. neoformans* (Figura 14.1).

Hidróxido potásico (KOH)

Puede utilizarse para examinar muestras clínicas con abundantes células y restos celulares. El KOH disuelve más rápidamente los elementos celulares que los hongos (protegidos por la pared celular). El efecto clarificador del KOH puede aumentarse calentando ligeramente la preparación. Si no se utiliza con colorantes, las preparaciones deben estudiarse con un microscopio convencional con luz reducida para aumentar el contraste o con un microscopio de contraste de fases. La observación de fragmentos de hifas tabicadas y ramificadas en ángulo agudo es sugestiva de aspergilosis. Esta técnica es más rápida que la tinción de Gram pero presenta los mismos problemas de especificidad para diferenciar hongos con morfología similar.

Reactivos

- Solución de KOH al 15% (KOH 15 g, glicerol 20 ml, agua destilada 80 ml). Mezclar por agitación.

Procedimiento

Se deposita el material a examinar en un porta y se añade una gota de la solución de KOH, se mezclan bien y se coloca el cubreobjetos. Tras un periodo de tiempo (5-10 min) para permitir el aclaramiento de la muestra por el KOH, la preparación se examina a x100, x400 ó x1.000.

Blanco de calcoflúor

La técnica se basa en la propiedad que tiene este fluorocromo de unirse de forma inespecífica a los residuos b-1,3 presentes en polisacáridos como la celulosa y la quitina de la pared celular de los hongos y de algunos protozoos. La observación de formas redondas o filamentosas cuyo perímetro exhibe fluorescencia azul brillante es altamente sugestiva de formas fúngicas. En los hongos tabicados, el tabique se observa claramente (Figura 14.2). En el caso de *C. neoformans* hay que tener en cuenta que la fluorescencia se acumula en la pared celular y no en la cápsula, por lo que las formas capsuladas y no capsuladas presentan la misma morfología. *C. glabrata* puede presentar una fluorescencia débil. La observación de fragmentos de hifas ramificadas en ángulo agudo, cuyo perímetro y tabiques exhiben fluorescencia azul brillante es altamente sugerente de colonización por un hongo filamentosos, presumiblemente *Aspergillus* (Figura 14.3). La tinción es inespecífica y cualquier hongo filamentosos puede exhibir este tipo de fluorescencia, por lo que dicha técnica debe interpretarse de forma presuntiva y siempre confirmarse la identificación mediante cultivo. Resultados similares se obtienen con otros compuestos fluorescentes como el Blankophor-P-Flüssig (Bayer) (Figura 14.4).

Como en las técnicas anteriores, la experiencia del observador ayuda a resolver ciertos problemas asociados a esta técnica: las fibras de algodón o las impurezas de la propia tinción pueden exhibir fluorescencia, aunque se diferencian claramente de las formas fúngicas intensamente fluorescentes. Por otra parte, no todos los laboratorios están equipados con microscopios que tienen filtros apropiados para la tinción con calcoflúor, por lo que esta técnica puede emplearse como confirmación en caso de dudas al emplear la tinta china o la visualización directa, siempre que se disponga de una mínima infraestructura. Debe tenerse en cuenta que el filtro de fluorescencia que se emplea para visualización de micobacterias (tinción de auramina) no sirve para la observación con calcoflúor.

Reactivos

- Solución de calcoflúor al 0,05%. Calcoflúor White M2R (Sigma) 0,05 g, agua destilada 100 ml. Mezclar y calentar ligeramente si no se disuelve bien. Filtrar si persiste el precipitado.

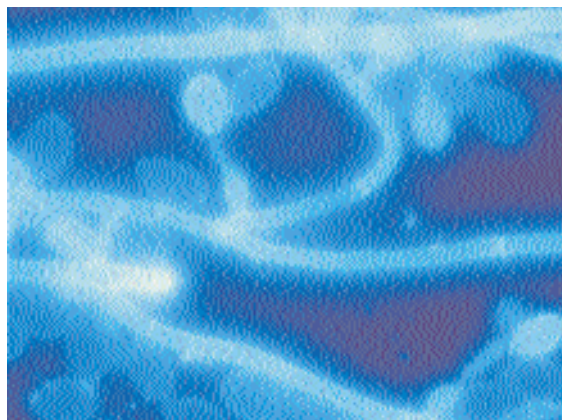


Figura 14.2. Tinción con calcoflúor de un hongo tabicado (*Scedosporium prolificans*).

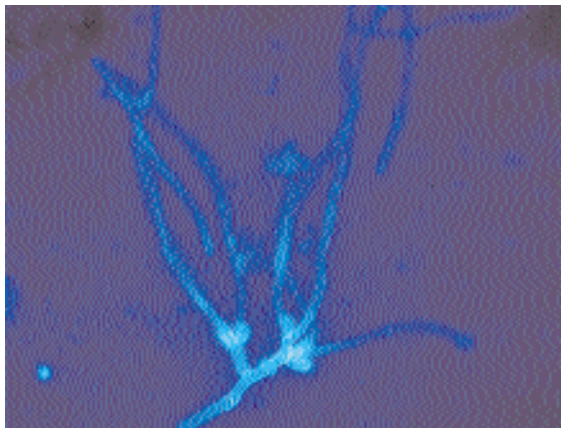


Figura 14.3. Tinción con calcoflúor de *A. fumigatus* en drenaje biliar [1].

Almacenar a 25 °C en la oscuridad.

Procedimiento

Se depositan partes iguales de la solución de calcoflúor y de la muestra clínica sobre un porta, se mezclan bien y se coloca el cubreobjetos. A continuación se examina con microscopio de luz ultravioleta provisto de un filtro que varía según la marca de microscopio empleada (de 400-500 nm como norma general) y se examina a x100 y x400. Cuando interese aclarar la muestra, puede añadirse una gota de KOH, al 15%, a la mezcla inicial de calcoflúor y muestra clínica.

Otras tinciones sencillas

También se puede recurrir a otros procedi-

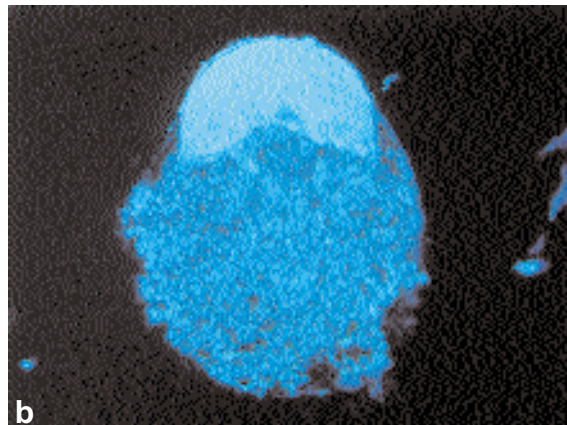


Figura 14.4. Tinción con Blankophor P. a: *A. fumigatus* en lavado broncoalveolar; b: *C. immitis* en secreción traqueal de un ratón infectado experimentalmente; c: *P. brasiliensis* en cultivo a 37 °C (Cortesía del Dr. R. Rüchel).

©2001 Revista Iberoamericana de Micología - ISBN: 84-607-3050-6

mientos de tinción no demasiado complejos que se detallan en el Capítulo 4:

- Hidróxido potásico (KOH) + DMSO
- Lactofenol de Amman
- Colorante de Cohen
- Colorante de Kane

Tinción de Gram

La tinción de Gram no se utiliza habitualmente para la tinción de hongos en muestras clínicas pero en ocasiones puede aportar información importante al observador experimentado (Figura 14.5). Normalmente los hongos se comportan como microorganismos grampositivos. Sin embargo, la observación de fragmentos de hifas tabicadas gramnegativas y ocasionalmente ramificadas en ángulo agudo (45°) es altamente sugestiva de colonización del árbol respiratorio por un hongo filamentososo. Esta técnica es poco sensible por lo que se recomienda realizar una primera observación a

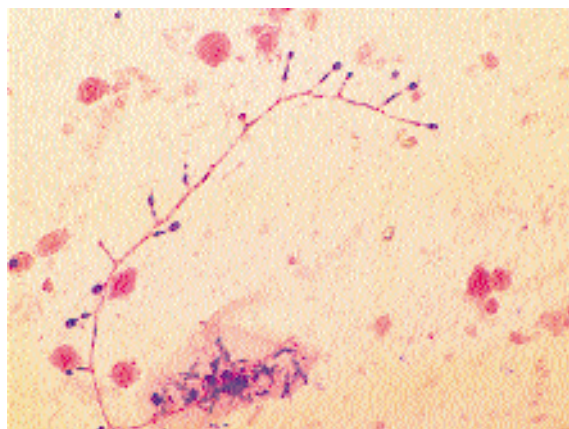


Figura 14.5. Tinción de Gram mostrando *S. prolificans* en esputo. (Cortesía del Dr. R. Salesa).

menor aumento (x400) para detectar dichos fragmentos. Es además poco específica, ya que hongos filamentosos diferentes de *Aspergillus* (*Pseudoallescheria boydii*, *Fusarium* spp., *Penicillium marneffei*) pueden presentar un aspecto similar, por lo que siempre se debe confirmar la identificación por cultivo en los medios micológicos adecuados.

Tinciones para *P. carinii*

Se utilizan varios tipos de tinciones, siendo las más empleadas la de Giemsa y la argéntica. Las tinciones rápidas de Giemsa (Diff-Quik o Giemsa Plus) se realizan en menos de 5 min y permiten la observación de trofozoítos de *P. carinii* y otros hongos como *Cryptococcus* e *Histoplasma*. La tinción argéntica se realiza en aproximadamente 2 h (Figura 14.6). En todas las tinciones se requiere experiencia para distinguir la morfología de *P. carinii*.

Preparación de la muestra

1. Fluidificación. Las muestras que contengan mucosidad deben fluidificarse con un agente mucolítico, añadido en una proporción entre igual a dos veces el volumen de la muestra (2-3 ml). Se deja actuar el mucolítico durante 15 min a temperatura ambiente. Si el volumen de muestra fuera mayor (> 20 ml), se puede concentrar por centrifugación antes de la adición del mucolítico.
2. Concentración. Una vez fluidificada, centrifugar la muestra a 1.300 g durante 5 min. Decantar el sobrenadante y resuspender el sedimento con la ayuda de una pipeta Pasteur.
3. Fijación. Se coloca una gota del sedimento en el centro de un portaobjetos. Se seca al aire y, en el caso de realizar tinción de Giemsa o tinción argéntica, se fija con metanol.

Tinción rápida de Giemsa

Se pueden utilizar técnicas comerciales como Diff-Quik o Giemsa Plus.

1. Se añaden 1 ó 2 gotas de la solución roja (solución 1) sobre la muestra, se deja actuar durante 10 segundos y se escurre.
2. Se añaden 1 ó 2 gotas de la solución azul (solución 2), se deja durante 10 segundos, se escurre y se lava muy ligeramente con agua desionizada.
3. Se deja secar y se procede a la observación de la muestra.

Tinción de Giemsa

La solución de trabajo se debe preparar nueva cada día a partir de la solución comercial, diluyéndola al 1:20 en tampón fosfato conteniendo 0,01% de Triton X-100. En esta solución se introduce el portaobjetos con la muestra fijada, manteniéndose durante 30 min. Al cabo de este tiempo, se introduce en tampón fosfato, se escurre y se deja secar al aire.

Tinción argéntica (Gomori-Grocott modificada)

1. Cubrir el portaobjetos con la muestra fijada con una solución de ácido crómico al 10%, dejando actuar durante 10 min. Pasado este tiempo se lava el portaobjetos con agua desionizada.
2. Cubrir con una solución de metabisulfato sódico al 1% durante 1 min.
3. Lavar con agua desionizada e introducir el portaobjetos en un recipiente donde se ha preparado previamente la solución de trabajo de metenamina-nitrato de plata, con los siguientes componentes en este orden: 20 ml de metenamina al 3%, 1 ml de nitrato de plata al 5%, 1,5 ml de borato sódico al 5% y 17 ml de agua desionizada. Tapar el recipiente e introducir en un microondas, al 50% de su potencia, durante aproximadamente 60 segundos (si el microondas no tuviese plato giratorio, debe pararse a los 30 segundos, girar el recipiente 90° y volver calentar otros 30 segundos). Posteriormente, mantener la solución caliente durante 2 min (deberá tomar un color marrón oscuro).
4. En caso de que no se disponga de microondas, se puede utilizar un baño de agua a 80° C, donde se coloca el recipiente con la solución de tinte 6 min antes de colocar en el mismo el portaobjetos. Se mantiene en esas condiciones durante otros 5 min, debiendo cambiar el color de la solución, como en el caso anterior, de marrón a negro.
5. En ambos casos, transcurrido el tiempo corres-

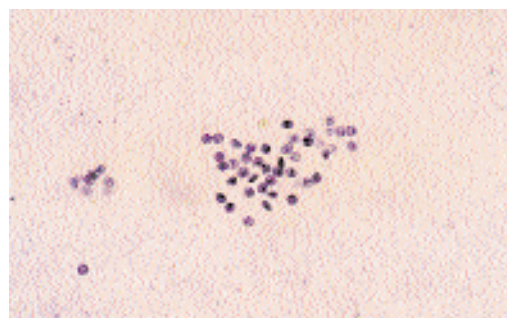


Figura 14.6. Tinción argéntica de *P. carinii*. (Cortesía del Dr. M. Álvarez).

pondiente, sacar el portaobjetos y lavar con agua desionizada.

6. Sumergir y sacar el portaobjetos en una solución de cloruro de oro al 1%; seguidamente, lavar con agua desionizada.
7. Cubrir el portaobjetos con una solución de tiosulfato sódico al 5% durante 1 min. Lavar de nuevo con agua desionizada.
8. Cubrir con una solución al 0,2% de verde brillante en ácido acético glacial durante 1 min. Lavar con agua desionizada, escurrir el portaobjetos y dejar secar.

Tinciones con anticuerpos

Uno de los puntos débiles de la observación microscópica de la muestra clínica es su escasa sensibilidad, sobre todo cuando el hongo se encuentra en una baja concentración (Figura 14.7). En estos casos pueden utilizarse anticuerpos dirigidos contra antígenos específicos de los hongos para facilitar la observación y conseguir la identificación del hongo. La utilización de anticuerpos tiene particular interés en la identificación de *P. carinii* en muestras respiratorias y en la identificación de diversos hongos en cortes histológicos, incluso después de que la fijación impida su cultivo [2,3].

Técnica general

Reactivos

- Anticuerpos monoclonales contra diversos hongos (Dako).
- Tampón Fosfato Salino (PBS): NaH_2PO_4 0,386 g, Na_2HPO_4 1,02 g, NaCl 8,5 g, Agua destilada 1 l. Ajustado a pH 7,2.
- PBS-Azul de Evans-Tween 20 (PBS-ET): Tween 20 0,5 ml, Azul de Evans 0,5 g, PBS 1 l.
- Tampón Carbonato-Bicarbonato: Na_2CO_3 53 g, NaHCO_3 42 g, Agua destilada 1 l. Ajustado a pH 9,0.
- Glicerina Tamponada: Glicerina 90 ml, Tampón Carbonato-Bicarbonato 10 ml.

Procedimiento

1. Los cortes histológicos se desparafinan y se lavan con PBS durante 10 min.
2. La preparación se cubre con 500 μl del anticuerpo monoclonal específico para el hongo buscado, diluido 1:50 en PBS-ET, y se incuba en cámara húmeda a 37 °C durante 30 min.
3. Tras la incubación, el portaobjetos se lava en PBS y se incuba de nuevo en las mismas condiciones del paso anterior con un conjugado anti-

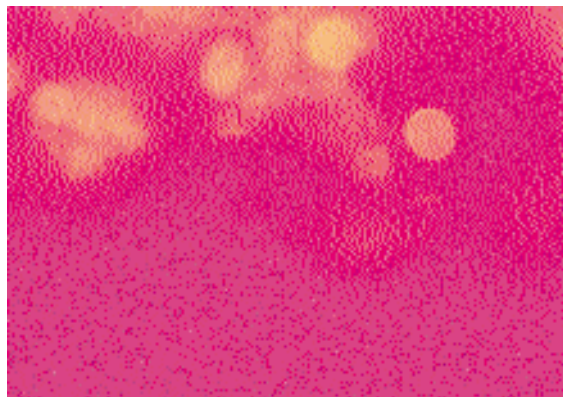


Figura 14.7. Inmunofluorescencia indirecta con un antisuero anti-*C. albicans* para demostrar la presencia de *Candida* en tejido esofágico.

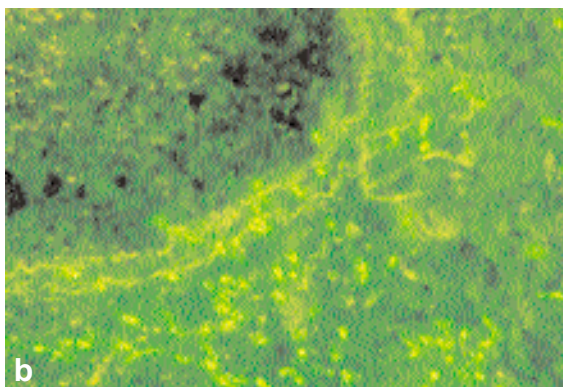
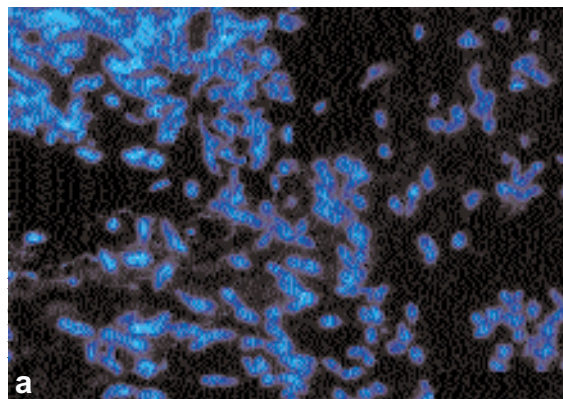


Figura 14.8. Tejido cerebral de un paciente con leucemia aguda mieloblástica donde se observan elementos fúngicos. a: Tinción con Blankophor P; b: Tinción con anticuerpos anti-*Aspergillus* observándose fluorescencia sobre los elementos fúngicos. (Reimpreso de la referencia Binder y Rüchel [2] con el permiso de los autores y de la editorial Blackwell Wissenschafts-Verlag Berlin, GmbH).

Monofluo Kit *P. carinii* (Bio-Rad)

La prueba es una inmunofluorescencia indirecta para detectar *P. carinii* en lavados broncoalveolares, aspirados bronquiales y esputos inducidos utilizando un anticuerpo monoclonal que reacciona específicamente con un antígeno de la pared del quiste de *P. carinii*.

Reactivos y material

Además de los reactivos proporcionados con la prueba, se necesitan los siguientes reactivos y materiales:

- Papel absorbente
- Guantes de látex
- Micropipetas de 5, 20 y 250 µl
- Pipetas de 1 y 10 ml
- Pipetas Pasteur estériles
- Tubos de centrifuga graduados de 10 ó 25 ml
- Portas para inmunofluorescencia
- Centrifuga para tubos de 25 ml que permita la centrifugación a 1.500 rpm
- Agitador para tubos.
- Metanol
- Estufa para incubar las muestras a 37 °C
- Cámara húmeda
- Cubreobjetos
- Microscopio de fluorescencia

Procesamiento de las muestras

El tratamiento inicial es distinto si se trata de un esputo o de aspirados bronquiales y lavados broncoalveolares.

Esputo

1. Añadir a 2-3 ml del esputo el mismo volumen de dithiothreitol al 0,3% (1,5 g en 500 ml agua destilada). Agitar e incubar 5 min a 37 °C.
2. Añadir un volumen igual de PBS y agitar hasta conseguir una buena mezcla. Centrifugar a 1.500 rpm, 10 min.
3. Retirar el sobrenadante y resuspender el sedimento con 500 µl de PBS. Si no se ha eliminado todo el moco de la muestra, se repiten los pasos 1 y 2.

Aspirados bronquiales y lavados broncoalveolares

1. Se centrifuga la muestra a 1.500 rpm, 10 min.
2. Retirar el sobrenadante.
3. Se resuspende el sedimento en un pequeño volumen de PBS hasta que la densidad del material no sea excesiva.

Técnica

1. Extender 20 µl de la muestra en el pocillo de un portaobjetos para fluorescencia. Dejar secar a 37 °C.
2. Fijar la muestra con metanol y dejar evaporar a temperatura ambiente.
3. Reconstituir el vial del enzima (R4) añadiendo 250 µl de HCl diluido (R5) al vial. Mezclar bien.
4. Diluir el enzima 1/10 con el diluyente (R3). Sólo se diluye la cantidad que se va a utilizar en el momento. La enzima sobrante no diluida se mantiene activa 6 meses a 2-8 °C.
5. Colocar sobre cada pocillo que contenga la muestra 20 µl de enzima diluido. Incubar exactamente 30 min a 37 °C en cámara húmeda.
6. Lavar con agua destilada y dejar secar al aire.
7. A cada uno de los pocillos que contienen la muestra se añaden 20 µl del anticuerpo anti-*P. carinii* (R1). Debe comprobarse que todo el pocillo está cubierto por el reactivo. Incubar durante 15 min a 37 °C en cámara húmeda.
8. Lavar con agua destilada y dejar secar al aire.
9. Añadir 20 µl del anticuerpo secundario conjugado con FITC (R2) a todos los pocillos e incubar durante 15 min a 37 °C en cámara húmeda.
10. Lavar con agua destilada y dejar secar al aire.
11. Montar el portaobjetos con el líquido de montaje (R6) y examinar con un microscopio de fluorescencia.

Interpretación de los resultados

Al observar la muestra al microscopio de fluorescencia, los quistes de *P. carinii* presentan una fluorescencia amarilla (Figura 14.9). Las muestras que contengan 5 o más quistes se consideran positivas. Las que contengan entre 1 y 5 quistes se consideran dudosas y deben ser repetidas. Si no se observan quistes fluorescentes la prueba se considera negativa.

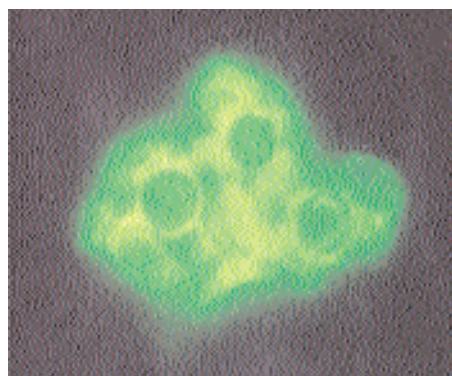


Figura 14.9. Observación de quistes de *P. carinii* mediante inmunofluorescencia indirecta.

14.3. Detección de antígeno

14.3.1. Aplicaciones a las micosis habituales en nuestro medio

Criptococosis

La detección de antígeno capsular en líquidos orgánicos y especialmente en líquido cefalorraquídeo (LCR) es de especial interés ante la sospecha de meningitis criptocócica. Ello se debe en gran parte a la rapidez, sencillez técnica y especificidad de la prueba que permite el diagnóstico, en 10-15 min, de aproximadamente el 99% de las meningitis criptocócicas [5] y el 67% de las criptococosis diseminadas [6]. El cultivo y aislamiento de *C. neoformans* puede requerir varios días debido a que se trata de una levadura de lento crecimiento.

Habitualmente se utilizan dos tipos de técnicas, una cualitativa y otra cuantitativa. La técnica cualitativa se emplea para diagnosticar nuevos casos de criptococosis o para confirmar reinfección especialmente en el sida. La técnica consiste en la detección de antígeno capsular criptocócico, que es de naturaleza polisacáridica, mediante anticuerpos monoespecíficos dirigidos frente a él y unidos a partículas de látex. La aglutinación de estas partículas tras la reacción antígeno-anticuerpo se detecta a simple vista. Esta técnica emplea como control de aglutinación (látex de control) partículas de látex con inmunoglobulinas inespecíficas de conejo con el fin de detectar reacciones positivas falsas y así aumentar la especificidad de la técnica. La técnica cuantitativa se emplea habitualmente para el seguimiento de la evolución de pacientes ya diagnosticados mediante el título de antígeno capsular presente en la muestra clínica, que generalmente es suero o LCR. Es útil para conocer la eficacia del tratamiento antifúngico aplicado.

Crypto-LA Test

(Wampole Labs.)

La muestra más adecuada es LCR, pero la detección de antígeno también puede realizarse en suero.

Reactivos y material

Además de los reactivos proporcionados con la prueba, se necesitan los siguientes reactivos y

materiales:

- Tubos cónicos de centrifuga (15 ml)
- Centrifuga equipada con adaptadores para tubos de 15 ml
- Tubos de ensayo de vidrio
- Parafilm
- Hornillo de mesa
- Portaobjetos desengrasados y cubreobjetos
- Pipetas de 20-100 µl
- Agitador orbital (160 rpm)
- Pipetas de plástico desechables
- 2-mercaptoetanol (Merck)

Almacenamiento y transporte de las muestras de suero y/o LCR

1. Procesamiento en menos de 48 h: refrigerar a 2-8 °C.
2. Procesamiento después de 48 h: congelar a -20 °C. No congelar y descongelar innecesariamente.
3. Envío a centros de referencia: añadir timerosal a 1:10.000, envasar adecuadamente y enviar a temperatura ambiente.

Procesamiento del LCR

1. Realizar la punción lumbar del modo más aséptico posible. El volumen mínimo requerido para la realización de la prueba es de 0,2 ml, pero se aconseja un mayor volumen para realización de otras pruebas como bioquímica, recuento celular, tinta china y cultivos.
2. Centrifugar a 1.000 g durante 10 min.
3. Extraer al menos 0,2 ml del sobrenadante y depositarlos en el fondo de un tubo de vidrio, que se sella con parafilm.
4. En un baño a 56 °C sumergir el fondo del tubo durante 30 min para inactivar el sistema de complemento. Dejar enfriar hasta que la muestra alcance la temperatura ambiente. Como alternativa puede hervirse durante 5 min a 100 °C.

Procesamiento del suero

1. Extraer asépticamente 5 ml de sangre por venopunción en un tubo libre de anticoagulantes. El volumen mínimo para la realización de la prueba es de 0,2 ml de suero por lo que se precisa extraer un volumen mínimo de 0,5 ml de sangre total. Esta prueba no debe realizarse sobre plasma.
2. Permitir la formación de coágulo dejando el tubo en reposo durante 30 min a 21-25 °C.
3. Centrifugar a 1.000 g durante 15 min.
4. Transferir al menos 0,2 ml de suero al fondo de un tubo de vidrio que se sella con parafilm.
5. En un baño a 56 °C sumergir el fondo del tubo durante 30 min para inactivar el sistema de complemento. Dejar enfriar hasta que la muestra

alcance la temperatura ambiente. Como alternativa puede hervirse durante 5 min a 100 °C.

Técnica cualitativa

1. Habitualmente se emplea una placa de vidrio con las celdillas excavadas para depositar sobre él los diferentes reactivos. Se comienza marcando un par de celdillas por cada muestra a probar, una para el látex reactivo y otra para el látex control.
2. Se añaden 50 µl de muestra a cada celdilla del par.
3. Se añaden 50 µl de control positivo en su celdilla y 50 µl de control negativo en la suya. Es recomendable colocar los controles en el otro extremo de la placa de vidrio para evitar mezclas de muestras y controles en la fase de agitación.
4. Se añaden 50 µl de látex reactivo en las celdillas superiores y en los controles positivo y negativo.
5. Se añaden 50 µl de látex control en las celdillas inferiores de la placa de vidrio.
6. Con diferentes palillos, se mezclan los reactivos y las muestras dentro de cada celdilla y lo mismo se hace con los controles positivo y negativo.
7. Se coloca la placa de vidrio en un agitador por rotación a 160 rpm durante 10 min.

Lectura e interpretación de los resultados

Colocar la placa de vidrio bajo una luz potente y sobre fondo oscuro en busca de aglutinación visible a simple vista. Lo primero que se debe mirar es el control positivo. La interpretación de los resultados será la siguiente:

Control positivo: presencia de aglutinación en la celdilla con látex reactivo y ausencia en la de látex control.

Control negativo: ausencia de aglutinación en ambas celdillas de látex reactivo y de látex control.

Muestra positiva: aglutinación en la celdilla de látex reactivo con ausencia de aglutinación en la celdilla de látex control. Si también se obtiene aglutinación en la celdilla de látex control la prueba se considera positiva.

Muestra negativa: ausencia de aglutinación en la

celdilla de látex reactivo con independencia de la presencia de aglutinación o no en la celdilla de látex control.

Técnica cuantitativa

1. Preparar una batería de 8 tubos por cada muestra y una más para el control positivo, rotulando cada uno de los tubos.
2. Pipetear 250 µl de diluyente de muestra en cada uno de los 8 tubos para obtener diluciones seriadas de 1:2 hasta 1:256.
3. Pipetear 250 µl de muestra o de control positivo en el primer tubo de cada serie.
4. Mezclar con la pipeta la muestra y el diluyente en el primer tubo y transferir 250 µl al siguiente tubo, mezclar y repetir sucesivamente hasta el octavo tubo. Hacer lo mismo con la batería de tubos de dilución del control positivo.
5. Emplear una placa de vidrio por cada muestra/paciente y añadir 50 µl de cada tubo a cada par de celdillas (de látex reactivo y de látex control) comenzando por la muestra más diluida para evitar el efecto arrastre.
6. Añadir 50 µl de látex reactivo en cada una de las 8 celdillas, mezclando bien con un bastoncillo diferente cada vez.
7. Añadir 50 µl de látex control en cada una de las 8 celdillas de control y mezclar bien cada una de ellas.
8. Rotar durante 10 min a 160 rpm en un agitador-rotador.

Lectura e interpretación de los resultados

La lectura se realiza de forma análoga a la de la técnica cualitativa.

Resultado positivo: dilución más alta en que se observa aglutinación visible en la celdilla de reacción con ausencia de aglutinación en la celdilla de control. Cuando las celdillas de control muestran aglutinación se considera el resultado positivo cuando hay una diferencia de al menos cuatro diluciones entre la aglutinación de la celdilla reactiva y la de control.

Resultado negativo: la técnica cuantitativa se emplea cuando la cualitativa haya sido positiva. Sin embargo, puede ocurrir que sea positiva en la muestra sin diluir pero al diluir al 50%

Unos consejos...

- Si aparece aglutinación en la celdilla de látex control del control positivo o en alguna de las celdillas del control negativo, la prueba es inválida y debe repetirse. La aglutinación del control positivo es evidente a los pocos minutos, visible a simple vista y no deja lugar a dudas.
- La sensibilidad de las diferentes técnicas comercializadas varía entre el 93% y el 100% con un 93-98% de especificidad. Puede haber falsos positivos debidos a la presencia de factor reumatoide o en pacientes con lupus o sarcoidosis, que desaparecen al tratar el suero con pronasa o 2-mercaptoetanol. También se han descrito falsos positivos al arrastrar medio de cultivo de agar chocolate junto con la colonia, asas de platino o desinfectantes. La prueba es positiva en la infección sistémica por *Trichosporon beigeli*.

(primera dilución) no se obtenga aglutinación. En este caso el resultado de la técnica cualitativa debe interpretarse como negativo.

Detección de antígeno capsular con anticuerpos monoclonales

Recientemente se han comercializado técnicas de detección de antígeno capsular criptocócico basadas en EIA con anticuerpos monoclonales como Premier EIA Assay (Meridian Diagnostics). Estas técnicas son rápidas y específicas y no presentan falsos positivos en pacientes con lupus o debido a la presencia de factor reumatoide. Además, se han empleado con éxito sobre muestras de orina de pacientes con meningitis criptocócica, con alto grado de correlación con la antigenemia en LCR, y constituyen una alternativa menos invasora en estos pacientes.

Candidiasis

A pesar del gran número de antígenos estudiados, la detección de antígeno en pacientes con candidiasis invasora no ha permitido solucionar el problema diagnóstico que presenta esta micosis y no existe una prueba aceptada universalmente. La detección de manano parece ser más sensible y específica que el Cand-Tec y, ya que la detección de manano por aglutinación de partículas de látex puede estar al límite de detección de la técnica, es posible que el formato ideal para su detección sea un ELISA como el que se ha comercializado recientemente. La comercialización de pruebas para la detección de antígenos de *Candida* debería haber facilitado el diagnóstico serológico de la candidiasis invasora al disponerse de pruebas estandarizadas. Sin embargo, los resultados obtenidos hasta el momento son poco esperanzadores al haberse retirado del mercado varias pruebas, presentando las que quedan bastante variabilidad en las evaluaciones realizadas. Dado que la antigenemia en los pacientes con candidiasis invasora es transitoria, es posible que se necesite la combinación de técnicas que detecten diferentes antígenos o epítomos para aumentar la sensibilidad diagnóstica [7].

Platelia *Candida* Ag (Bio-Rad)

Es un ELISA que detecta manano en suero utilizando el anticuerpo monoclonal EBCA1. Este anticuerpo reconoce residuos β -1,5 del manano de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis* y *C. pseudotropicalis* pero no de *C. krusei*. El límite de detección de la prueba es 0,25 ng/ml de suero. Para aumentar su rendimiento, el fabricante aconseja utilizarla conjuntamente con la técnica de detección de anticuerpos Platelia *Candida* Ac/Ak/Ab.

Reactivos y material

- Además de los reactivos proporcionados con la prueba, se necesitan los siguientes materiales:
- Pipetas de 50, 100, 300 y 1.000 μ l.
 - Tubos Eppendorf o similares de 1,5 ml con tapones herméticos que resistan el calentamiento a 100 °C.
 - Centrífuga para tubos de 1,5 ml que permita la centrifugación a 10.000 g.
 - Agitador para tubos.
 - Baño para hervir las muestras.
 - Baño o estufa para incubar las muestras a 37 °C.
 - Lavador de microplacas.
 - Lector de microplacas equipado con filtros de 450 y 620 nm.

Almacenamiento y transporte de las muestras de suero

1. Procesamiento en menos de 24 h: refrigerar a 2-8 °C.
2. Procesamiento después de 24 h: congelar a -80 °C. No congelar y descongelar innecesariamente.

Procesamiento del suero

1. Extraer asépticamente la sangre por venopunción en un tubo libre de anticoagulantes. Permitir la formación de coágulo dejando el tubo en reposo durante 30 min a 21-25 °C. Retirar rápidamente el coágulo para evitar la hemólisis del suero.
2. Se introducen 300 μ l del suero a estudiar en un tubo Eppendorf de 1,5 ml.
3. Se añaden 100 μ l de la solución de tratamiento proporcionada con la prueba. Cerrar el tubo con tapón hermético.
4. En un baño con agua hirviendo sumergir el fondo del tubo durante 3 min para liberar el manano de los complejos con los anticuerpos.
5. Centrifugar a 10.000 rpm durante 10 min. Retirar el sobrenadante para la detección de manano.

Técnica

1. Se añaden 50 μ l de conjugado a cada uno de los pocillos de las placas de la prueba que se vayan a utilizar.
2. Se añaden 50 μ l del sobrenadante de cada uno de los sueros tratados en su pocillo. En pocillos diferentes, se añaden también 50 μ l de los sueros negativo y positivo, así como de los calibradores para la realización de la curva patrón.
3. Se cubren los pocillos con plástico adhesivo y se incuban a 37 °C durante 90 min.
4. Se lavan los pocillos 5 veces rellenándolos cada vez con 370 μ l de la solución de lavado y se secan invirtiéndolos sobre papel de filtro.
5. Se añaden 200 μ l de la solución sustrato-cromógeno a cada uno de los pocillos y se incuba en la

- oscuridad, a temperatura ambiente, durante 30 min.
- Se añaden 100 µl de la solución de parada a cada pocillo, utilizando el mismo orden que se siguió para añadir el sustrato.
 - Se limpia el fondo de los pocillos y se lee la densidad óptica a 450 nm (referencia 620 nm) utilizando un lector de placas. Esto debe hacerse dentro de los 30 min siguientes a realizarse la parada de la reacción.

Interpretación de los resultados

Previamente, preparar la recta patrón utilizando los resultados de los calibradores. Calcular la concentración de antígeno de cada muestra por extrapolación de la densidad óptica en la curva patrón. En cada realización la prueba debe ser validada de acuerdo a las densidades ópticas y rangos proporcionados por el fabricante. La interpretación de los resultados será la siguiente:

Unos consejos...

- Los sueros con concentraciones superiores a 2,5 ng/ml deben diluirse 1:5 con el suero control negativo y volverse a estudiar.
- El tratamiento del suero para liberar el manano de los inmunocomplejos es un paso crítico en la técnica. Debe asegurarse que los tubos permanecen el tiempo requerido a 100 °C.
- Un resultado negativo no excluye el diagnóstico de candidiasis invasora, ya que la mananemia es de corta duración. Se ha demostrado la existencia de una relación complementaria entre los títulos de anticuerpos anti-manano y los títulos de manano, por lo que un suero de un paciente a riesgo de desarrollar una candidiasis invasora que no tenga manano puede tener altos títulos de anticuerpos anti-manano y viceversa [11].
- La prueba puede ser positiva en pacientes tratados con Expafusin, debido a la reactividad del anticuerpo monoclonal con el almidón.

Resultado positivo:

concentración superior a 0,5 ng/ml.

Resultado intermedio:

concentración entre 0,25 y 0,5 ng/ml.

Resultado negativo:

concentración inferior a 0,25 ng/ml.

Aspergilosis

La detección de antígeno se considera la posibilidad más interesante para el diagnóstico de la aspergilosis invasora en pacientes inmunodeprimidos. La detección de galactomanano mediante un

ELISA comercializado permite el diagnóstico de la aspergilosis invasora con una especificidad del 81-95,4% y una sensibilidad del 82,5-96,2% [8]. Esta prueba es más sensible que el látex Pastorex *Aspergillus* y se ha demostrado que es positiva antes de que aparezca la sintomatología clínica.

Platelia *Aspergillus*

(Bio-Rad)

La prueba es un ELISA que detecta galactomanano en suero utilizando el anticuerpo monoclonal EBA-2, que reconoce el galactomanano de *A. fumigatus*, *A. flavus* y *A. niger*. El límite de detección de la prueba es 1 ng/ml de suero.

Reactivos y material

Además de los reactivos proporcionados con la prueba, se necesitan los siguientes materiales:

- Pipetas de 50, 100, 300 y 1.000 µl.
- Tubos Eppendorf o similares de 1,5 ml con tapones herméticos que resistan el calentamiento a 100 °C.
- Centrífuga para tubos de 1,5 ml que permita la centrifugación a 10.000 g.
- Agitador para tubos.
- Baño para hervir las muestras.
- Baño o estufa para incubar las muestras a 37 °C.
- Lavador de microplacas.
- Lector de microplacas equipado con filtros de 450 y 620 nm.

Almacenamiento y transporte de las muestras de

Unos consejos...

- La realización de la prueba se debe llevar a cabo en condiciones ambientales óptimas, en una habitación donde no se realicen cultivos de *A. fumigatus*, evitando el contacto de los conidios que puedan estar presentes en el aire con el medio de los tampones, soluciones y material que entra en contacto con las muestras. Dicho material debe ser desechable y encontrarse en condiciones óptimas de limpieza y esterilización.
- La prueba se debe realizar siguiendo meticulosamente las indicaciones del fabricante. Únicamente, si el volumen de suero es escaso, puede utilizarse la mitad de los volúmenes indicados por el fabricante para el pretratamiento de las muestras. Tal modificación no afecta a la prueba ELISA en sí.

suero

1. Procesamiento en menos de 24 h: refrigerar a 2-8 °C.
2. Procesamiento después de 24 h: congelar a -80 °C. No congelar y descongelar innecesariamente.

Procesamiento del suero

1. Extraer asépticamente la sangre por venopunción en un tubo libre de anticoagulantes. Permitir la formación de coágulo dejando el tubo en reposo durante 30 min a 21-25° C. Retirar rápidamente el coágulo para evitar la hemólisis del suero.
2. Introducir 150 µl del suero a estudiar en un tubo Eppendorf de 1,5 ml.
3. Añadir 50 µl de la solución de tratamiento proporcionada con la prueba (EDTA). Cerrar el tubo con tapón hermético y homogenizar.
4. En un baño con agua hirviendo sumergir el fondo del tubo durante 3 min para liberar el galactomanano de los complejos con los anticuerpos.
5. Centrifugar a 10.000 g durante 10 min. Retirar el sobrenadante para la detección de galactomanano.

Técnica

1. Los sueros liofilizados control se recomponen añadiendo 1 ml de agua destilada ultrapura estéril y esperando 2 ó 3 min para permitir la rehidratación del suero, tras la cual se mezcla bien con la pipeta.
2. Se añaden 50 µl de conjugado a cada uno de los pocillos de las placas de la prueba que se vayan a utilizar.
3. Se añaden 50 µl del sobrenadante de cada uno de los sueros tratados en su pocillo. En pocillos diferentes, se añaden también 50 µl de los sueros negativo y positivo, así como de los patrones para la realización de la curva patrón.
4. Se cubren los pocillos con plástico adhesivo y se incuban a 37 °C durante 90 min.
5. Se lavan los pocillos 5 veces rellenándolos cada vez con 370 µl de la solución de lavado diluida 1/10 y se secan invirtiéndolos sobre papel de filtro.
6. Se añaden 200 µl de la solución sustrato-cromógeno, preparada mezclando el cromógeno con el tampón sustrato (dilución 1/50), a cada uno de los pocillos y se incuban en la oscuridad, a temperatura ambiente, durante 30 min.
7. Se añaden 100 µl de la solución de parada a cada pocillo, utilizando el mismo orden que se siguió para añadir el sustrato.
8. Se limpia el fondo de los pocillos y se lee la densidad óptica a 450 nm y 620 nm utilizando un lector de placas. Esto debe hacerse dentro de los 30 min siguientes a realizarse la parada de la reacción.

Interpretación de los resultados

Para interpretar los resultados se debe calcular del índice "i", aplicando la siguiente ecuación:

$$i = \frac{DOm}{DOsu}$$

DOm = densidad óptica de la muestra

DOsu = densidad óptica del suero umbral

Siempre que se realice, la prueba debe ser validada de acuerdo a las densidades ópticas e intervalos proporcionados por el fabricante. La interpretación de los resultados será la siguiente:

Resultado positivo: $i > 1,5$
Resultado intermedio: $1,0 < i < 1,5$
Resultado negativo: $i < 1,0$

14.4. Detección de anticuerpos

14.4.1. Aplicaciones a las micosis habituales en nuestro medio

Criptococosis

La detección de anticuerpos en pacientes con criptococosis no tiene utilidad diagnóstica. Sin embargo, en un modelo de criptococosis animal se ha demostrado recientemente que la cinética de anticuerpos frente a antígenos de naturaleza proteica de *C. neoformans* puede servir para predecir la evolución de la enfermedad [9].

Candidiasis

En los últimos años, se ha cuestionado la utilidad de la detección de anticuerpos anti-*Candida* en pacientes con candidiasis invasora debido a que puede presentar dos limitaciones importantes: i) la detección de títulos altos de anticuerpos en pacientes que están solamente colonizados por *Candida* y ii) la respuesta de anticuerpos puede estar retrasada, reducida o no existir en pacientes inmunodeprimidos. Sin embargo, estos problemas podrían resolverse eligiendo los antígenos apropiados y utilizando técnicas lo suficientemente sensibles para detectar

títulos bajos de anticuerpos. Las pruebas comercializadas actualmente detectan anticuerpos contra el manano, la enolasa y los antígenos del micelio de *C. albicans*. Estas pruebas deben utilizarse para estudiar muestras seriadas del paciente, lo que permite analizar la evolución de los títulos de anticuerpo y su correlación con los datos clínicos y microbiológicos [7].

Aspergilosis

La detección de anticuerpos específicos en suero es, desde hace muchos años, una prueba complementaria clásica para confirmar el diagnóstico del aspergiloma pulmonar y de la aspergilosis broncopulmonar alérgica (ABPA). Las técnicas empleadas han sido muy diversas, siendo la más clásica la inmunodifusión (ID) en sus diferentes variantes y modificaciones. Sin embargo, estas técnicas clásicas disponibles comercialmente presentan una serie de problemas: i) falta de estandarización en los procedimientos de extracción de los antígenos de *Aspergillus*, debido a los medios de cultivo empleados, las condiciones de incubación (tiempo de incubación, temperatura, etc.) y a los procedimientos de extracción y purificación, y ii) variabilidad antigénica generada por estas mismas causas, que origina una falta de concordancia en los resultados obtenidos por los diferentes laboratorios y reacciones cruzadas entre diferentes especies de *Aspergillus* o con otros hongos.

En la última década se ha avanzado mucho en la caracterización de los antígenos de *A. fumigatus* (el agente etiológico más importante). Entre los cientos de antígenos descritos se ha conseguido caracterizar cuatro de los más importantes: la catalasa CAT1 (90 kDa) [10], la dipeptidildipeptidasa también llamada quimotripsina (79 kDa), la restrictocina (18 kDa) y el galactomanano (residuo polisacárido unido a distintas proteínas). Los dos primeros son fuertemente inmunogénicos y se utilizan ampliamente para la detección de anticuerpos. En la ABPA se detectan anticuerpos contra *A. fumigatus* específicos de la clase IgG en casi el 100% de los casos.

Varias técnicas pueden utilizarse para poner en evidencia la presencia de anticuerpos específicos frente a *Aspergillus* en pacientes con aspergiloma pulmonar. Las más utilizadas se basan en la inmunoprecipitación y detectan la formación de líneas de precipitación llamadas precipitinas que se forman por la reacción antígeno-anticuerpo. Hay numerosas variantes de esta técnica, pero las dos más ampliamente empleadas son la inmunodifusión (doble difusión, técnica de Ouchterlony) y la contrainmuno-electroforesis, que es una aceleración de la anterior utilizando campos eléctricos.

14.4.2. Técnicas comercializadas

Platelia *Candida* Ab/Ac/Ak

(Bio-Rad)

La prueba es un ELISA que detecta anticuerpos anti-manano en suero.

Reactivos y material

Además de los reactivos proporcionados con la prueba, se necesitan los siguientes materiales:

- Pipetas de 20, 100 y 400 µl.
- Tubos para realizar diluciones.
- Agitador para tubos.
- Baño o estufa para incubar las muestras a 37 °C.
- Lavador de microplacas.
- Lector de microplacas equipado con filtros de 450 y 620 nm.

Almacenamiento y transporte de las muestras de suero

1. Procesamiento en menos de 24 h: refrigerar a 2-8 °C.
2. Procesamiento después de 24 h: congelar a -80 °C. No congelar y descongelar innecesariamente.

Procesamiento del suero

Extraer asepticamente la sangre por venopunción en un tubo libre de anticoagulantes. Permitir la formación de coágulo dejando el tubo en reposo durante 30 min a 21-25 °C. Retirar rápidamente el coágulo para evitar la hemólisis del suero.

Técnica

1. Diluir el suero a estudiar realizando dos diluciones sucesivas 1:81 (10 µl del suero + 800 µl de diluyente). Se realiza la misma operación con los controles positivo y negativo y se preparan los calibradores para la realización de la curva patrón.
2. Se añaden 100 µl de cada uno de los sueros diluidos en su pocillo. En pocillos diferentes, se añaden también 100 µl de los sueros negativo y positivo, así como de los calibradores para la realización de la curva patrón.
3. Se cubren los pocillos con plástico adhesivo y se incuban a 37 °C durante 60 min.
4. Se lavan los pocillos 4 veces rellenándolos cada vez con 370 µl de la solución de lavado y se secan invirtiéndolos sobre papel de filtro.
5. Se añaden 100 µl del conjugado a cada uno de los pocillos.
6. Se cubren los pocillos con plástico adhesivo y se

incubaban a 37 °C durante 60 min.

7. Se lavan los pocillos 4 veces rellenándolos cada vez con 370 µl de la solución de lavado y se secan invirtiéndolos sobre papel de filtro.
8. Se añaden 200 µl de la solución de revelado a cada uno de los pocillos y se incuban en la oscuridad, a temperatura ambiente, durante 30 min.
9. Se añaden 100 µl de la solución de parada a cada pocillo, utilizando el mismo orden que se siguió para añadir la solución de revelado.
10. Se limpia el fondo de los pocillos y se lee la densidad óptica a 450 nm (referencia 620 nm) utilizando un lector de placas. Esto debe hacerse dentro de los 30 min siguientes a realizarse la parada de la reacción.

Lectura e interpretación de los resultados

Preparar la recta patrón utilizando los resultados de los calibradores. Calcular la concentración de anticuerpos anti-*Candida* de cada muestra por extrapolación de la densidad óptica en la curva patrón. En cada ensayo la prueba debe ser validada

Unos consejos...

- Los sueros con concentraciones superiores a 20 AU/ml deben diluirse 1:4 con el suero control negativo y volverse a estudiar. La concentración obtenida se multiplicará por cuatro.
- La presencia de anticuerpos anti-*Candida* es el resultado de una infección presente o pasada. Una variación importante en el título de anticuerpos anti-*Candida* puede constituir una evidencia de infección activa por *Candida* y debe confirmarse con los datos clínicos del paciente. Un resultado negativo no excluye el diagnóstico de candidiasis invasora en pacientes inmunodeprimidos, ya que su capacidad para producir anticuerpos puede estar disminuida. Se ha demostrado la existencia de una relación complementaria entre los títulos de anticuerpos anti-manano y los títulos de manano, por lo que un suero de un paciente a riesgo de desarrollar una candidiasis invasora que no tenga manano puede tener altos títulos de anticuerpos anti-manano y viceversa [11].

de acuerdo a las densidades ópticas y rangos proporcionados por el fabricante. La interpretación de los

resultados será la siguiente:

Resultado positivo:

concentración superior a 10 AU/ml.

Resultado intermedio:

concentración entre 5 y 10 AU/ml.

Resultado negativo:

concentración inferior a 5 AU/ml.

Anticuerpos antimicelio

(Vircell)

La prueba es una inmunofluorescencia indirecta para detectar anticuerpos contra antígenos del micelio de *C. albicans* en el diagnóstico y seguimiento de la candidiasis invasora [7].

Reactivos y material

Además de los reactivos proporcionados con la prueba, se necesitan los siguientes materiales:

- Papel absorbente
- Guantes de látex
- Micropipetas de 20 y 250 µl
- Pipetas Pasteur estériles
- Tubos o placas de microtitulación para realizar diluciones seriadas
- Centrífuga para tubos Eppendorf que permita la centrifugación a 2.000 rpm
- Agitador orbital para tubos
- Estufa para incubar las muestras a 37 °C
- Cámara húmeda
- Cubreobjetos
- Microscopio de fluorescencia

Procesamiento del suero

La existencia de anticuerpos antimanano en la mayoría de las personas hace que casi todos los sueros contengan anticuerpos que reaccionan con la superficie de las fases levaduriforme y micelial de *C. albicans* (Figura 14.10a). Para poder observar la existencia de anticuerpos contra la fase micelial (anticuerpos antimicelio) (Figura 14.10b), el suero debe adsorberse con levaduras de *C. albicans* inviables por calentamiento.

1. Añadir 80 µl de diluyente a uno de los viales que contienen el adsorbente y añadir 20 µl del suero a estudiar, previamente diluido 1/4 con diluyente. Agitar bien e incubar 60 min a temperatura ambiente en un agitador orbital.
2. Centrifugar a 2.000 rpm 10 min y retirar el sobrenadante.
3. Realizar diluciones seriadas del suero adsorbido. Dado que, con el tratamiento, el suero se encuentra diluido 1/20, realizar 3 diluciones dobles para conseguir el suero diluido a 1/40,

1/80 y 1/160.

Técnica

1. Ya que los portaobjetos de la prueba tienen 10 pocillos, se pueden estudiar dos sueros en un portaobjetos. Añadir 20 µl de cada una de las diluciones del suero (1/20, 1/40, 1/80 y 1/160) a cuatro pocillos de una misma fila de un portaobjetos. En los dos pocillos restantes añadir 20 µl de los sueros control positivo y negativo proporcionados con la prueba.

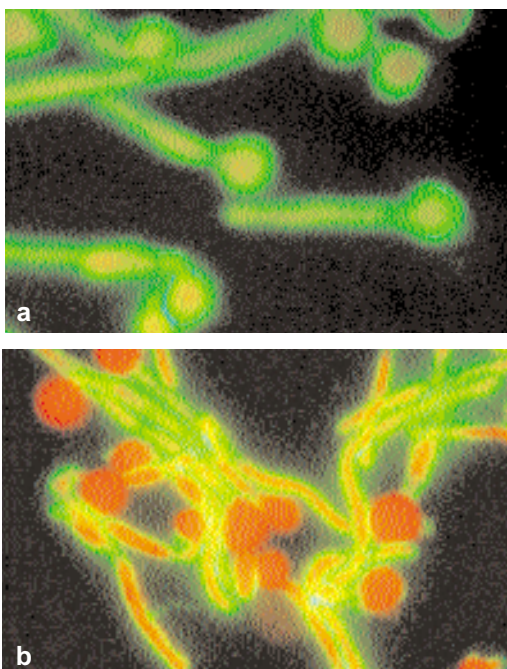


Figura 14.10. Observación mediante inmunofluorescencia indirecta. a: anticuerpos antimanano; b: anticuerpos antimicelio de *C. albicans*.

2. Incubar durante 30 min a 37 °C en cámara húmeda.
3. Lavar tres veces con PBS y dejar secar al aire o con una corriente de aire frío.
4. Añadir 20 µl del anticuerpo secundario conjugado con FITC a todos los pocillos e incubar durante 30 min a 37 °C en cámara húmeda.
5. Lavar tres veces con PBS y dejar secar al aire o con una corriente de aire frío.
6. Montar el portaobjetos con el líquido de montaje y examinar con un microscopio de fluorescencia.

Interpretación de los resultados

Al observar la muestra al microscopio, la fluorescencia deberá estar restringida a la fase micelial (**Figura 14.10b**). Las levaduras no deben presentar fluorescencia y aparecen de color rojo.

En el caso de que las levaduras presenten fluorescencia, el suero probablemente tiene títulos muy elevados de anticuerpos antimanano y, por tanto, el suero adsorbido la primera vez debe adsorberse de nuevo y repetirse la prueba. La presencia de anticuerpos antimicelio a un título igual o superior a 160 es compatible con una candidiasis invasora en un paciente inmunocompetente. Títulos menores pueden ser significativos en pacientes inmunodeprimidos. Si no se observan micelios fluorescentes la prueba se considera negativa.

Detección de anticuerpos frente a antígenos de *Aspergillus* (Bio-Rad)

Estas técnicas detectan precipitinas frente a antígenos de diversas especies de *Aspergillus*.

Reactivos y material

- Extractos antígenicos (6): Antígeno somático (extracto de micelio) y metabólico (filtrado de cultivo) de *A. fumigatus* y Ag metabólico de: *A. flavus*, *A. nidulans*, *A. niger* y *A. terreus*. Se presentan en frascos separados, liofilizados, y se reconstituyen con 1 ml de agua destilada. Una vez resuspendidos deben conservarse a -20 °C para evitar degradación de los antígenos.
- Sueros control positivo (6): son sueros de conejo inmunizados frente a cada extracto antígeno: dos para *A. fumigatus* (Ag somático y metabólico) y uno para cada una de las restantes cuatro especies.
- Azul de Coomassie: Tinción: disolver 1 g de Coomassie Brilliant Blue R-250 en 90 ml de etanol; después añadir 20 ml de ácido acético glacial y 90 ml de agua destilada. Esta solución puede reutilizarse muchas veces. Destinción: emplear la misma mezcla pero sin azul de Coomassie.
- Tampón veronal pH 8,2: disolver 15,85 g de barbitol sódico en 1.000 ml de agua destilada y 23 ml de HCl 1N. Opcionalmente puede emplearse tampón barbitol-barbitol sódico-Tris glicina pH 8,8.
- Tampón barbitol-barbitol sódico-Tris glicina pH 8,8: Solución A: mezclar 65 g de barbitol sódico y 23 ml de HCl 1N en 1.000 ml de agua desionizada. Solución B: mezclar 281 g de glicina, 226 g de Tris y 5.000 ml de agua desionizada.
- Ambos tampones se mezclan a partes iguales dependiendo del volumen de la cubeta de electroforesis, obteniendo el tampón de electroforesis, que tiene un pH de 8,8 y es 0,08 M.
- Agarosa al 1% (peso/volumen): disolver 10 g de agarosa en 500 ml de agua destilada, llevar hasta la ebullición. Dejar enfriar hasta 60 °C y añadir 500 ml de tampón veronal pH 8,2.
- Detección de actividad catalasa: mezclar 0,3 ml de peróxido de hidrógeno al 30% con 50 ml de tampón Tris 0,05 M pH 7,4. Solución de fija-

ción: ácido acético al 5% en agua destilada.

- Detección de actividad quimotripsina: Solución A: disolver 5 mg de naftil éster de N acetil DL fenilalanina en 2 ml de dimetilformamida. Solución B: disolver 10 mg de Diazoblue B en 18 ml de tampón Tris 0,05 M pH 7,4. Solución de fijación: ácido acético al 2% en agua destilada.

Además de los reactivos se necesitan los siguientes materiales:

- Pipetas de 20, 100 y 400 μ l
- Tubos para realizar diluciones
- Agitador para tubos
- Baño termostatzado
- Placas de petri redondas o cuadradas para la técnica de inmunodifusión
- Portaobjetos desengrasados para la técnica de contrainmunolectroforesis
- Cubeta de electroforesis

Técnica de Ouchterlony

(Bio-Rad)

También denominada doble difusión, consiste en dejar difundir el suero problema y los extractos antigénicos en pocillos separados de una placa de agarosa, permitiendo la migración de antígenos y anticuerpos específicos hasta un punto en el que reaccionan y originan unos arcos de precipitación (precipitinas) visibles a simple vista o mediante tinción de Coomassie. Existen numerosas variantes de esta técnica que afectan tanto al tipo de soporte empleado (placa petri redonda o cuadrada, portaobjetos) como al número y disposición de los pocillos, dilución de sueros, extractos antigénicos, etc. En el presente Capítulo y con ánimo de simplificar, se describe la técnica original, explicando posibles modificaciones en los comentarios.

Técnica

Se emplea una placa petri con agarosa al 1%, que debe ser lo más fresca posible, de 1-2 mm de altura, siendo aconsejable prepararla en el mismo día. Puede conservarse a 4 °C en cámara húmeda durante una semana. En ella se excava un pocillo central de 14 mm de diámetro y a 6 mm del mismo y dispuestos de forma radial 6 pocillos de 3 mm de diámetro. Para esta operación es aconsejable ayudarse de una plantilla y de un cilindro hueco del diámetro adecuado para practicar los pocillos. Después es aconsejable marcar cada pocillo periférico con la especie de *Aspergillus* cuyo extracto va a albergar.

1. Depositar 300 μ l de suero problema en el pocillo central.
2. Diluir cada extracto antigénico al 50% en agua y pipetear 200 μ l de cada extracto en su pocillo periférico correspondiente.
3. Incubar a temperatura ambiente, en cámara húmeda durante 3 días.

4. Observar la aparición de líneas de precipitación visibles a simple vista. Debe realizarse con luz oblicua sobre fondo oscuro para favorecer la visualización.
5. Además de las líneas de precipitación visibles a simple vista, hay otras más débiles que deberán ponerse de manifiesto mediante la tinción de Coomassie, que es una tinción específica de proteínas.
6. Tinción de Coomassie:
 - Colocar un papel absorbente grueso tipo Whatman de la medida de la placa petri directamente sobre el agar y colocar un peso encima para exprimir el exceso de humedad del gel durante 15 min.
 - Retirar el papel de filtro y realizar 3 lavados sucesivos de 15 min de duración con cloruro sódico 0,1 M en agua.
 - Retirar el último lavado y nuevamente colocar el papel de filtro con el peso durante otros 15 min.
 - Retirar el papel de filtro y secar con aire caliente (secador de pelo).
 - Inundar la placa con la solución de tinción de azul de Coomassie, incubando durante 5 min.
 - Retirar la solución de tinción e inundar la placa con solución de destinción durante 10 min. Este proceso puede reducirse en el tiempo o repetirse cuanto se quiera hasta ver claramente las bandas más finas.
7. Detección de actividad catalasa:
 - Mezclar 0,3 ml de agua oxigenada al 30% con 50 ml de tampón Tris 0,05 M pH 7.
 - Recubrir la placa de petri y observar la formación de burbujas que identificará el arco de precipitación que posee dicha actividad.
8. Detección de actividad quimotripsina (Técnica de Mancini):
 - Mezclar las soluciones A y B y recubrir la placa de petri durante 30 min a 37 °C. Eliminar el exceso de reactivo.
 - Fijar con ácido acético al 2% en agua destilada. Observar el aclaramiento de los arcos de precipitación que poseen dicha actividad.

Lectura e interpretación de los resultados

La primera lectura debe realizarse a simple vista, sin ayuda de las tinciones, buscando la presencia y el número de arcos de precipitación entre el pocillo central (suero problema) y los pocillos periféricos (extractos antigénicos).

Se considera que hay reactividad frente a un extracto antigénico cuando hay 3 o más arcos de precipitación entre el pocillo central y el del extracto. Entonces se informará que se detectan precipitinas frente a dicha especie de *Aspergillus*, lo que ante sospecha de aspergiloma se interpreta como colonización por dicha especie. En el aspergiloma pulmonar es común la positividad frente a más de una especie debido a varios factores que se comentarán en la nota posterior.

Si hay menos de 3 arcos de precipitación puede ser que se trate de un falso positivo, de un individuo sano con exposición al antígeno (*background* poblacional) o a que la técnica tiene insuficiente sensibilidad. Para mejorar este último punto se recomienda la tinción de Coomassie, que permite cuantificar con mayor exactitud el número de arcos de precipitación con cada extracto al poner en evidencia bandas más finas que no se aprecian a simple vista.

En todas las especies de *Aspergillus* probadas y especialmente en *A. fumigatus* la especificidad de la técnica mejora sensiblemente con el revelado por actividades catalasa y quimotripsina, cuyos arcos son específicos. La presencia de los mismos

no se acompañan de los demás criterios diagnósticos de ABPA.

En el estadio II de la ABPA (remisión) y tras el tratamiento de una exacerbación (estadio III), los niveles de precipitinas pueden ser indetectables por la baja sensibilidad de la técnica.

Inmunoelectroforesis

Se trata de una variante de inmunodifusión en la que la migración de los antígenos se ve acelerada al someterse a un campo eléctrico. Su principal ventaja es por tanto la rapidez. Este método presenta al igual que la doble difusión múltiples variantes pero las dos principales son las siguientes:

Técnica de Ouchterlony

Ventajas...

- Se trata de una técnica sencilla de realizar y no precisa de aparataje especial, por lo que puede realizarse en cualquier laboratorio.
- Permite cierta cuantificación mediante la dilución del suero problema, obteniendo la titulación del mismo.
- Es la técnica clásica de referencia junto con la contrainmunoelectroforesis, por lo que existe numerosa bibliografía disponible sobre la misma.

Inconvenientes...

- Es lenta, ya que precisa de una incubación de hasta 3 días, aunque a las 24 h ya se pueden observar arcos de precipitación.
- Tiene inconvenientes derivados de la falta de pureza y de estandarización de los extractos antigénicos empleados:
 - i) reacciones cruzadas entre distintas especies de *Aspergillus*: la presencia de precipitinas frente a más de una especie no significa necesariamente colonización por todas ellas. Estas reacciones cruzadas se extienden a otras especies de hongos e incluso algunas bacterias. Esto constituye una fuente de falsos positivos de especial importancia cuando se trata de enfermedades pulmonares no relacionadas con *Aspergillus*.
 - ii) variabilidad entre lotes de extractos antigénicos, lo que implica un patrón diferente de precipitinas.
 - iii) esta técnica no distingue el tipo de anticuerpo específico presente en el suero (IgG, IgM o IgE), lo que tiene especial interés en la ABPA.
 - iv) tiene una sensibilidad baja, ya que en individuos moderadamente inmunodeprimidos no hay suficientes niveles de anticuerpos para formar arcos de precipitación, originando falsos negativos. Debido a este problema, esta técnica no es de utilidad en aspergilosis invasoras, que suelen afectar a individuos con gran inmunosupresión.
 - v) el factor reumatoide y la proteína C-reactiva, presentes en el suero, y la sustancia C-reactiva, presente en algunos extractos antigénicos, pueden causar falsas precipitinas. Estas bandas desaparecen con el tratamiento previo del suero con quelantes del calcio (proteína C-reactiva) o con beta-mercaptoetanol (factor reumatoide).

indica colonización por esta especie.

A diferencia del aspergiloma pulmonar, en la ABPA bastan de 1 a 3 arcos de precipitación frente a *A. fumigatus* para considerar positivo el test de inmunodifusión. Hay que recordar que la presencia de arcos de precipitación en las pruebas serológicas de inmunodifusión no es característica exclusiva de la ABPA y que por sí solas no son diagnósticas si

- i) inmunoelectroforesis (IE): cuando los antígenos del extracto migran en el agar por mediación de un campo eléctrico y en un segundo paso los anticuerpos del suero migran por difusión simple.
- ii) inmunoelectroforesis cruzada, electrosinéresis o contrainmunoelectroforesis (CIE): cuando tanto antígenos como anticuerpos migran por el gel simultáneamente con ayuda de un campo eléctrico. Debido a que la CIE presenta considerables ventajas sobre la IE en cuanto a rapi-

dez y economía de reactivos, únicamente se describe la CIE en el presente Capítulo.

Contrainmunolectroforesis (Técnica de Bussard)

Consiste en someter simultáneamente a los sueros y los extractos antigénicos a un campo eléctrico. Los anticuerpos se colocan del lado del ánodo (+) y su baja carga negativa les hace migrar hacia el cátodo por electroendósmosis. Por el contrario, los antígenos colocados en el polo negativo se cargan negativamente a pH alcalino y migran hacia el polo positivo, cruzándose en su camino con los anticuerpos y formando líneas de precipitación. El resultado es similar a la inmunodifusión pero más rápido y sensible y además con un menor consumo de reactivos.

Técnica

1. Recubrir uno o varios portaobjetos desengrasados con 7 ml de agar al 2% en solución acuosa caliente y dejar enfriar 10 min. Se pueden conservar en cámara húmeda a 4 °C durante unos días.
2. Con ayuda de un cilindro sacabocados de 2 mm de diámetro practicar 2 filas de pocillos separadas 6 mm entre sí. Una fila irá al lado del cátodo (marcar como polo negativo) y la otra irá al lado del ánodo (marcar como polo positivo).
3. Por el dorso del portaobjetos marcar cada pocillo del lado del cátodo (-) con el tipo de extracto antigénico y cada pocillo del lado del ánodo (+) con el suero a probar. Esta operación es recomendable hacerla antes de verter el agar sobre el porta.
4. Distribuir 20 µl de cada extracto antigénico sin diluir en cada pocillo de la fila de antígenos y 20 µl de suero en cada pocillo de la fila de sueros.
5. Colocar el tampón de electroforesis en la cubeta y la lámina de agar teniendo cuidado en orientar los pocillos con suero hacia el polo positivo y los pocillos con antígeno hacia el polo negativo.
6. Si se emplea tampón veronal pH 8,2 la fuente de electroforesis se programará a 5 V/cm durante 90 min. Si se emplea tampón barbital-barbital pH 8,8 la fuente de electroforesis se programará a 10 V/cm durante 60 min.

Lectura e interpretación de los resultados

La lectura ha de hacerse inmediatamente después de la electroforesis y, de la misma forma

que la ID, primero a simple vista. Si se desea obtener mayor sensibilidad es recomendable emplear la tinción de Coomassie de modo idéntico a la ID, ya descrito. Una mayor especificidad se obtiene mediante el revelado de las actividades catalasa y quimotripsina del mismo modo que con la técnica de ID.

Los criterios de positividad son idénticos a los de la técnica de ID y tiene las mismas limitaciones que esta. Las principales ventajas de la CIE son su mayor rapidez, su mayor sensibilidad y el menor consumo de reactivos.

Hay que tener cuidado en colocar correctamente la polaridad de la lámina de agar porque de lo contrario la migración se realiza en sentido opuesto y no se observarían líneas de precipitación.

14.5. Detección de componentes no antigénicos

14.5.1. Aplicaciones a las micosis habituales en nuestro medio

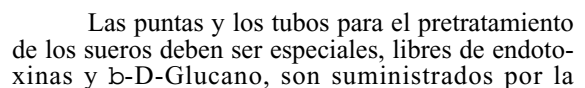
La detección de componentes no antigénicos liberados por los hongos durante la infección es otra alternativa para el diagnóstico de las micosis. Esta posibilidad es más reciente que la detección de anticuerpos y antígenos y se encuentra en desarrollo. Actualmente se basa en la detección de D-arabinitol, (1fi 3)-b-D-glucano y ADN.

El D-arabinitol es un metabolito producido por *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* y *C. kefyr* que puede detectarse mediante cromatografía gas-líquido o mediante una técnica enzimática comercializada en Japón. Niveles elevados de D-arabinitol se han detectado en pacientes con candidiasis invasora y su monitorización se ha mostrado útil en el seguimiento de estos pacientes [7]. La técnica presenta falsos positivos en pacientes con insuficiencia renal o en tratamiento con esteroides y suele ser necesario ajustar las concentraciones de D-arabinitol con respecto a las de creatinina o L-arabinitol. El D-arabinitol también puede detectarse en orina.

La detección de (1fi 3)-b-D-glucano en plasma es otra posibilidad diagnóstica en las micosis producidas por *Candida*, *Aspergillus* y *Pneumocystis*, ya que el ser humano carece de glucanasa para digerir (1fi 3)-b-D-glucano y por tanto

La tecnología de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), aunque todavía de forma experimental, está siendo empleada también en la detección de *Candida* y *Aspergillus* en muestras clínicas. La especificidad de algunos de los fragmentos amplificados hace posible la identificación de la especie directamente de la muestra clínica. En general, se han utilizado dos tipos de estrategias: la amplificación de fragmentos génicos altamente conservados en los hongos, con la intención de saber si la etiología de un proceso infeccioso es fúngica o no, y la amplificación de secuencias génicas específicas que permitan la identificación de la especie. A pesar de los prometedores resultados obtenidos en algunos trabajos, debe esperarse a la realización de estudios prospectivos para conocer el verdadero alcance de esta técnica en el diagnóstico de la candidiasis invasora. La técnica tiene que simplificarse y optimizarse considerablemente, ya que, cuando se ha comparado la detección de ADN por PCR con la detección de galactomanano en el diagnóstico de la aspergilosis invasora, la antigenemia era positiva con mayor frecuencia [13].

La prueba está basada en la capacidad del (1fi 3)-b-D-glucano para poner en marcha la vía de coagulación de los amebocitos *Limulus*. Estos amebocitos son las células sanguíneas presentes en la linfa de cangrejos de herradura como el *Limulus polyphemus*, que habita las costas del este de los



misma compañía.

Además de los reactivos proporcionados con la prueba, se necesitan los siguientes materiales:

- Pipeta de 10-50 µl
- Baño o estufa para incubar las muestras a 37 °C
- Centrífuga
- Lector de microplacas equipado con filtros de 545 y 630 nm

Técnica

1. A un tubo de los suministrados por el fabricante, con 50 µl del suero a estudiar se añaden 100 µl de la solución de ácido perclórico (reactivo 1A) y se incuba a 37 °C durante 30 min. Se centrifuga a 1.000 g durante 10 min.
2. Se toman 25 µl del sobrenadante y se pasan al pocillo de una microplaca que contiene 25 µl de la solución de hidróxido sódico (reactivo 2A). Posteriormente se añaden 50 µl del reactivo principal (reactivo 4G) en solución tampón (reactivo 3D). Se incuba a 37 °C durante 30 min. En otros pocillos se añaden 50 µl del control positivo [muestra estándar (reactivo 6C) en agua destilada (reactivo 5A)] y 50 µl del control negativo [agua destilada (reactivo 5A)]. A ambos se les añaden 50 µl del reactivo principal (reactivo 4G) en solución tampón (reactivo 3D), incubándose también a 37 °C durante 30 min.
3. A los tubos anteriores se añaden 50 µl de la mezcla nitrito sódico (reactivo 8B) y ácido clorhídrico (reactivo 7B), 50 µl de sulfamato amónico (reactivo 9B) en agua destilada (reactivo 5B), y 50 µl de la mezcla etilendiamina (reactivo 10B) y pirrolidona (reactivo 11A).
4. Se lee la absorbancia a 545 y 630 nm.

Interpretación de los resultados

Dado que la absorbancia de los pocillos se mide a 545 nm utilizando como longitud de onda de referencia 630 nm, se debe restar el valor obtenido a 545 nm del obtenido a 630 nm, obteniéndose lo que se denomina valor de la absorbancia final. El valor de la absorbancia final del blanco debe ser menor o igual a 0,07 para que la prueba quede validada.

Para calcular la concentración final de (1fi 3)-b-D-glucano de cada muestra (C) se utiliza la siguiente fórmula:

$$C = C_p \times \frac{DE_m}{DE_c} \times \text{dil.}$$

C_p = Concentración del patrón

DE_m = Incremento de E de la muestra

DE_c = Incremento de E del control

dil. = dilución

Siendo la concentración del patrón (valor expresado en pg/ml) la cantidad de (1fi 3)-b-D-glucano contenida en la muestra patrón, utilizada como control positivo, cuyo valor depende del lote de Fungitec que se esté utilizando.

El incremento de E de la muestra se define como la absorbancia final de la muestra menos la absorbancia final del blanco.

El incremento de E del control se define como la absorbancia final obtenida por el control positivo menos la absorbancia final del blanco.

Resultado positivo:

C > 20 pg/ml de (1fi 3)-b-D-glucano

Resultado dudoso:

10 < C < 20 pg/ml de (1fi 3)-b-D-glucano

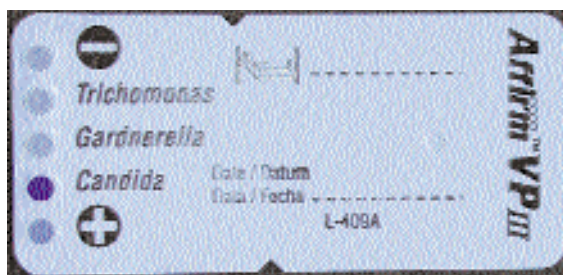


Figura 14.12. Reacción positiva para *Candida* en el Affirm VP III.

Resultado negativo:

C < 10 pg/ml de (1fi 3)-b-D-glucano

Detección de *C. albicans* con una sonda de ADN (Affirm VP III®)

(Becton Dickinson)

La prueba Affirm VP III está basada en la utilización de una sonda de ADN para la detección de *Candida* en muestras vaginales. La técnica detecta también la presencia de *Gardnerella vaginalis* y *Trichomonas vaginalis*. La prueba utiliza dos sondas diferentes para cada organismo, una de captación y otra de revelado. La prueba consta de tres pasos: i) la preparación de la muestra (tratamiento con la solución de lisis y calor), ii) el procesamiento automático de análisis (se realiza en un aparato específico denominado Procesador B-D Micro-

Probe) y iii) la interpretación de los resultados (la reacción positiva se observa por la aparición de un color azul) (Figura 14.12). La prueba ha presentado una concordancia con el CHROMagar Candida del 95% [14].

Reactivos y material

Todos los reactivos están contenidos en el kit. Estos reactivos son:

- Tarjetas de análisis
- Cassettes con reactivos
- Solución de sustrato
- Solución de lisis
- Solución tampón
- Puntas de filtro
- Torundas

Además de los reactivos proporcionados con la prueba, se necesitan los siguientes materiales:

- Equipos para la recogida de muestras

- Procesador B-D Micro-Probe
- Bloque de lisis B-D Micro-Probe

Técnica

1. La recogida de la muestra es un paso crítico y debe realizarse con la torunda de Dacron proporcionada con la prueba. Las muestras deben procesarse en la hora siguiente a la toma si se mantienen a temperatura ambiente o en las 4 h siguientes a la toma si se mantienen a 2-8 °C.
2. Tras verificar que el bloque de lisis está a 85±5 °C y que los reactivos están a temperatura

Se agradece a los Drs. Reinhard Rüchel, Ricardo Salesa y Mikel Álvarez la cesión de algunas de las figuras mostradas.

Referencias

1. García Ruíz JC, Hernández I, Muñoz F, Álvarez Blanco A, Pontón J. Cholangitis due to *Aspergillus fumigatus* in a patient with acute leukemia. Clin Infect Dis 1998; 26: 228-229.
2. Binder C, Ruchel R. Mixed systemic mycosis with fatal outcome in a patient with acute myeloblastic leukaemia. Mycoses 2000; 43: 59-63.
3. Ruchel R, Schffrinski M. Versatile fluorescence staining of fungi in clinical specimens by using the optical brightener Blankophor. J Clin Microbiol 1999; 37: 2694-2696.
4. Andreas S, Heindi S, Wattky C, Möller K, Ruchel R. Diagnosis of pulmonary aspergillosis using optical brighteners. Eur Respir J 2000; 15: 407-411.
5. Kaufman L, Reiss E. Serodiagnosis of fungal diseases. En: Lennette EH, Balows A, Hausler WJJ, Shadomy HJ (Eds.) Manual of Clinical Microbiology. Washington D.C., American Society for Microbiology Press, 1985: 924-944.
6. Edson RS, Fernandez-Guerrero M, Roberts GD, Van Scoy RE. Clinical and laboratory features of cryptococcosis. A five year experience. Min Med 1987; 70: 337-342.
7. Pontón J, Moragues MD, Quindós G. Non-culture based diagnostics. En: Calderone R (Ed). *Candida* and Candidiasis. Washington D. C., American Society for Microbiology, 2002: 395-425.
8. Sulahian A, Tabouret M, Ribaud P, et al. Comparison of an enzyme immunoassay and latex agglutination test for detection of galactomannan in the diagnosis of invasive candidiasis. Eur J Clin Microbiol 1996; 15: 139-145.
9. Neuville S, Lortholary O, Dromer F. Do kinetics of the humoral response to *Cryptococcus neoformans* proteins during murine cryptococcosis reflect outcome? Infect Immun 2000; 68: 3724-3726.
10. López-Medrano R, Ovejero MC, Calera JA., Puente P, Leal F. An immunodominant 90-kilodalton *Aspergillus fumigatus* antigen is the subunit of a catalase. Infect Immun 1995; 63: 4774-4780.
11. Sendid, B, Tabouret M, Poirot JL, Mathieu D, Fruit J, Poulain D. New enzyme immunoassays for sensitive detection of circulating *Candida albicans* mannan and anti-mannan antibodies: useful combined test for diagnosis of systemic candidiasis. J Clin Microbiol 1999; 37: 1510-1517.
12. Hossain MA, Miyazaki T, Mitsutake K, et al. Comparison between Wako-WB003 and Fungitec G tests for detection of (1-3)-beta-D-glucan in systemic mycosis. J Clin Lab Anal 1997; 11: 73-77.
13. Reiss E, Obayashi T, Orle K, Yoshida M, Zancopé-Oliveira RM. Non-culture based diagnostic tests for mycotic infections. Med Mycol 2000; 38 (Supl. 1): 147-159.
14. Alonso-Vargas R, Iglesias JJ, Ruesga MT, et al. Utility of a DNA hybridisation test (AFFIRM VP11) for the rapid diagnosis of *Candida* vaginitis. Rev Iberoam Micol 2000; 17: S136.

Emilia Cantón Lacasa
Estrella Martín Mazuelos
Ana Espinel-Ingroff

15.1. Fundamento

Cuando la anfotericina B y la 5-fluorocitosina eran las únicas opciones terapéuticas para el tratamiento de las infecciones fúngicas profundas, la realización de pruebas de sensibilidad antifúngica no estaba muy justificada. A medida que la industria farmacéutica fue introduciendo en el mercado nuevos antifúngicos o nuevas formulaciones de los ya conocidos, se hizo necesaria la realización de pruebas de sensibilidad con el fin de comparar la actividad de los mismos y detectar las posibles resistencias.

Motivado por esta nueva realidad, el comité norteamericano de estándares en laboratorios clínicos (NCCLS) realizó, en 1985, una encuesta en diferentes laboratorios para conocer qué pruebas de sensibilidad antifúngica realizaban habitualmente y cómo las realizaban. Además, se les solicitó la determinación de la concentración mínima inhibidora (CMI) a una serie de cepas utilizando su propia metodología. Los resultados mostraron que pocos laboratorios realizaban pruebas de sensibilidad antifúngica y que la metodología empleada (medio de cultivo, inóculo, etc.) era muy variada. Los resultados de las CMI también fueron impactantes: en algunos casos, las diferencias entre los distintos laboratorios fueron de 512 veces.

Como consecuencia de esta realidad el NCCLS creó un subcomité para el estudio y estandarización de las pruebas de sensibilidad a los antifúngicos en las levaduras del género *Candida* y en *Cryptococcus neoformans*, que dio lugar a la publicación, en 1992, de la propuesta de un método (M27-P). En 1995 se publicó el método provisional (M27-T) y, en 1997, se aprobó definitivamente el método conocido como M27-A.

Como complemento del método de sensibilidad para levaduras, en 1998 el NCCLS publicó su propuesta metodológica para el estudio de sensibilidad antifúngica en hongos filamentosos, el método M38-P.

A pesar de todo, las pruebas de sensibilidad a los antifúngicos no están tan desarrolladas como las de los antibacterianos. Los puntos de corte y los criterios de sensibilidad y resistencia de las levaduras para los antifúngicos fluconazol, itraconazol y 5-fluorocitosina sólo están determinados para las micosis orofaríngeas de enfermos con sida. En el

caso de candidemias sólo están determinados para fluconazol. Por lo tanto, estos datos pueden variar en el futuro y hay que prestar atención a las nuevas normas que vayan publicando los comités de estandarización de ensayos *in vitro*, tanto europeos (EUCAST) como americanos (NCCLS).

En este Capítulo se describen con detalle los métodos de referencia M27-A, para levaduras, y M38-P, para hongos filamentosos, propuestos por el NCCLS [1,2]. Básicamente, consisten en cuantificar la inhibición de crecimiento producida por el antifúngico comparada con el crecimiento de la levadura o moho en el mismo medio pero sin antifúngico (control). Teniendo en cuenta que el medio de cultivo, pH, tampón, inóculo, tiempo y temperatura de incubación deben ajustarse estrictamente a lo recomendado en dichos documentos puesto que cualquier variación en estos parámetros puede afectar los resultados.

15.2. Método de microdilución para levaduras (M27-A)

15.2.1. Medio de cultivo

El medio de cultivo que ha dado mejor concordancia, tanto intra como interlaboratorio, es el medio sintético RPMI 1640 con glutamina y sin bicarbonato sódico (Gibco, ICN, Oxoid, Sigma), tamponado con ácido morfolino propano sulfónico (MOPS) 0,164 M (ICN, Sigma) y ajustado a pH 7±0,1.

Componentes:

- RPMI 1640 10,40 g
- Tampón MOPS 34,53 g
- Agua destilada 1.000 ml

Preparación:

1. Disolver en 900 mililitros de agua destilada las cantidades indicadas, agitando hasta su completa disolución.
2. Ajustar el pH a 6,9 - 7,1, utilizando NaOH 1N ó 10N (medir la cantidad utilizada).
3. Añadir agua destilada hasta completar 1 litro.

4. Filtrar estérilmente.
5. Mantener refrigerado hasta su uso (4-8 °C, máximo 6 meses).

15.2.2. Preparación de la solución madre de antifúngico

Un consejo...

Aunque no sea ortodoxo, en caso de no disponer de sustancia valorada se puede utilizar el preparado comercial para infusión endovenosa, comprobando que las CMI para las cepas control estén dentro del intervalo recomendado.

Preferiblemente debe utilizarse sustancia valorada que se puede solicitar a los laboratorios productores.

Antifúngicos solubles en agua (fluconazol, 5-fluorocitosina)

1. Preparar una solución, pesando la cantidad suficiente de polvo para obtener una concentración

Un consejo...

El tiempo de estabilidad indicado es orientativo ya que depende del tipo de antifúngico. Una vez descongelado no debe volverse a congelar. Las placas de antifúngico preparadas tendrán la misma fecha de caducidad que la de la solución madre.

al menos 100 veces superior a la concentración más alta de antifúngico a ensayar y disolverla en agua destilada estéril.

2. Repartir en alícuotas de 1,1 ml y congelar a -70 °C hasta su utilización (máximo 6 meses), o a -40 °C (máximo 2 meses).

Antifúngicos insolubles en agua (anfotericina B, itraconazol, ketoconazol, voriconazol)

1. Preparar una solución, pesando la cantidad sufi-

Unos consejos...

- Es importante seguir estas recomendaciones ya que concentraciones de antifúngico más elevadas no se disuelven bien.
- Normalmente la solución madre no necesita esterilizarse pero si, para mayor seguridad, se quiere esterilizar, debe hacerse por filtración (mediante filtros de membrana o cualquier otro material que no absorba o retenga el antifúngico).

ciente de polvo para obtener una concentración de 1.600 µg/ml (100 veces superior a la concentración más alta de antifúngico a ensayar) y disolverla en dimetil sulfóxido (DMSO).

2. Repartir en alícuotas de 1,1 ml y congelar a -70 °C hasta su utilización (máximo 6 meses), o a -40 °C (máximo 2 meses).

15.2.3. Preparación de las diluciones de antifúngico

Se recomienda seguir el método de las diluciones dobles seriadas aditivas. Los pasos a seguir son diferentes según el antifúngico sea soluble o insoluble en agua.

Antifúngicos solubles en agua (fluconazol, 5-fluorocitosina)

Seguir las indicaciones de la [Tabla 15.1](#) y las [Figuras 15.1 y 15.2](#). Las concentraciones a ensayar son las comprendidas entre 64 y 0,12 µg/ml. Los volúmenes indicados son suficientes para preparar 5 placas de antifúngico.

Brevemente:

1. A partir de la solución madre se prepara la serie de diluciones a una concentración 10 veces superior a la concentración final deseada, utilizando como diluyente RPMI 1640.
2. Seguidamente se realiza una dilución 1/5 añadiendo a todos los tubos 4 ml de RPMI, con lo que la concentración del antifúngico en los tubos

Tabla 15.1. Diluciones de los antifúngicos solubles en agua.

Tubo	Concentración	Transferir	A un tubo con	Concentración resultante	Tubo
nº 1	1280 µg/ml	1 ml	1 ml de RPMI	640 µg/ml	nº 2
nº 2	640 µg/ml	0,5 ml	0,5 ml de RPMI	320 µg/ml	nº 3
nº 2	640 µg/ml	0,5 ml	1,5 ml de RPMI	160 µg/ml	nº 4
nº 4	160 µg/ml	0,5 ml	0,5 ml de RPMI	80 µg/ml	nº 5
nº 4	160 µg/ml	0,25 ml	0,75 ml de RPMI	40 µg/ml	nº 6
nº 4	160 µg/ml	0,25 ml	1,75 ml de RPMI	20 µg/ml	nº 7
nº 7	20 µg/ml	0,5 ml	0,5 ml de RPMI	10 µg/ml	nº 8
nº 7	20 µg/ml	0,25 ml	0,75 ml de RPMI	5 µg/ml	nº 9
nº 7	20 µg/ml	0,25 ml	1,75 ml de RPMI	2,5 µg/ml	nº 10
nº 10	2,5 µg/ml	1 ml	1 ml de RPMI	1,25 µg/ml	nº 11

Observar que...

- Al terminar las diluciones todos los tubos contienen 1 ml, excepto el tubo nº 11 (2 ml). De este último se desechará 1 ml.
- En los tubos nº 2 al nº 11 la concentración del antifúngico es 10 veces superior a la concentración final deseada.

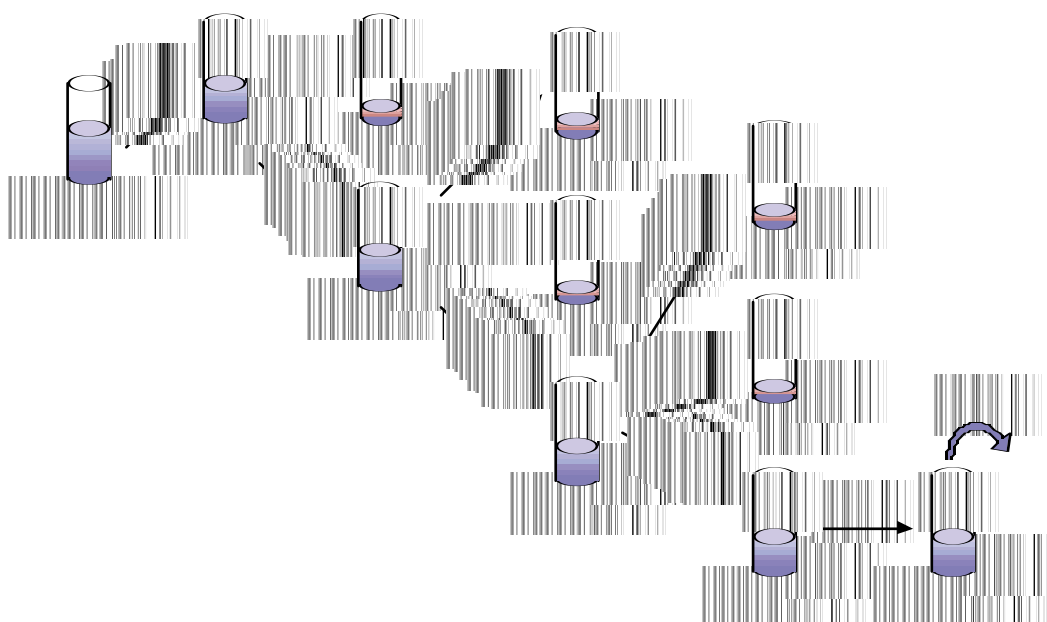


Figura 15.1. Esquema para las diluciones de antifúngicos solubles en agua. Diluyente RPMI 1640.

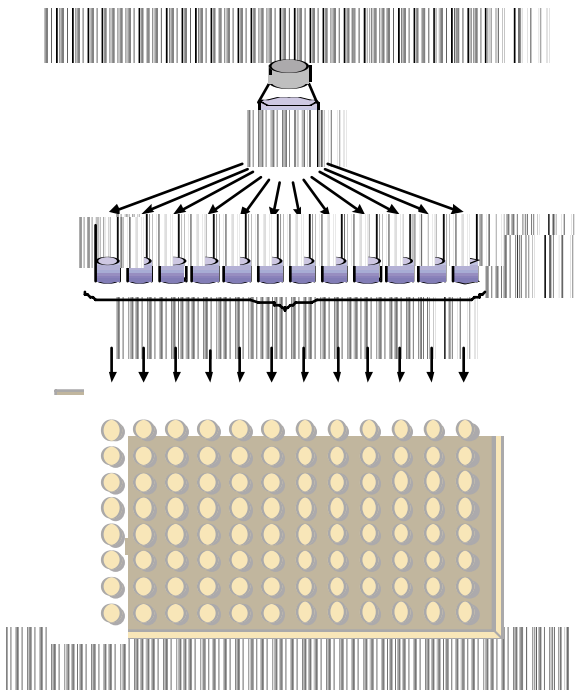


Figura 15.2. Segundo paso de las diluciones de antifúngicos solubles en agua (método de microdilución).

- es 2 veces mayor que la concentración final deseada (de 128 µg/ml a 0,25 µg/ml).
- El contenido de cada tubo se vierte en una cubeta o en una placa de Petri estéril y con ayuda de una pipeta multicanal (8 canales) se procede al llenado de las placas de microtiter estériles de 96 pocillos, vertiendo en cada pocillo 100 µl de la concentración correspondiente.

Antifúngicos insolubles en agua (anfotericina B, itraconazol, ketoconazol, voriconazol)

Los pasos a seguir se detallan en la [Tabla 15.2](#) y en las [Figuras 15.3 y 15.4](#). Las concentraciones a ensayar son las comprendidas entre 16 y 0,03 µg/ml. Los volúmenes indicados son suficientes para preparar 5 placas de antifúngico.

Brevemente:

- A partir de la solución madre se prepara la serie de diluciones a una concentración 100 veces superior a la concentración final deseada, utilizando como diluyente DMSO.
- Seguidamente se realiza una dilución 1/50 tomando 100 µl de cada tubo y se transfieren a otro tubo que contiene 4,9 ml de RPMI, con lo que la concentración de antifúngico es dos veces mayor que la concentración final deseada (32 µg/ml - 0,06 µg/ml) y la de DMSO, 2% ([Figura 15.4](#)).

15.2.4. Llenado de las placas

Las placas de microtiter se rellenan con 100 µl de solución de antifúngico siguiendo los siguientes pasos ([Figuras 15.2 y 15.4](#)):

Tabla 15.2. Diluciones de los antifúngicos insolubles en agua.					
Tubo	Concentración	Transferir	A un tubo con	Concentración resultante	Tubo
nº 2	1600 µg/ml	0,5 ml	0,5 ml de DMSO	800 µg/ml	nº 3
nº 2	1600 µg/ml	0,25 ml	0,75 ml de DMSO	400 µg/ml	nº 4
nº 2	1600 µg/ml	0,25 ml	1,75 ml de DMSO	200 µg/ml	nº 5
nº 5	200 µg/ml	0,5 ml	0,5 ml de DMSO	100 µg/ml	nº 6
nº 5	200 µg/ml	0,25 ml	0,75 ml de DMSO	50 µg/ml	nº 7
nº 5	200 µg/ml	0,25 ml	1,75 ml de DMSO	25 µg/ml	nº 8
nº 8	25 µg/ml	0,5 ml	0,5 ml de DMSO	12,5 µg/ml	nº 9
nº 8	25 µg/ml	0,25 ml	0,75 ml de DMSO	6,25 µg/ml	nº 10
nº 8	25 µg/ml	0,25 ml	1,75 ml de DMSO	3,12 µg/ml	nº 11

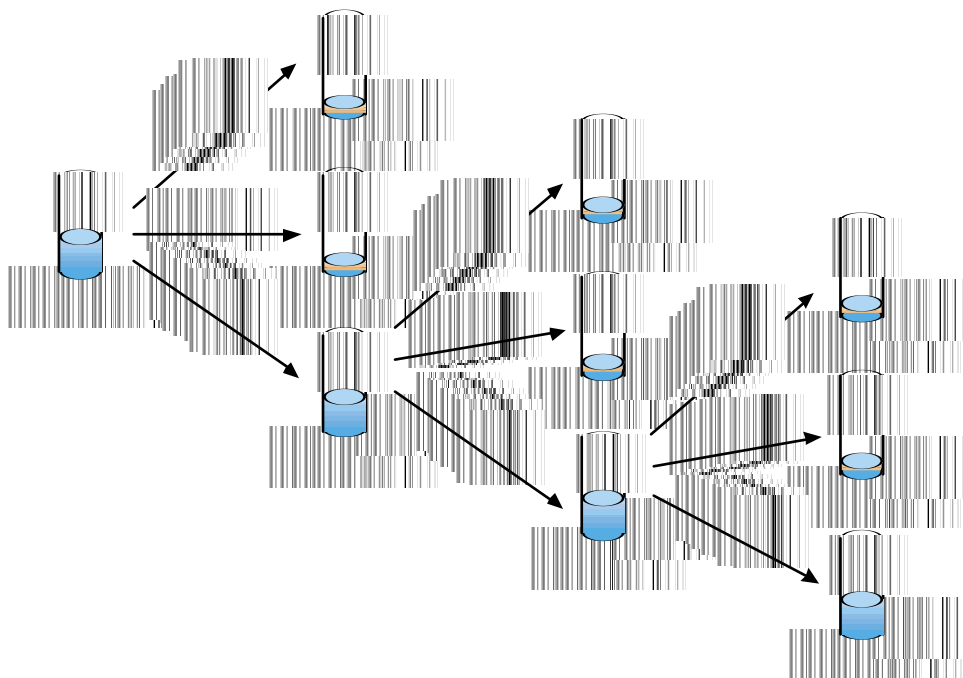


Figura 15.3. Esquema para las diluciones de antifúngicos insolubles en agua. Diluyente dimetil sulfóxido (DMSO).

- El contenido del tubo nº 2 se vierte en una cubeta o en una placa de Petri estéril y con ayuda de una pipeta multicanal (8 canales) se toman 100 µl y se llenan los pocillos de la columna nº 2 (2A - 2H).
- Con el contenido del tubo nº 3 se llenan los pocillos de la columna nº 3 (3A - 3H).
- Con el contenido del tubo nº 4 se llenan los pocillos de la columna nº 4 (4A - 4H).
- Etc.... y así hasta la columna nº 11.
- Los pocillos de la columna nº 12 se llenan con

Observar que...

- Al terminar las diluciones, todos los tubos contienen 1 ml excepto el nº11 que contiene 2 ml.
- En los tubos nº 2 al nº 11 la concentración del antifúngico es 100 veces superior a la concentración final deseada.
- Los tubos nº 2 al nº 11 están diluidos en DMSO.

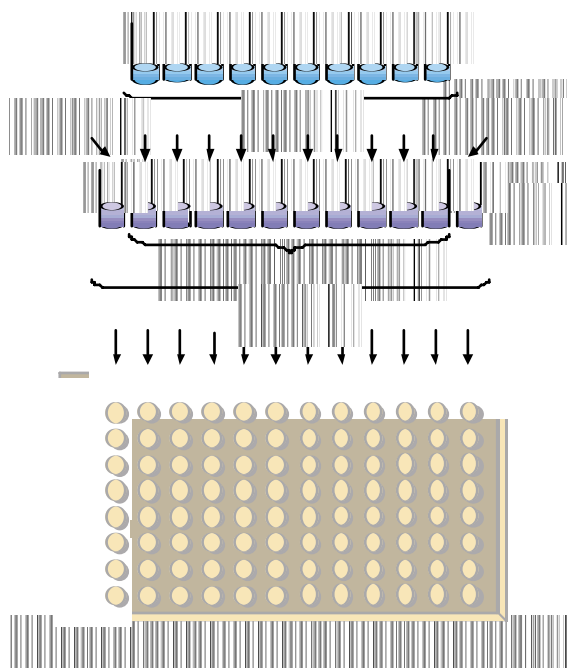


Figura 15.4. Segundo paso de las diluciones de antifúngicos insolubles en agua (método de microdilución). Diluyente RPMI 1640.

¡Atención!

La fecha de caducidad de las placas será la de la solución madre y no la del día de preparación de las placas.

100 µl de RPMI (control de crecimiento).

ATENCIÓN: cuando se trata de antifúngicos insolubles en agua, la columna nº 12 se rellena con 100 µl de RPMI con un 2% de DMSO, o el disolvente que se haya utilizado.

- Los pocillos de la columna nº 1 se llenan con 200 µl de RPMI (control de esterilidad).
- Una vez llenas las placas se cierran y envuelven convenientemente con una bolsa de plástico o con papel de estaño, para evitar la evaporación, y se congelan a -70°C , o bien a -40°C .

15.2.5. Preparación del inóculo

Si la levadura ha estado almacenada o congelada antes de realizar las pruebas de sensibilidad, conviene hacer por lo menos dos pases en medio de agar glucosado de Sabouraud (SDA).

Inóculo para *Candida* spp.

Se prepara tocando con el asa de cultivo 5 colonias 1 mm y de 24 h de crecimiento en placa de SDA que se resuspenden en un tubo de solución salina (CINa 0,85%). Se agita bien y, con ayuda de un espectrofotómetro (longitud de onda: 530 nm), se ajusta a una densidad óptica 0,5 McFarland, añadiendo la cantidad necesaria de solución salina. Esta solución tiene una concentración aproximada de 1×10^5 - 5×10^6 UFC/ml. Posteriormente se realiza una dilución 1:1000 con medio RPMI (concentración de 1×10^3 - 5×10^3). Esta última dilución es la que se utiliza para inocular las placas de antifúngico. La concentración final de levaduras en las placas será de $0,5 \times 10^3$ - $2,5 \times 10^3$. En la Figura 15.5 se representan esquemáticamente todos estos pasos.

Inóculo para *C. neoformans*

Se prepara igual que para *Candida* spp., pero partiendo, en este caso, de un cultivo de 48 h en SDA.

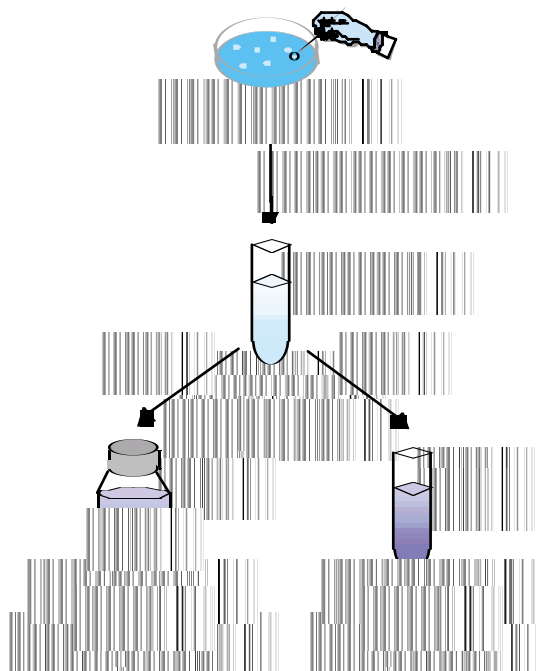


Figura 15.5. Preparación del inóculo de levaduras.

El día del ensayo se sacan las placas del congelador y se dejan a temperatura ambiente hasta su completa descongelación.

Se inoculan con 100 µl de la suspensión de levadura desde el pocillo 2 hasta el 12.

La columna nº 1 (1A - 1H) que contiene 200 µl de RPMI, se utiliza para el control de esterilidad del medio. También sirve para leer la absorbancia del medio.

La columna nº 12 (12A - 12H) no contiene antifúngico pero debe tener la misma concentración de disolvente que los pocillos con antifúngico. Es el control de crecimiento.

15.2.6. Inoculación de las placas

15.2.7. Control de pureza del cultivo

Observar que...

- Al inocular las placas, las concentraciones de los pocillos se diluyen 1/2. En consecuencia, la concentración final de antifúngico en los pocillos será de 64 µg/ml a 0,12 µg/ml, en los solubles en agua, y de 16 µg/ml a 0,03 µg/ml en los insolubles.
- En una placa de antifúngico se pueden ensayar hasta 8 cepas diferentes.

Es conveniente hacer un control del inóculo utilizado; para ello se siembran 10 µl del pocillo control (nº 12) en una placa de CHROMagar y, a las 24 h, se cuentan las UFC. De esta forma se controla la pureza y densidad del cultivo y se comprueba la identificación de la cepa.

15.2.8. Incubación de las placas

Las placas se incuban a 35 °C. Las inoculadas con especies del género *Candida* durante 48 h y las inoculadas con *C. neoformans* durante 72 h.

Unos consejos...

- En general, para los **antifúngicos fungiestáticos**, la CMI debe ser la concentración más baja de antifúngico que produce una reducción aparente del crecimiento de la levadura (50%), comparada con el crecimiento control.
- Para los **antifúngicos fungicidas**, la CMI es la concentración más baja de antifúngico que inhibe el crecimiento de la levadura, o lo que es lo mismo, que produce una reducción del 100% del crecimiento.

15.2.9. Lectura e interpretación de los resultados

Lectura visual

La lectura visual debe realizarse con ayuda de un espejo invertido.

Azoles y 5-fluorocitosina: la CMI es la concentración más baja de antifúngico que produce una reducción aparente del crecimiento de la levadura (50%), comparada con el crecimiento control.

Anfotericina B: la CMI es la concentración más baja de antifúngico que inhibe el crecimiento de la levadura, o lo que es lo mismo, que produce una reducción del 100% del crecimiento.

Lectura espectrofotométrica

Aunque no es la recomendada por el NCCLS, puede hacerse una lectura espectrofotométrica

Observaciones...

- La lectura de las CMI en los azoles suele ser una de las fuentes de variabilidad tanto intra como interlaboratorio. Es un poco complicada para los no entrenados ya que se mantiene un cierto crecimiento en las concentraciones superiores a la CMI. A este crecimiento se le llama "cola de crecimiento" (*trailing effect*) y se presenta sobre todo en las cepas de *C. albicans* y *C. tropicalis*.
- Algunas veces es conveniente agitar los pocillos con un bastoncillo de madera estéril, para poder comparar la turbidez con la del pocillo control.

trica a 405 nm (longitud de onda de máxima absorbancia del medio), también puede leerse a 490 y 530 nm ya que, prácticamente, la CMI no varía [3,4].

Antes de realizar la lectura espectrofotométrica es conveniente agitar las placas para obtener una suspensión homogénea y, una vez realizada, se resta a todos los pocillos la absorbancia del medio, es decir la absorbancia del pocillo de la columna nº 1.

La CMI para los azoles, 5-fluorocitosina y, en general, los **antifúngicos fungiestáticos**, es la concentración más baja de antifúngico cuya densidad óptica es 50% del pocillo control de crecimiento (pocillo de la columna nº 12). La CMI para la anfotericina B y, en general, otros **antifúngicos fungicidas**, es la concentración más baja cuya densidad óptica es 5% del control.

15.2.10. Cepas control de calidad

En cada ensayo debe incluirse una cepa control para poder detectar cualquier anomalía o desactivación del antifúngico. El NCCLS aconseja utilizar las siguientes cepas:

C. parapsilosis ATCC 22019
C. krusei ATCC 6258

Son cepas que han mostrado tener estabilidad genética y para las que la CMI se ha determinado repetidamente. En la [Tabla 15.3](#) se especifica las CMI de los antifúngicos para estas cepas [5].

15.2.11. Puntos de corte para *Candida* spp.

Por el momento, sólo se dispone de los puntos de corte de fluconazol, itraconazol y 5-fluorocitosina. Para establecer los puntos de corte de fluconazol, el NCCLS se ha basado en estudios de correlación *in vitro-in vivo* de micosis orofaríngeas

Tabla 15.3. Intervalo de la CMI de los antifúngicos para las cepas control de calidad, obtenidas por el método de microdilución M27-A [5].

Antifúngico	Intervalos de las CMI (µg/ml)			
	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019		<i>C. krusei</i> ATCC 6258	
	24 h	48 h	24 h	48 h
Anfotericina B	0,25 - 2	0,5 - 4	0,5 - 2	1 - 4
Caspofungina	0,25 - 1	0,5 - 4	0,12 - 1	0,25 - 1
Fluconazol	0,5 - 4	1 - 4	8 - 64	16 - 128
Itraconazol	0,12 - 0,5	0,12 - 0,5	0,12 - 1	0,25 - 1
Ketoconazol	0,03 - 0,25	0,06 - 0,5	0,12 - 1	0,25 - 1
Posaconazol	0,06 - 0,25	0,06 - 0,25	0,06 - 0,5	0,12 - 1
Ravuconazol	0,016 - 0,12	0,03 - 0,25	0,06 - 0,5	0,25 - 1
Voriconazol	0,016 - 0,12	0,03 - 0,25	0,06 - 0,5	0,12 - 1
5-fluorocitosina	0,06 - 0,25	0,12 - 0,5	4 - 16	8,0 - 32

en pacientes con sida y, en menor cantidad, en candidemias producidas por *Candida* en enfermos no neutropénicos [6]. Por tanto, sólo son aplicables a las micosis orofaríngeas y candidemias de especies del género *Candida*, excepto *C. krusei*, que es intrínsecamente resistente a fluconazol. Para itraconazol, los datos se basan en estudios de correlación *in vitro-in vivo* de micosis orofaríngeas y no se dispone hasta la fecha de datos en micosis invasoras. Los puntos de corte de 5-fluorocitosina están basados en antiguos datos farmacocinéticos *in vivo* para *Candida*.

Aplicando estos criterios, el NCCLS ha establecido diferentes categorías de sensibilidad: sensible, intermedio, resistente y una nueva categoría aplicable a los azoles: sensible dependiendo de la dosis administrada (S-DD) [1,6].

- La categoría de **sensible** no lleva implícito el éxito terapéutico.
- La categoría de **resistente** se correlaciona con fracaso terapéutico.
- La categoría **S-DD** para el fluconazol se basa en los niveles de antifúngico que se alcanzan con dosis 400 mg/día en pacientes con buen funcionamiento renal. Para el itraconazol se basan en una buena absorción del fármaco y que se alcancen niveles en sangre 0,5 µg/ml.

En la categoría de intermedio, sólo aplicable a 5FC, no se sabe con certeza si la cepa es sensible, ya que los datos que se tienen no permiten categorizarla como sensible o resistente.

En la [Tabla 15.4](#) se indican los puntos de corte de los antifúngicos.

Tabla 15.4. Puntos de corte según NCCLS [1].

Antifúngico	Intervalos de las CMI (µg/ml)			
	Sensible	S-DD	Intermedio	Resistente
Fluconazol	8	16 - 32	—	64
Itraconazol	0,12	0,25 - 0,5	—	1
5-fluorocitosina	4	—	8 - 16	32

15.3. Método de macrodilución para levaduras (M27-A)

En este método se utilizan tubos estériles de 11x70 mm y el volumen final en cada tubo es de 1 ml. El medio de cultivo, la preparación del mismo y de la solución madre de antifúngico es igual al método de microdilución.

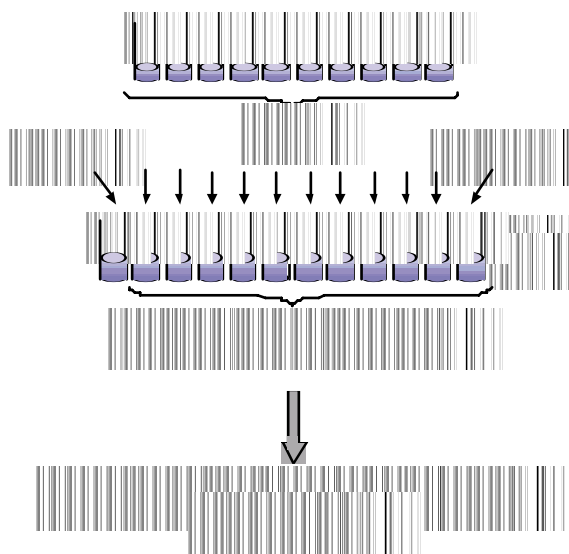


Figura 15.6. Segundo paso de las diluciones de antifúngicos solubles en agua (método de macrodilución).

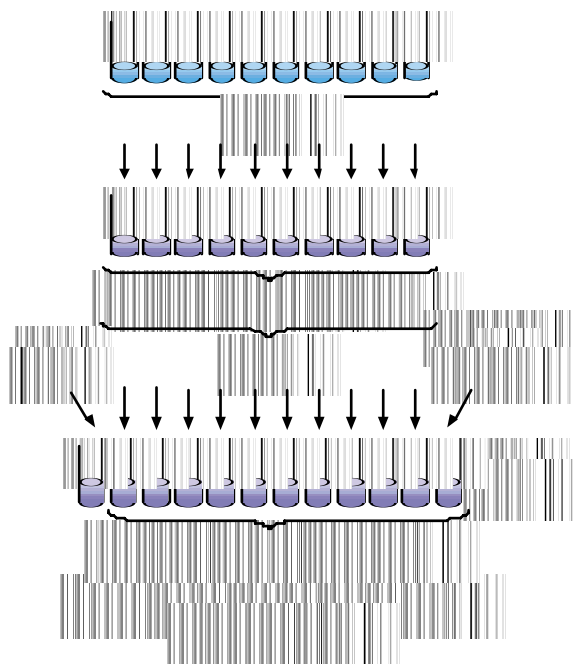


Figura 15.7. Segundo paso de las diluciones de antifúngicos insolubles en agua (método de macrodilución).

15.3.1. Preparación de las diluciones de antifúngico

Antifúngicos solubles en agua

1. Preparar las diluciones del antifúngico siguiendo los pasos de la [Figura 15.1](#).
2. Las diluciones se reparten en alícuotas de 0,1 ml, en tubos de 11x70 y se congelan a -70°C hasta su utilización completamente cerrados.
3. El día del ensayo se descongelan los tubos y se diluyen 1/10 añadiendo a cada tubo 0,9 ml de RPMI inoculado ([Figura 15.6](#)).

Antifúngicos insolubles en agua

1. Preparar las diluciones del antifúngico siguiendo los pasos de la [Figura 15.3](#).
2. Diluir 1/10 en RPMI.
3. Se reparten en alícuotas de 0,1 ml en tubos de 11x70 y se congelan a -70°C , completamente cerrados, hasta su utilización.
4. El día del ensayo se descongelan los tubos y se diluyen 1/10 añadiendo a cada tubo 0,9 ml de RPMI inoculado ([Figura 15.7](#)).

15.3.2. Preparación del inóculo

Se siguen las mismas recomendaciones que para el método de microdilución. A partir de la suspensión ajustada a la escala 0,5 de McFarland se diluye 1/2000 en medio RPMI (concentración $0,5-2,5 \times 10^3$ UFC/ml) ([Figura 15.5](#)).

15.3.3. Temperatura y tiempo de incubación

Tabla 15.5. Intervalo de la CMI de los antifúngicos para las cepas control de calidad, obtenidas por el método de macrodilución M27-A [7,8].

Antifúngico	Intervalos de las CMI ($\mu\text{g/ml}$)	
	<i>C. parapsilosis</i> ATCC22019	<i>C. krusei</i> ATCC6258
Anfotericina B	0,25 - 1	0,5 - 2
Fluconazol	2 - 8	16 - 64
Itraconazol	0,06 - 0,25	0,12 - 0,5
Ketoconazol	0,06 - 0,25	0,12 - 0,5
5-fluorocitosina	0,12 - 0,5	4 - 16

Tabla 15.6. Resumen del método M27-A.

Medio de cultivo	RPMI 1640, con glutamina, sin bicarbonato sódico y con un indicador de pH
pH	6,9 - 7,1
Tampón	Ácido mofolino propano sulfónico (MOPS) a una concentración 0,164 moles/litro
Inóculo	Entre $0,5 \times 10^3$ y $2,5 \times 10^3$ UFC/ml
Incubación	<i>Candida</i> spp., 48 h a 35 °C <i>C. neoformans</i> , 72 h a 35 °C
Concentraciones a ensayar	Fluconazol y 5-fluorocitosina: 64-0,06 µg/ml Anfotericina B, itraconazol, ketoconazol: 16-0,03 µg/ml
Definición de la CMI	Anfotericina B: la CMI es la concentración más baja que produce una inhibición del crecimiento de 100% Azoles y 5-fluorocitosina: la CMI es la concentración más baja que produce una inhibición del crecimiento 50% (por microdilución)
Puntos de corte	Fluconazol: S 8 µg/ml; S-DD 16-32 µg/ml; R 64 µg/ml Itraconazol: S 0,12 µg/ml; S-DD 0,25-0,5 µg/ml; R 1 µg/ml 5-fluorocitosina: S 4 µg/ml; I 8-16 µg/ml; R 32 µg/ml
Cepas control	<i>C. krusei</i> ATCC 6258 y <i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019

Utilidad de la macrodilución

- El método de macrodilución se utiliza muy poco, pero a veces puede ser útil cuando se requiere un resultado rápido y no se dispone de medios comerciales o placas preparadas.
- También es útil en aquellas cepas de *C. albicans* en las que se duda en establecer la CMI por el método de microdilución, debido al crecimiento en las concentraciones superiores a la CMI (*trailing effect*).

para hongos filamentosos (M38-P)

Igual que para el método de microdilución.

15.3.4. Lectura de los resultados

La lectura se hace visualmente a las 48 h de incubación comparando la turbidez de los tubos con la del control diluido 1/20 (0,2 ml del tubo control más 0,8 ml de RPMI). La CMI de los azoles y 5-fluorocitosina es la concentración de antifúngico más baja que produce una inhibición del crecimiento del 80%. La CMI de la anfotericina B es la concentración de antifúngico más baja que produce una inhibición del crecimiento del 100%. En la [Tabla 15.5](#) se resume las CMI de las cepas control de calidad para este método [7,8].

En la [Tabla 15.6](#) se resume el método M27-A.

En 1998 el NCCLS publicó el documento M38-P donde se describe un método provisional para la realización de pruebas de sensibilidad antifúngica a los hongos filamentosos formadores de conidias. Hasta el momento se ha evaluado en especies de los géneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Rhizopus*, así como en *Pseudallescheria boydii* y en las formas micelares de *Sporothrix schenckii*. No se ha utilizado en formas levaduriformes de los hongos dimórficos tales como *Blastomyces dermatitidis* o *Histoplasma capsulatum*.

Las características del medio de cultivo, pH, preparación de la solución madre de antifúngico y diluciones son iguales a las del método M27-A ([Figuras 15.1 – 15.4](#)).

15.4. Método de microdilución

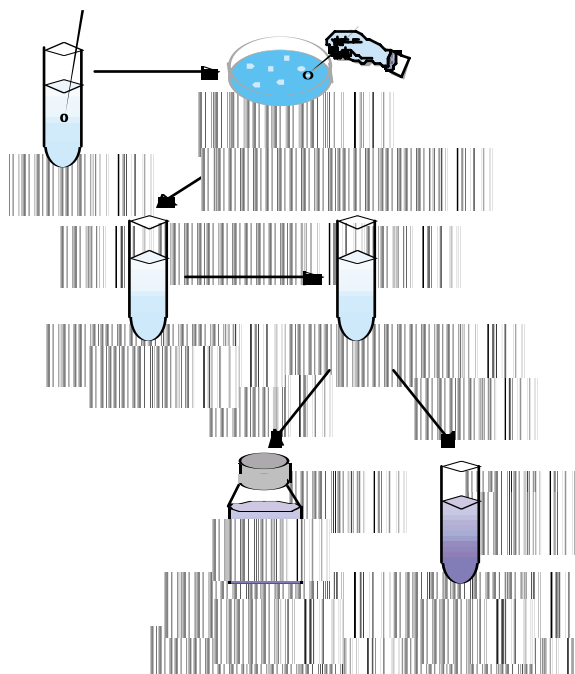


Figura 15.8. Preparación del inóculo para hongos filamentosos.

15.4.1. Preparación del inóculo

En el género *Aspergillus* y en las especies *P. boydii*, *R. arrhizus* y *S. schenckii* el inóculo se prepara a partir de un cultivo de 7 días de crecimiento a 35 °C en agar glucosado de patata (PDA), medio que induce la formación de conidias o esporangiosporas.

Para las especies del género *Fusarium* se parte de un cultivo de 48 a 72 h a 35 °C y posteriormente a 25-28 °C hasta completar siete días, en PDA (Figura 15.8).

1. Para facilitar la recogida de conidias, introducir el asa de cultivo en Tween 20 y pasarla por encima de las conidias; después resuspender en solución salina.
2. Dejar sedimentar las partículas durante 3-5 min, transferir el sobrenadante a otro tubo y agitar vigorosamente durante 15 segundos.
3. Debido a que el tamaño de las conidias es distinto para cada especie, la densidad óptica (DO) para obtener una concentración de $1-5 \times 10^6$ variará con la especie. Para *Aspergillus* spp. y *S. schenckii* se ajusta a una DO de 0,09-0,17 (80-82% transmitancia); 0,41-0,56 McFarland. Para *Fusarium*, *P. boydii* y *R. arrhizus* a 0,15-0,17 (68-70% de transmitancia); 0,68-0,77 McFarland. No obstante, es aconsejable confirmar las UFC/ml de estas DO en cada espectrofotómetro particular (Tabla 15.7).

Tabla 15.7. Intervalos de DO y de UFC/ml para los hongos filamentosos [9].

	Intervalo de DO	Intervalo UFC/ml
<i>A. flavus</i>	0,09 - 0,11	0,4 - $4,0 \times 10^6$
<i>A. fumigatus</i>	0,09 - 0,11	0,6 - $5,0 \times 10^6$
<i>F. oxysporum</i>	0,15 - 0,17	0,8 - $5,0 \times 10^6$
<i>F. solani</i>	0,15 - 0,17	0,5 - $5,9 \times 10^6$
<i>P. boydii</i>	0,15 - 0,17	0,4 - $3,2 \times 10^6$
<i>R. arrhizus</i>	0,15 - 0,17	0,4 - $2,6 \times 10^6$

4. Diluir 1/50 en RPMI 1640. Es posible que *P. boydii* requiera una dilución menor.

En cada ensayo debe controlarse el inóculo, para ello se siembran 100 µl de una dilución 1/100 del inóculo en SDA y se incuba a 28-30 °C hasta que se observa la presencia de colonias (24-26 h para *Rhizopus* spp., 40-50 h para la mayoría de los hongos y >5 días para *P. boydii*). En la Tabla 15.7 se especifican las UFC obtenidas para diferentes hongos filamentosos [9].

15.4.2. Inoculación de las placas

Cada pocillo se inocula con 100 µl de la suspensión de conidias o esporangiosporas. En este paso, tanto la concentración de antifúngico como el inóculo se diluyen. El pocillo control de crecimiento debe tener la misma concentración final (1%) del diluyente del antifúngico.

15.4.3. Incubación

Las placas se incuban a 35 °C sin agitación hasta que se observa crecimiento en el pocillo control. Dependiendo de la especie el tiempo de incubación varía; así, para *Rhizopus* spp. el tiempo de incubación oscila entre 21-26 h. Sin embargo, las especies de los géneros *Aspergillus* y *Fusarium*, así como *S. schenckii* se incuban durante 46-50 h y *P. boydii*, durante 70-74 h.

15.4.4. Lectura de los resultados

La CMI de los azoles y 5-fluorocitosina es la concentración más baja que produce una reducción importante del crecimiento (50%) con respecto al

crecimiento del pocillo control.

La CMI de anfotericina B es la concentración más baja que produce una inhibición total del crecimiento (100%).

14.4.5. Interpretación de los resultados

Para los hongos filamentosos el NCCLS, hasta la fecha, no ha indicado puntos de corte.

Anfotericina B. Por los datos que se tienen, las CMI de anfotericina B suelen estar comprendidas entre 0,5 y 2 µg/ml, aunque para algunas especies como *A. terreus*, *Acremonium strictum*, *S. apiospermum* y *S. prolificans* la CMI de anfotericina B puede estar comprendida entre 2 y >16 µg/ml.

5-fluorocitosina. En general, los hongos filamentosos no son sensibles a este antifúngico; la mayoría de las CMI son >64 µg/ml, con la excepción de algunas cepas de *Aspergillus* spp. y hongos dematiáceos.

Fluconazol. Los hongos filamentosos no son sensibles a este antifúngico, la mayoría de las CMI son >64 µg/ml, con la excepción de algunos hongos dimórficos y dermatofitos.

Ketoconazol. Las CMI suelen estar comprendidas entre 0,03 y 16 µg/ml.

Itraconazol. Las CMI de este antifúngico suelen estar comprendidas entre 0,03 y 16 µg/ml. La mayor fuente de error en la determinación de la CMI a itraconazol suele proceder del disolvente utilizado y concentración final del mismo. El NCCLS recomienda no variar el esquema de diluciones propuesto (utilizar DMSO, concentración de la solución madre 1600 µg/ml y concentración final de DMSO en los pocillos de la placa de microtiter 1%).

15.5. Método de macrodilución para hongos filamentosos (M38-P)

Se utilizan tubos estériles de 11x70 mm. Volumen final: 1 ml. El medio de cultivo y preparación del mismo, la solución madre y diluciones del antifúngico igual al método de microdilución (Tabla 15.8).

15.5.1. Preparación del inóculo

Se siguen las mismas recomendaciones que para el método de microdilución (Figura 15.8). A partir de la suspensión ajustada a la escala 0,5 de MacFarland se diluye 1/100 en medio RPMI (concentración 0,4-5x10⁴ UFC/ml).

15.5.2. Temperatura y tiempo de incubación

Igual que para el método de microdilución.

15.5.3. Lectura de los resultados

La lectura se hace visualmente a las 48 h de incubación comparando la turbidez de los tubos con la del control. La CMI de los azoles y 5-fluorocitosina es la concentración de antifúngico más baja que produce una inhibición aparente del crecimiento (50%). La CMI de la anfotericina B es la concentración de antifúngico más baja que produce una inhibición total del crecimiento (100%).

El NCCLS utiliza una puntuación de 1 a 4 para medir la inhibición del crecimiento: 4 (no inhibición), 3 (ligera inhibición ² 25%), 2 (inhibición aparente del crecimiento ² 50%), 1 (ligera turbidez del medio, ² 75% inhibición) y 0 (inhibición del 100%). La CMI de los azoles y 5-fluorocitosina corresponde a la puntuación 2, y la de anfotericina B a la puntuación 0.

Tabla 15.8. Resumen del método M38-P.

Medio de cultivo	RPMI 1640, con glutamina, sin bicarbonato sódico y con un indicador de pH
pH	6,9 - 7,1
Tampón	Ácido mofolino propano sulfónico (MOPS) a una concentración 0,164 moles/litro
Inóculo	Entre $0,4 \times 10^4$ y 5×10^4 UFC/ml
Incubación	<i>Rhizopus</i> spp., de 21 - 26 h a 35 °C <i>Aspergillus</i> spp. <i>Fusarium</i> spp y <i>S. schenckii</i> de 46 - 50 h a 35 °C <i>P. boydii</i> de 70 - 74 h a 35 °C
Concentraciones a ensayar	Anfotericina B, itraconazol, ketoconazol: 16-0,03 µg/ml
Definición de la CMI	Anfotericina B: la CMI es la concentración más baja que produce una inhibición del crecimiento de 100% Azoles: la CMI es la concentración más baja que produce una inhibición del crecimiento 50%
Puntos de corte	No están determinados
Cepas control	No están definidas

¿Cuándo deben realizarse las pruebas de sensibilidad?

1. En las micosis invasoras, en las que conviene conocer si la cepa es resistente al antifúngico puesto que se correlaciona con fracaso terapéutico. Lo contrario no siempre se cumple.
2. En las micosis orofaríngeas que no responden al tratamiento.
3. Cuando se quiere conocer la prevalencia de cepas resistentes en la institución.
4. En las micosis producidas por patógenos emergentes.

15.6. Cepas de referencia

de calidad, pero es aconsejable el uso de las mismas cepas de referencia que para las levaduras: ATCC 22019 y ATCC 6258.

Referencias

El NCCLS no ha sugerido

1. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard M27-A. Villanova, National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1997.
2. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of conidium-forming filamentous fungi. Proposed standard M38-P. Villanova, National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1998.
3. Pfaller MA, Messer SA, Coffman S, *et al.* Comparison of visual and spectrophotometric methods of MIC endpoints determinations using broth microdilution methods to test five antifungal agents including the new triazole DO870. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 1094-1097.
4. Lozano-Chiu M, Arkan S, Paetznick VL, Anaissie EJ, Rex JH. Optimizing voriconazole susceptibility testing of *Candida*: effects of incubation time, endpoint rule, species of *Candida*, and level of fluconazole susceptibility. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 2755-2759.
5. Barry AL, Pfaller MA, Brown SD, *et al.* Quality control limits for broth microdilution susceptibility tests of ten antifungal agents. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 3457-3459.
6. Rex JH, Pfaller MA, Galgiani JN, *et al.* Development of interpretive breakpoints for antifungal susceptibility testing: conceptual framework and analysis of in vitro-in vivo correlation data for fluconazole, itraconazole, and *Candida* infections. *Clin Infect Dis* 1997; 24: 235-247.
7. Pfaller MA, Bale M, Buschelman B, *et al.* Quality control guidelines for National Committee for Clinical Laboratory Standards-recommended broth microdilution testing of amphotericin B, fluconazole, and flucytosine. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 1104-1107.
8. Rex JH, Pfaller MA, Lancaster M, Odds FC, Bolmström A, Rinaldi G. Quality control guidelines for National Committee for Clinical Laboratory Standards-recommended broth microdilution testing of ketoconazole and itraconazole. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 816-817.
9. Espinel-Ingroff A, Bartlett M, Bowden R, *et al.* Multicenter evaluation of proposed standardization procedure for antifungal susceptibility testing for filamentous fungi. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 139-143.

do, hasta la fecha, cepas de referencia ni de control

Estrella Martín-Mazuelos
Emilia Cantón Lacasa
Ana Espinel-Ingroff

16.1. Fundamento

A pesar de existir documentos que estandarizan los métodos de estudio de sensibilidad “*in vitro*” de los hongos a diferentes agentes antifúngicos, estos no subsanan del todo las necesidades de la rutina de los laboratorios de Microbiología clínica.

En lo que respecta a las levaduras (*Candida* spp. y *Cryptococcus neoformans*), el documento M27-A [1] se acepta como el método de referencia para los estudios de sensibilidad *in vitro* a diferentes antifúngicos, pero tiene una serie de limitaciones:

1. No es un método adecuado para detectar la resistencia a anfotericina B, por ello se debe seguir buscando un método que discrimine mejor estas resistencias.
2. El medio RPMI 1640 presenta problemas para el crecimiento de *C. neoformans* por lo que se ha propuesto el medio yeast nitrogen base (YNB) para la determinación de la CMI de los antifúngicos para esta levadura [1].

No obstante, el método M27-A sigue considerándose como el método de referencia pero no parece ser el más adecuado para todos los hongos ni para ser utilizado de rutina en los laboratorios de Microbiología clínica [2,3]. Por ello, se siguen evaluando métodos alternativos al M27-A; entre los comercializados, se dispone tanto de métodos colorimétricos como no colorimétricos.

16.2. Métodos colorimétricos

Son métodos basados en el M27-A. Incorporan un indicador redox en el medio de cultivo que cambia de color cuando existe crecimiento fúngico en el pocillo, facilitando la lectura visual del mismo.

16.2.1. Sensititre YeastOne®

(Trek Diagnostic Systems)

Es un método cuantitativo comercializado.

Fundamento

Se basa en el método de microdilución del documento M27-A del NCCLS al que se le ha adicionado un indicador de crecimiento de oxido-reducción (azul Alamar). Tiene la ventaja de ser la lectura más objetiva, ya que los pocillos con crecimiento son de color rosa, mientras que, cuando no hay crecimiento en su interior, los pocillos se mantienen azules. Sin embargo, con los azoles sigue habiendo problemas de lectura ya que, debido al efecto *trailing*, el cambio de color no es tan evidente y, en ocasiones, pasa de rosa (crecimiento) a púrpura (inhibición parcial del crecimiento) [2,3]. Según nuestra experiencia y la de otros autores, la correlación con el método de referencia (M27-A) oscila entre el 43 y el 100%, siendo mejor para anfotericina B que para los azoles o 5-fluorocitosina [2-4]. Este método no es útil para la detección de cepas resistentes a anfotericina B, probablemente por la utilización del medio RPMI 1640 [2]. Sin embargo, se considera un método que podría introducirse de rutina en el laboratorio de Microbiología clínica.

Material

Placas microtiter de 96 pocillos con el azul Alamar incorporado y concentraciones dobles seriadas de antifúngicos deshidratados: anfotericina B (0,008-16 µg/ml); fluconazol (0,125-256 µg/ml); itraconazol (0,008-16 µg/ml); ketoconazol (0,008-16 µg/ml); 5-fluorocitosina (0,03-64 µg/ml). El control de crecimiento está incluido en el primer pocillo de la primera fila (1 A). Sólo hay seis filas ocupadas de las ocho filas de la placa.

Medio de cultivo

RPMI 1640 con glutamina y sin bicarbonato cálcico y tamponado con MOPS (0,164 M) ajustado a pH 7±0,1 (el mismo que el método de referencia), pero suplementado con 1,5% de glucosa. Viene pre-

parado en tubos de tapón de rosca con 11 ml de medio.

Preparación del inóculo

Tocar con el asa de cultivo aproximadamente cinco colonias de 1mm en SDA, de 24 h de crecimiento para *Candida* spp. y de 48 h para *C. neoformans*. Resuspender las colonias en un tubo de agua destilada, agitar y ajustar con un espectrofotómetro (longitud de onda 530 nm) a una densidad óptica equivalente al 0,5 de la escala McFarland ($1-5 \times 10^6$ UFC/ml). Inocular 20 μ l de esta suspensión en el tubo con 11 ml de medio de cultivo (dilución de trabajo: $1,5-8 \times 10^3$ UFC/ml).

Rehidratación del panel

El panel se rehidrata dispensando 100 μ l de la suspensión del inóculo en cada pocillo; bien de forma manual, bien automáticamente con el autoinoculador Sensititre.

Incubación

Los paneles se sellan con papel autoadhesivo y se incuban en aerobiosis (nunca en atmósfera de CO_2) a 35 °C, durante 24-48 h para *Candida* spp. y 48-72 h para *C. neoformans*. Algunas cepas de *C. neoformans* no crecen en este medio.

Control del inóculo

Del mismo tubo de RPMI con el que se inoculan los paneles se siembran 10 μ l en una placa de SDA y se incuba a 35 °C. A las 24 h (*Candida* spp.) ó 48 h (*C. neoformans*) se cuenta el número de UFC (deben crecer entre 15-80 colonias).

Lectura

Antes de proceder a la lectura hay que comprobar que el pocillo control de crecimiento ha virado a rosa; en caso contrario, la incubación debe prolongarse hasta su cambio de color. La CMI de los azoles y la 5-fluorocitosina se lee a las 24 h de incubación para *Candida* spp. y a las 48 h para *C. neoformans*. Sin embargo, la CMI de la anfotericina B debe leerse a las 48 h de incubación para *Candida* spp. y a las 72 h para *C. neoformans*. La CMI de anfotericina B es la concentración más baja de antifúngico que no muestra cambio de color; es decir, el primer pocillo azul. En los azoles y en la 5-fluorocitosina no hay siempre un paso de rosa a

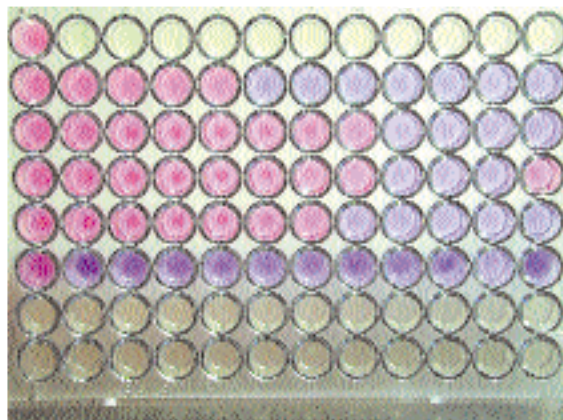


Figura 16.1. Panel Sensititre Yeast One a las 24 h de incubación.

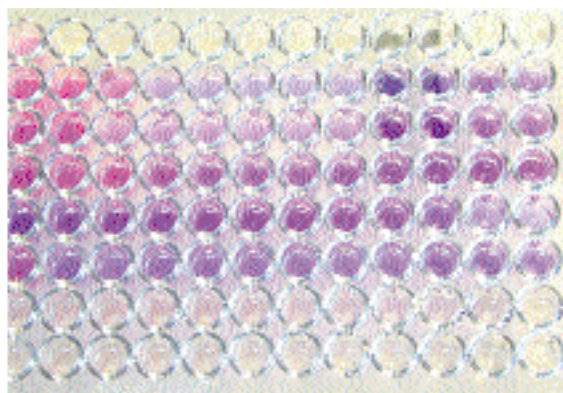


Figura 16.2. Panel Sensititre Yeast One a las 24h de incubación con efecto trailing en los antifúngicos azólicos.

Atención:

- En la lectura de la CMI no debe tenerse en cuenta la turbidez de los pocillos.
- La CMI de la anfotericina B se lee a las 48 h de incubación.

azul, pudiendo aparecer un color intermedio púrpura (debido al efecto trailing), en este caso la CMI es la concentración del primer pocillo púrpura (Figuras 16.1 y 16.2).

Cepas Control de Calidad

Para asegurar la validez de los resultados, en

cada lote debe utilizarse las cepas de control de calidad recomendadas por el documento M27-A del NCCLS: *C. parapsilosis* ATCC 22019 y *C. krusei* ATCC 6258 (Capítulo 15).

16.2.2. Fungitest®

Es otro método colorimétrico fabricado por Sanofi Diagnostic Pasteur y comercializado en España por Bio-Rad. En un estudio reciente, Willinger y cols. [5] estudian distintas especies de *Candida* por este método y encuentran buena correlación con el método de microdilución del NCCLS (excepto para *C. glabrata*): 100% para anfotericina B, 99% para 5-fluorocitosina, 96% para fluconazol y 86% para itraconazol. Sin embargo, se han documentado cepas resistentes al fluconazol o al itraconazol como sensibles por este método (16,6% y 20%, respectivamente) [6].

Fundamento

Está basado en el método de microdilución del NCCLS, incluye 6 antifúngicos cada uno de ellos a dos concentraciones críticas: anfotericina B (2 y 8 µg/ml), 5-fluorocitosina (2 y 32 µg/ml), miconazol (0,5 y 8 µg/ml), ketoconazol (0,5 y 4 µg/ml), itraconazol (0,5 y 4 µg/ml) y fluconazol (8 y 64 µg/ml).

Material

La prueba se presenta en forma de galería con 16 pocillos: 2 controles de crecimiento, 12 con los antifúngicos deshidratados y 2 pocillos controles de esterilidad.

Medio de cultivo

El medio utilizado es también RPMI 1640 tamponado. El medio contiene un indicador de oxido-reducción que cambia su color de azul (ausencia de crecimiento) a rosa (crecimiento).

Preparación del inóculo

A partir de dos colonias de levaduras, en un cultivo de 24 h en SDA, se realiza una suspensión en 3 ml de agua destilada hasta obtener una turbidez equivalente al 1 de McFarland. A partir de ella, se hace una dilución 1/20 (diluyendo 100 µl de esta suspensión en 1,9 ml de agua destilada estéril). 20 µl de esta suspensión se vuelven a diluir en 3 ml de RPMI para obtener un inóculo final de 1×10^3 UFC/ml.

Rehidratación del panel

Cada pocillo se inocula con 100 µl de la suspensión de RPMI conteniendo el inóculo y se sella



Figura 16.3. Galería de Fungitest.

la galería con papel autoadhesivo.

Incubación

Los paneles se incuban a 35 °C durante 48 h para *Candida* spp. y 72 h para *C. neoformans*. El crecimiento se aprecia por un cambio del color azul (ausencia de crecimiento) a rosa (crecimiento) (Figura 16.3).

Interpretación de la lectura

- Ausencia de crecimiento en los dos pocillos:

Problemas y ventajas:

- Las concentraciones de anfotericina B e itraconazol son demasiado elevadas.
- En los azoles, la correlación con el M27-A no es buena para las cepas resistentes [2].
- Es un método fácil y cómodo pero, para ser utilizado de rutina, se tendrían que revisar las concentraciones críticas en relación con la normativa del NCCLS.

Sensible.

- Crecimiento en ambos pocillos: Resistente.
- Crecimiento en el pocillo de menor concentración: Intermedio.

Cepas Control de Calidad

Las recomendadas por el documento M27-A del NCCLS (Capítulo 15).

16.3. Otros métodos basados en el M27-A

16.3.1. ATB Fungus®

Es un sistema no colorimétrico comercializado por bioMérieux. Este método podría ser aplicable a la rutina de un laboratorio de Microbiología pero no incorpora antifúngicos tan importantes en la clínica como el fluconazol y el itraconazol, por lo que su utilidad en las micosis sistémicas es limitada [7]. Por otra parte, la correlación con otros métodos es aceptable para los azoles (² 62%) y buena para anfotericina B (95%) y 5-fluorocitosina (100%).

Fundamento

Se basa en el método del NCCLS, utiliza diluciones seriadas para anfotericina B y 5-fluorocitosina y dos concentraciones críticas para el resto de los antifúngicos.

Material

Galería de 16 pocillos con los antifúngicos deshidratados a distintas concentraciones: 5-fluorocitosina (0,25-128 µg/ml), anfotericina B (1-8 µg/ml), nistatina (4 y 8 µg/ml), ketoconazol, miconazol y econazol (1 y 8 µg/ml).

Medio de cultivo

ATBF medium [Yeast Nitrogen Base (YNB) 6,7 g/l, con 1% de glucosa, 1,5 g/l de asparragina y 1,5 g/l de agar, pH 5,4 - 5,8].

Inóculo

A partir de un cultivo de 24 h en SDA, se hace una suspensión en agua destilada equivalente al 2 de McFarland. Transferir 100 µl de esta suspensión a una ampolla de ATBF (7 ml). De esta suspensión, se inoculan 135 µl en cada pocillo.

Incubación

A 35 °C en aerobiosis durante 48 h.

Lectura

Para anfotericina B y 5-fluorocitosina la CMI se lee en el pocillo donde se observa inhibición total del crecimiento. Para los otros antifúngicos sólo se puede establecer la categoría clínica (sensible, intermedio o resistente) ya que únicamente utiliza dos concentraciones críticas.

- Ausencia de crecimiento en ambas concentraciones: Sensible.
- Crecimiento en la concentración más baja: Intermedio.
- Crecimiento en las dos concentraciones: Resistente.

16.4. Métodos basados en la difusión en agar

16.4.1. Difusión de discos

La utilidad de los métodos basados en la difusión en agar de discos de antifúngicos ha estado limitada por los problemas de difusión de la mayoría de los antifúngicos y por su falta de correlación con la clínica. Hasta la fecha, sólo se ha encontrado correlación con los antifúngicos solubles en agua (fluconazol y 5-fluorocitosina) [2]. Distintos autores establecen una buena correlación entre los halos de inhibición de discos (25 µg y/o 50 µg) y tabletas (15 µg) (Rosco Diagnostica) de fluconazol obtenidos con distintos medios de cultivo (high resolution, yeast nitrogen base con agar, RPMI 1640 con agar, adicionado o no con 2% de glucosa, y agar de Mueller Hinton con 2% glucosa y 0,5 µg/ml de azul de metileno) y los valores de las CMI obtenidos por el método de referencia M27-A [2,3,8,9]. En la

mayoría de estos casos, salvo cuando se usa el medio de agar Mueller Hinton con glucosa y azul de metileno, no se diferencian bien las cepas resistentes (R) de las sensibles dependientes de la dosis (S-DD), teniendo que recurrir en estos casos a métodos cuantitativos [2,8,9]. Incluso con este medio, la concordancia no es muy buena para las cepas S-DD (56,3%) ni R (76,5%) [10].

Fundamento

Al igual que con las bacterias y los antibacterianos, con este método se estudia la sensibilidad de las levaduras a los antifúngicos en función del halo de inhibición producido por la difusión del antifúngico en un medio de cultivo sólido. Los pasos a seguir son los mismos que para las bacterias pero con algunas modificaciones [9].

Medio de cultivo

Agar Mueller Hinton (MHA) suplementado con 2% de glucosa (2 g/100 ml) y 0,5 µg/ml de azul de metileno.

- Solución madre de glucosa (0,4 g/ml):
Glucosa 40 g
Agua destilada 100 ml
 - Solución azul metileno (Merck BP 1973):
Azul metileno 0,1 g
Agua destilada 20 ml
1. Añadir 100 µl de la solución de azul de metileno a 100 ml de la solución madre de glucosa, quedando una solución de glucosa + azul de metileno (5 µg de azul de metileno + 0,4 g glucosa/ml).
 2. Esterilizar por filtración y añadir 1 ml a la superficie de las placas de MHA, si son de 9 cm de diámetro y 2,9 ml si son de 15 cm. Extender y dejar que se absorba durante toda la noche.
 3. Utilizar discos de fluconazol de 25 µg (Becton Dickinson) [9,10] o discos fabricados manualmente a partir de una solución madre de fluconazol (Pfizer) de 2 mg/ml, inoculándolos con 12,5 µl de esta solución y dejándolos secar para su uso.

Inóculo

Utilizar una suspensión ajustada al 0,5 McFarland en solución salina ($1-5 \times 10^6$ UFC/ml)

Inoculación

Inocular la placa de agar con una torunda

impregnada de la suspensión de levadura y sembrar en tres direcciones, igual que se hace para las bacterias. Dejar secar durante 15 min a temperatura ambiente y colocar los discos en la superficie.

Incubación

A 35 °C, 24 h para *Candida* spp. y 48 h para *C. neoformans*. Si no hay crecimiento a las 24 h, incubar 24 h más.

Lectura

Unos consejos...

- El medio MHA con glucosa y azul de metileno [9,10] permite diferenciar, en algunas situaciones, las cepas S, R y S-DD, presentando buena correlación con el método de referencia M27-A y con los datos *in vivo*. Aunque hay poca diferencia entre la lectura a 24 y a 48 h, se recomienda realizarla a las 24 h.
- Este método es muy útil para separar las cepas S, R o S-DD a fluconazol, aunque se necesitan más estudios de correlación clínica.

Medir los halos de inhibición de crecimiento en mm [9]. Los puntos de corte para los discos de 25 µg de fluconazol son:

- S: 19 mm (CMI 8 µg/ml)
- S-DD: 13-18 mm (CMI 16-32 µg/ml)
- R: 12 mm (CMI 64 µg/ml)

Cepas Control de Calidad

Los resultados con las cepas de control de calidad deben estar comprendidos entre los siguientes intervalos [9]:

- *C. albicans* ATCC 90028, halo de inhibición: 32-43 mm.
- *C. parapsilosis* ATCC 22019, halo de inhibición: 26-37 mm.

16.4.2. Etest®

Es un método cuantitativo de difusión en agar comercializado por AB biodisk y distribuido en España por Izasa S.A.

Fundamento

Las tiras de Etest son tiras de plástico inerte que incorporan un gradiente de concentración de antifúngico. Cuando se depositan sobre las placas de agar inoculadas, el antifúngico difunde en el medio y, tras una incubación a 35 °C durante 24-48 h para *Candida* spp. y 48-72 h para *C. neoformans*, se determina la CMI en el punto de intersección de la elipse de inhibición de crecimiento con la tira de Etest.

La correlación con el método M27-A varía entre el 60 y el 100%, según los estudios [2,3,11,12] pudiendo depender de varios factores:

- Medio de cultivo:** mejor correlación en los medios de agar casitona y RPMI 1640 con 2% de glucosa que en el medio RPMI sin glucosa [12].
- Combinación especie/antifúngico:** correlación más baja para *C. glabrata* - fluconazol, *C. tropicalis* - fluconazol e itraconazol, y *C. neoformans* - anfotericina B [12].
- Tiempo de incubación:** mejor correlación con lectura a las 24 h que a las 48 h [2,3].
- Antifúngico:** la correlación es más baja en los azoles debido a que la lectura es más problemática por la aparición de doble halo. En nuestro trabajo, hemos observado una correlación global para fluconazol del 74,6% y del 61,7% para itraconazol [12]. Las asociaciones *C. glabrata*-fluconazol y *C. parapsilosis*-itraconazol son las que presentan menor correlación (66,6% y 42,5%, respectivamente); el resto de las especies tienen una correlación por encima del 75% para fluconazol y por encima del 60% para itraconazol. En el caso de *C. neoformans*, la correlación para fluconazol y 5-fluorocitosina es del 81 y 90%, respectivamente; sin embargo, para itraconazol, la correlación es inferior al 60% [13]. Nuestros resultados [12] y los de otros autores [2], sugieren que este método puede ser útil en la rutina para anfotericina B y 5-fluorocitosina con *Candida* spp., pero es poco útil para los azoles; en el caso de *C. neoformans*, se puede utilizar con 5-fluorocitosina y fluconazol [2,13].

Parece ser el método de elección para detectar las cepas resistentes a anfotericina B usando el medio RPMI 1640 suplementado con un 2% de glucosa, tanto para *Candida* spp. como para *C. neoformans* cambiando los tiempos de incubación (24 h para *Candida* spp. y 48-72 para *C. neoformans*).

Medios de cultivo

RPMI 1640 + MOPS (0,164 M), a pH 7, adicionado con un 2% de glucosa y 1,5% de agar (Angus Biochemicals) suministrado en España por Izasa S.A

Inóculo

Para *Candida* spp. preparar una suspensión al 0,5 McFarland en solución salina (0,85% de ClNa) a partir de un cultivo de 24 h en SDA. Para *C. neoformans*, preparar una suspensión al 1 McFarland en solución salina a partir de un cultivo de 48-72 h en SDA.

Inoculación

A partir de estas suspensiones, inocular las placas de agar con una torunda sembrando en tres direcciones. Dejar secar 10-15 min para que se absorba el exceso del inóculo. Aplicar las tiras de Etest sobre la superficie del agar, bien manualmente o con el aplicador suministrado por la casa comercial. Colocar 5 tiras si la placa es de 14 mm y 2 si es



Figura 16.4. Etest: distribución de las tiras.

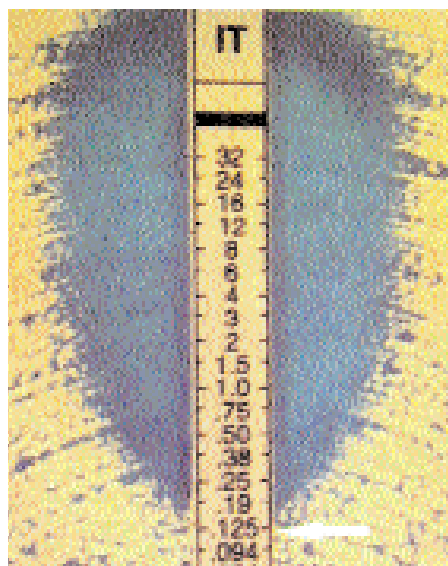


Figura 16.5. Etest: Lectura de la CMI de itraconazol.

de 9 mm, situando el extremo de mayor concentración del antifúngico hacia la parte exterior de la placa (Figura 16.4).

Incubación

A 35 °C en aerobiosis durante 24-48 h para *Candida* spp. y 48-72 h para *C. neoformans*.

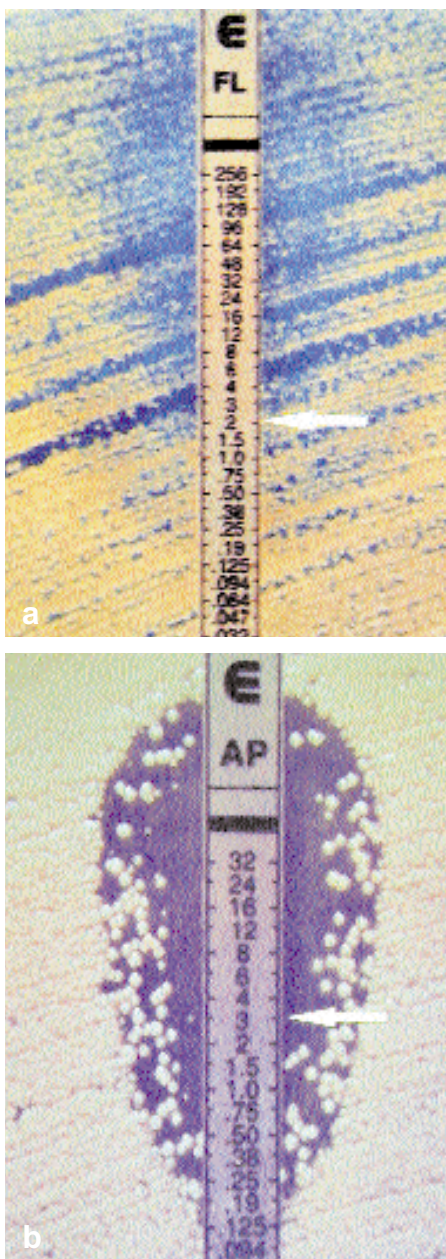


Figura 16.6. Etest: Lectura de la CMI (flecha) en presencia de colonias en el interior de la elipse de inhibición: a: fluconazol; b: anfotericina B.

Lectura

En los azoles, la CMI es la concentración de antifúngico en el punto de intersección de la elipse de inhibición de crecimiento con la tira (Figura 16.5). En el caso de observarse colonias de menor tamaño en el interior de la elipse de inhibición de los azoles, no hay que tenerlas en cuenta para la determinación de la CMI. A veces, con algunos azoles, se observa doble halo de inhibición pero con colonias del mismo tamaño en su interior, en cuyo caso debe considerarse resistente. En el caso de observarse triple halo de inhibición, la CMI es la concentración donde las colonias cambian de tamaño (Figura 16.6a). En el caso de la anfotericina B, toda colonia en el interior de la elipse de inhibición, independientemente de su tamaño, debe valorarse para la lectura de la CMI (Figura 16.6b).

16.5. Otros métodos

16.5.1. Dilución en agar

Este método tiene la ventaja de ser fácil, económico y rápido, y sirve tanto para *Candida* spp. como para *Cryptococcus* spp.; sin embargo, tiene el inconveniente de la subjetividad de su lectura y que, por ahora, sólo es aplicable al fluconazol [3].

El método clásico de dilución en agar se basa en el uso de placas Yeast Morphology Agar (YMA) (Difco) con distintas concentraciones de fluconazol (0,125-256 µg/ml) inoculadas con una suspensión de levaduras e incubadas a 35 °C durante 24 h para *Candida* spp. y 72 h para *C. neoformans*. La CMI se define como la concentración más baja de antifúngico donde se observa una disminución considerable del tamaño de las colonias en comparación con el control del crecimiento (placa sin antifúngico). La correlación con el método de referencia es buena, de tal forma que se puede utilizar como método alternativo para la selección de cepas resistentes a fluconazol, si bien se debería abreviar el protocolo limitando el número de concentraciones a ensayar (1, 8 y 32 µg/ml).

El método de dilución en agar también se puede aplicar utilizando otros medios de cultivo, como el CHROMagar *Candida*. El fundamento es el mismo que el anterior, consiste en utilizar placas de CHROMagar con distintas concentraciones de fluconazol (8 y 16 µg/ml), se inoculan con una suspensión de levaduras y se incuban durante 24 h a 35 °C. La CMI es la concentración más baja donde se aprecia una disminución considerable del tamaño de las colonias, en comparación con las del control (placa

sin antifúngico). Las ventajas de este método son las mismas que en el anterior y, además, ayuda a corroborar la pureza de la cepa. La correlación con el método de referencia (NCCLS M27-P) es muy buena [3].

16.6. Métodos alternativos para los hongos filamentosos

Hasta la fecha, el NCCLS sólo ha publicado un documento para el estudio de la sensibilidad antifúngica en hongos filamentosos: el documento M38-P [14] (Capítulo 15). Pero, aunque se acepta como el método de referencia, todavía no es definitivo, ya que se encuentra en la fase de *Proposed*, ni *Tentative* ni *Approved*, por lo que puede ser modificado en el futuro.

La lectura de la CMI es una de las modificaciones previsible, ya que para los azoles, aunque no se ha observado el efecto *trailing*, el documento M38-P recomienda el 50% de inhibición del crecimiento, al igual que para las levaduras [2]. Efectivamente, parece ser que para estos tipos de hongos el concepto clásico de CMI (inhibición total del crecimiento) se puede aplicar mejor y estos métodos son más fiables para la detección de resistencia a los azoles en *Aspergillus* spp. Este criterio de inhibición total del crecimiento lo han utilizado algunos autores para la detección de cepas de *Aspergillus* spp. resistentes a itraconazol, obteniendo buena correlación con los datos *in vivo* en modelos experimentales de aspergilosis invasora [2].

Al igual que ocurre con las levaduras, el método recomendado por el NCCLS para estos hongos es demasiado laborioso para ser utilizado como método de rutina en los laboratorios de Microbiología clínica, por lo que se están buscando otros métodos alternativos como los que se detallan a continuación.

16.6.1. Sensititre YeastOne®

Es un método cuantitativo comercializado por Trek Diagnostic Systems Inc. para levaduras, pero que también puede ser utilizado en los hongos filamentosos para facilitar la rutina de un laboratorio de Microbiología. Datos no publicados muestran que con *Aspergillus* spp. la correlación con el documento M38-P para la anfotericina B, a las 72 h, es

del 97% y para el itraconazol del 90% [Martín-Mazuelos y cols., en prensa]. El método todavía requiere estudios adicionales para poder utilizarlo en la rutina pero parece un buen método alternativo. Tanto el material que se precisa como el medio de cultivo utilizado es el mismo que para las levaduras. Las únicas diferencias a tener en cuenta con este método cuando se trabaja con hongos filamentosos son las siguientes:

Inóculo

La preparación del inóculo puede hacerse siguiendo las recomendaciones del M38-P [2].

Incubación

A 35 °C durante 48-72 h.

Lectura

La CMI corresponde a la concentración más baja de antifúngico donde se observa un cambio del color rosa (crecimiento) a azul (ausencia de crecimiento) para anfotericina B y cambio de rosa a azul o a púrpura (inhibición parcial) para los azoles y 5-fluorocitosina.

16.6.2. Dilución en agar

Es similar al método de dilución en agar utilizado para bacterias. Se preparan diluciones seriadas a partir de una dilución 10 veces la concentración final del antifúngico a evaluar y se incorporan al agar fundido. Las placas con el antifúngico se inoculan con suspensiones entre 10^5 – 10^7 UFC/ml. Los medios de cultivo utilizados son AM#3, RPMI y YNB, pero para algunos autores, el medio RPMI 1640, solidificado y tamponado a pH 7 con MOPS, es el que mejor correlación muestra con los resultados *in vivo* para itraconazol [2]. La incubación se realiza a 28 °C ó 35 °C durante 48-72 h y la lectura de la CMI se hace según el método convencional.

16.6.3. Difusión en discos

Es un método útil para conocer la sensibilidad a la anfotericina B y a los nuevos antifúngicos, como las equinocandinas, de *Aspergillus* spp. y otros hongos filamentosos. En la actualidad, hay pocos estudios con este método, si bien con caspofungina y anfotericina B se ha obtenido mejor correlación con los datos *in vivo* que con el método M38-P [2].

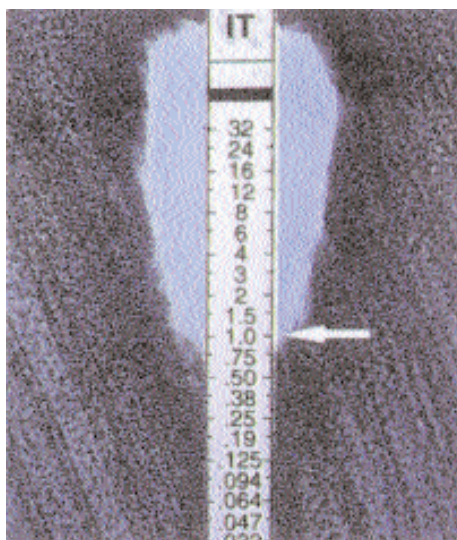


Figura 16.7. Placa de Etest inoculada con *A. fumigatus*. Lectura de la CMI a las 24 h (flecha).

Unos consejos...

A la vista de los resultados publicados con los métodos alternativos al NCCLS, el método más útil para la rutina de un laboratorio de Microbiología Clínica sería:

En levaduras:

- Para la mayoría de los antifúngicos: el método colorimétrico Sensititre YeastOne.
- Para la anfotericina B: el método Etest, utilizando el medio RPMI con 2% de glucosa.

En los **hongos filamentosos** hace falta realizar más estudios sobre todo de correlación *in vitro* - *in vivo*, por lo que no puede recomendarse, por ahora, ningún método alternativo.

16.6.4. Etest®

Este método (AB biodisk) es muy útil para la determinación de la sensibilidad *in vitro* de hongos filamentosos a los antifúngicos, ya que, al contrario

Referencias

1. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: Approved standard. NCCLS document M27 A. Villanova, National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1997.
2. Espinel-Ingroff A, Warnock DW, Vazquez JA, Arhontong-Skaags BA. *In vitro* antifungal susceptibility methods and clinical implications of antifungal resistance. Med Mycol 2000; 38 (Supl.1): s293-s304.
3. Martín Mazuelos E. Métodos de estudio de sensibilidad *in vitro* de levaduras. Rev Esp Quimioter 2000; 13: 99-103.
4. López-Jodra O, Torres-Rodríguez JM, Méndez-Vasquez E, Rivas-Focardell Y, Baró-Tomás T, Alía-Ponte C. *In vitro* susceptibility of *Cryptococcus neoformans* isolates to five antifungal drugs using a colorimetric system and the reference microbroth method. J Clin Microbiol 2000; 45: 645-649.
5. Willinger B, Apfalter P, Hirschl AM, Makristani A, Rotter M, Seibold M. Susceptibility testing of *Candida* species: comparison of NCCLS microdilution method with Fungitest. Diagn Microbiol Infect Dis 2000; 38: 11-15.
6. Davey KG, Holmes Ad, Johnson EM, Szekely A, Warnock DW. Comparative evaluation of Fungitest and broth microdilution methods for antifungal drug susceptibility testing of *Candida* species and *Cryptococcus neoformans*. J Clin Microbiol 1998; 36: 926-930.
7. Druetta A, Freydière A, Guinet R, Gille Y. Evaluation of five commercial antifungal susceptibility testing systems. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1993; 12: 336-342.
8. Cantón E, Pemán J, Carrillo-Muñoz A, et al. Fluconazole susceptibility of bloodstream *Candida* sp isolates as determined by National Committee for Clinical Laboratory Standards Methods M27-A and two other methods. J Clin Microbiol 1999; 37: 2197-2200.
9. Meis J, Petrou M, Bille J, Ellis D, Gibbs D, and the Global Antifungal surveillance group. A global evaluation of the susceptibility of *Candida* species to fluconazole by disk diffusion. Diagn Microbiol Infect Dis 2000; 36: 215-223.
10. Lee S, Fung C, Lee N, et al. Fluconazole disk diffusion test with methylene-blue and glucose-enriched Mueller-Hinton agar for determining susceptibility of *Candida* species. J Clin Microbiol 2001; 39: 1615-1617.
11. Pfaller MA, Messer SA, Karlsson A, Bolmström A. Evaluation of E-test method for determining fluconazole susceptibilities of 402 clinical yeast isolates by using three different agar media. J Clin Microbiol 1998; 36: 2586-2589.
12. Martín Mazuelos E, Gutiérrez MJ, Aller AI, et al. A comparative evaluation of E-test and microdilution broth method for fluconazole and itraconazole susceptibility testing of *Candida* species. J Antimicrob Chemother 2000; 43: 477-481.
13. Aller AI, Martín Mazuelos E, Gutiérrez MJ, Bernal S, Chávez M, Recio FJ. Comparison of the Etest and microdilution method for antifungal susceptibility testing of *Cryptococcus neoformans* to four antifungal agents. J Antimicrob Chemother 2000; 46: 997-1000.
14. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of conidium-forming filamentous fungi. Proposed standard M38-P. Villanova, PA, National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1998.
15. Pfaller MA, Messer SA, Mills K, Bolmström A. *In vitro* susceptibility testing of filamentous fungi: Comparison of Etest and reference microdilution method for determining Itraconazole MICs. J Clin Microbiol 2000; 38: 3359-3361.
16. Espinel-Ingroff A. Comparison of the Etest with the NCCLS M38-P method for antifungal susceptibility testing of common and emerging pathogenic filamentous fungi. J Clin Microbiol 2001; 38: 1360-1367.
17. Szekely A, Johnson E, Warnock D. Comparison of Etest and broth microdilution methods for antifungal drug susceptibility testing of moulds. J Clin Microbiol 1999; 37: 1480-1483.

de lo que ocurre en las levaduras, las elipses de inhibición son nítidas y más fáciles de interpretar (Figura 16.7). La correlación con el método M38-P es superior al 80% y 90% para anfotericina B e itra-

Núria Borrell
Xavier Mesquida
Pedro Alomar

17.1. Introducción

El nivel de bioseguridad laboral sigue siendo una área de especial interés para el personal que trabaja en un laboratorio de Microbiología clínica. El manejo y procesamiento de las muestras clínicas implica el aislamiento de un gran número de agentes infecciosos, muchos de los cuales, sobre todo los hongos, tienen gran facilidad para formar una suspensión aérea a partir del medio de cultivo. En la naturaleza, la mayoría de los hongos filamentosos desarrollan estructuras que se dispersan en el aire (conidios, cuerpos fructíferos aéreos o artroconidios) y pueden permanecer en el ambiente durante periodos prolongados de tiempo, resistiendo a la desecación.

Entre las infecciones adquiridas en el laboratorio la infección fúngica representa el 9%, en su mayoría debida a hongos dimórficos [1]. Porcentaje no despreciable teniendo en cuenta la baja frecuencia de aislamiento de estos microorganismos. Además de estas, otras muchas infecciones fúngicas pueden ser adquiridas en el laboratorio, constituyendo un riesgo ocupacional bien reconocido para los micólogos [2].

Sin embargo, el riesgo de adquisición de infección en los laboratorios puede verse minimizado con el empleo de un conjunto de normas de seguridad, basadas tanto en el método de procesamiento de la muestra como en el uso de un equipamiento de protección personal.

La ruta de transmisión es uno de los elementos más fáciles de considerar a la hora de establecer unas normas de bioseguridad. La vía respiratoria y el contacto directo con piel y mucosas son las vías más comunes para la infección fúngica en el laboratorio.

17.2. Principios básicos de la seguridad biológica

17.2.1. Clasificación de los agentes biológicos por su grupo de riesgo

El determinante más importante en el riesgo biológico es la patogenicidad del microorganismo. Cada agente infeccioso tiene asignado un grupo de riesgo en función de su virulencia (historia de infección adquirida en la comunidad), su potencial epidémico, la dosis requerida para iniciar la infección (dosis infectiva), la ruta de infección o de transmisión (tanto en el laboratorio como en la comunidad), el espectro de huéspedes susceptibles incluyendo los reservorios animales y sus vectores, la viabilidad del agente infeccioso en el entorno del laboratorio y la existencia de tratamiento [3].

Se define como agente biológico de:

- Grupo 1: Aquel que resulta poco probable que cause una enfermedad en el hombre.
- Grupo 2: Aquel que puede causar una enfermedad en el hombre y puede suponer un peligro para los trabajadores, siendo poco probable que se propague a la colectividad y existiendo generalmente profilaxis y tratamiento eficaz.
- Grupo 3: Aquel que puede causar una enfermedad en el hombre y puede suponer un peligro para los trabajadores, con riesgo de que se propague a la colectividad y existiendo generalmente profilaxis y tratamiento eficaz.
- Grupo 4: Aquel que causando enfermedad grave en el hombre supone un serio peligro para los trabajadores, con muchas probabilidades que se propague a la comunidad y sin que exista generalmente una profilaxis y un tratamiento eficaz.

En la **Tabla 17.1** se presenta una lista de distintos hongos, clasificados en función de su riesgo de infección y su capacidad alérgica, según la normativa española vigente, descrita en el Real Decreto 664/1997 [4].

Tabla 17.1. Clasificación de los hongos en grupos de riesgo según el Real Decreto 664/1997 [4].

Hongo	Grupo
<i>Aspergillus fumigatus</i>	2 ^a
<i>Blastomyces dermatitidis</i> (<i>Ajellomyces dermatitidis</i>)	3
<i>Candida albicans</i>	2 ^a
<i>Cladophialophora bantiana</i> (<i>Xylohypha bantiana</i> , <i>Cladosporium bantianum</i> o <i>trichoides</i>)	3
<i>Candida tropicalis</i>	2
<i>Coccidioides immitis</i>	3 ^a
<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i> (<i>Filobasidiella neoformans</i> var. <i>neoformans</i>)	2 ^a
<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>gattii</i> (<i>Filobasidiella bacillispora</i>)	2 ^a
<i>Emmonsia parva</i> var. <i>parva</i>	2
<i>Emmonsia parva</i> var. <i>crescens</i>	2
<i>Epydermophyton floccosum</i>	2 ^a
<i>Fonsecaea compacta</i>	2
<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	2
<i>Histoplasma capsulatum</i> var. <i>capsulatum</i> (<i>Ajellomyces capsulatus</i>)	3
<i>Histoplasma capsulatum</i> var. <i>duboisii</i>	3
<i>Madurella grisea</i>	2
<i>Madurella mycetomatis</i>	2
<i>Microsporium</i> spp.	2 ^a
<i>Neotestudina rosatii</i>	2
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	3
<i>Penicillium marneffe</i>	2 ^a
<i>Scedosporium apiospermum</i> (<i>Pseudallescheria boidii</i>)	2
<i>Scedosporium prolificans</i> (<i>inflatum</i>)	2
<i>Sporothrix schenckii</i>	2
<i>Trichophyton rubrum</i>	2
<i>Trichophyton</i> spp.	2

a: Posibles efectos alérgicos

17.2.2. Niveles de contención

La seguridad biológica se fundamenta en tres elementos: las técnicas de laboratorio, el equipo de seguridad o barreras primarias y el diseño de la instalación o barreras secundarias [3].

El término “contención” se emplea para describir los métodos que hacen seguro el manejo de materiales infecciosos en el laboratorio, para reducir

al mínimo la exposición del personal. Se suelen describir cuatro niveles de contención o seguridad biológica, que consiste en la combinación, en menor y mayor grado, de los tres elementos de seguridad biológica descritos (técnicas de laboratorio, barreras primarias y barreras secundarias). En el caso concreto del área de Micología las medidas descritas para nivel de contención 2 son las adecuadas, a excepción de aquellos casos en que se conozca la identidad de la cepa fúngica y se corresponda con un hongo dimórfico (*Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Paracoccidioides brasiliensis*) o con *Cladophialophora bantiana* que requerirían nivel de contención 3 (Tabla 17.1). Todas ellas son las que se describen

en los siguientes Apartados.

17.3. Normas generales de seguridad biológica

En nuestro país, la protección de los trabajadores frente a los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos está regulada por el Real Decreto (RD) 664/97 y la adaptación contenida en la Orden de 25 de marzo de 1998 [4]. Según este decreto el responsable inmediato de la Seguridad y las Condiciones de Trabajo en el Laboratorio es el jefe del laboratorio. Debe supervisar y mantener actualizado el Manual de Seguridad propio que debe ser entregado a todos los trabajadores del laboratorio.

Las normas generales son comunes para las distintas áreas del laboratorio con nivel de contención 2 y de obligado cumplimiento en cualquiera de ellas [3].

17.3.1. Medidas generales

- El acceso al laboratorio está limitado a personal autorizado.
- El personal del laboratorio debe implicarse en el cumplimiento de las normas de seguridad.
- Las puertas de acceso al laboratorio y al área de Micología debe estar debidamente marcada con la señalización internacional de riesgo biológico (Figura 17.1) y su nivel de contención biológica, que en el caso del área de Micología se corresponde con el nivel 2 (NST2). También se señalarán los congeladores y refrigeradores utilizados para guardar microorganismos de riesgo de tipo 2.
- Las puertas y ventanas deben permanecer cerradas para mantener la adecuada contención biológica.
- El laboratorio estará separado del pasillo de circulación por un vestíbulo.
- El laboratorio debe ser aireado regularmente. El aporte de aire nuevo será como mínimo de 60 m³ por persona y hora.
- Todas las superficies de trabajo se limpiarán y desinfectarán diariamente y siempre que se produzca un derrame. Los residuos y muestras peligrosas que van a ser incinerados fuera del laboratorio deben ser transportados en contenedores cerrados, resistentes e impermeables, siguiendo las normas específicas para cada tipo de residuo (ver más adelante).
- El área del laboratorio debe permanecer limpia y



Figura 17.1. Señal de peligro biológico.

- ordenada.
- La Unidad deberá disponer de un lavabo para el lavado de las manos que funcionará presionando con el codo o con el pie.
- El transporte de muestras dentro o entre laboratorios se realizará de tal manera, que en caso de caída, no se produzcan salpicaduras. Lo recomendable es hacerlo en cajas herméticas o neveras transportables. Estas deberán ser rígidas y resistentes a los golpes, disponer de materiales absorbentes en su interior y de fácil desinfección. Deberán estar rotuladas de forma oportuna y no podrán utilizarse para otros fines. Bajo ningún concepto se transportarán muestras en mano.
- Todo el personal debe poner especial cuidado en evitar el contacto de la piel con materiales potencialmente infecciosos. Para ello deben usarse guantes cuando se manipulen muestras o cultivos que contengan posibles patógenos fúngicos. Los guantes siempre serán desechados antes de salir del área de trabajo. Jamás se saldrá de la misma con los guantes puestos, ni se cogerá con ellos el teléfono, las peticiones, etc.
- Inmediatamente después de quitarse los guantes, se realizará un lavado de manos.
- Se usarán gafas protectoras y mascarillas faciales si existe riesgo de salpicaduras o aerosoles.
- Los derrames y accidentes serán informados inmediatamente al supervisor o jefe del laboratorio y se harán constar por escrito.
- Está rigurosamente prohibido pipetear con la boca.
- En la zona de trabajo no debe colocarse material de escritorio ni libros ya que el papel contaminado es de muy difícil esterilización.
- Es necesario disponer de autoclave.
- Las centrífugas deben ser de cierre hermético

(sistema *aerosol free*) y con tubos de seguridad.

17.3.2. Higiene

- El personal con el cabello largo debe llevarlo recogido.
- Comer, beber, fumar y aplicarse cosméticos está formalmente prohibido en el área de trabajo del laboratorio, así como el almacenamiento de comida o bebida.
- El personal debe lavarse las manos frecuentemente durante las actividades rutinarias, tras acabar la jornada laboral y siempre antes de abandonar el laboratorio. Se utilizará jabón anti-séptico y el secado se realizará con papel.
- Las heridas y cortes en las manos, si se producen el laboratorio, se comunicarán al responsable de la Sección así como al supervisor, que lo registrará haciendo constar todas las circunstancias. Las heridas serán convenientemente vendadas antes de ponerse los guantes.

17.3.3. Objetos punzantes y cortantes

- Las agujas, jeringas y bisturís, deben ser desechados exclusivamente en contenedores especiales diseñados para este propósito.

17.4. Técnicas de laboratorio en el área de Micología

- Todos los cultivos de hongos (especialmente los hongos con micelio aéreo) y muestras clínicas serán manejadas en una cabina de bioseguridad de clase II, para evitar la contaminación del laboratorio y del personal. Es permisible el manejo de cultivos de levaduras en la mesa de trabajo del laboratorio aunque siempre tratados como material infeccioso.
- Las placas con medios de cultivo para hongos deben ser selladas, para evitar su apertura accidental mediante cinta adhesiva permeable al oxígeno que no pierda esta propiedad en una estufa de incubación con ambiente húmedo (Scotch N° 483).
- En caso de utilización de medios de cultivo en tubo, estos deberán disponer de tapón de rosca de seguridad.

- En ambos casos su apertura sólo deberá hacerse en cabina de bioseguridad de clase II.
- En el caso de trabajar con aislamientos fúngicos dimórficos conocidos, las precauciones a seguir son sencillas si se dispone de condiciones de nivel de contención 3. En su defecto, sellar las placas con cinta adhesiva y reservar su apertura sólo en cabina de bioseguridad de clase II. No hacer preparaciones con cinta adhesiva para su observación microscópica, ni cultivos en porta. Lo aconsejable en este caso es separar una porción de la colonia, para su montaje en porta, en la cabina de bioseguridad de clase II.
- En ningún caso debe descartarse la posibilidad que se trate de un hongo dimórfico sistémico. Por ejemplo, *Coccidioides immitis* es a menudo considerado hongo de crecimiento rápido no productor de una masa micelial pigmentada; sin embargo, en algunos casos puede producir una pigmentación rosada o verdosa. Sus artroconidias pueden estar ausentes en su crecimiento en ciertos medios de cultivo, como en aquellos que contienen cicloheximida, pero sí están presentes en otro tipo de medios de cultivo.

Por otro lado, la ausencia de macroconidias características de *Histoplasma capsulatum*, tampoco debe descartar la posibilidad que se trate de este tipo de hongo, dado que pueden ser de aparición tardía (además, se cree que probablemente son las microconidias las responsables de la infección por transmisión aérea). Todo crecimiento de hongo filamentoso en medio con cicloheximida con hifas estériles, especialmente si son cortas, debe ser considerado con alta capacidad infectiva hasta que no se demuestre lo contrario.

- El mayor problema de seguridad en el laboratorio al trabajar con hongos dimórficos no lo constituye el área de Micología, donde probablemente se trabaja siguiendo una pautas de bioseguridad adecuadas, sino las otras áreas del laboratorio donde se procesará la misma muestra para estudio bacteriológico. En este caso pueden seguirse dos tipos de conductas:

a) Cualquier medio de cultivo que deba incubarse más de tres días debe ser sellado y no abierto sin antes inspeccionar la presencia de formas miceliales.

b) Ante la apertura de forma accidental de cualquier placa con la presencia de un hongo filamentoso, esta debe ser rápidamente cerrada y manipulada en una campana de bioseguridad para su examen microscópico. La presencia o ausencia de estructuras conidiales en el momento de la exposición debe ser tenida en cuenta para poder tomar medidas médicas sobre el incidente.

El transporte de este tipo de hongos dimórficos sistémicos debe realizarse bajo las condiciones estrictas descritas para los mismos (ver más adelante), ya que los conidios infecciosos pueden formarse

durante su transporte y constituir un riesgo para quien lo transporta o recibe el aislamiento.

- Existen microorganismos que, a pesar de ser dimórficos, no suelen constituir un riesgo infeccioso por medio de aerosoles como es el caso de *Sporothrix schenckii*; sin embargo, es un patógeno potencial tras inoculación subcutánea o en contacto con mucosa ocular. En este caso concreto, al no constituir un riesgo infeccioso por vía aérea, podría ser procesado en un nivel de contención 2.

También se ha sugerido que los hongos dematiáceos pueden constituir riesgo de infección por vía respiratoria en su forma micelial, dada su capacidad infectiva, en pacientes inmunodeprimidos tras contacto con los mismos en la naturaleza.

A pesar de que la mayoría de los restantes hongos oportunistas y saprofitos, no parecen constituir un riesgo de infección para el personal de laboratorio inmunocompetente, la dispersión de las conidias en el laboratorio puede producir reacciones de tipo alérgico, así como contaminación de los medios de cultivo. Por tanto para proteger al trabajador como al resto del trabajo del laboratorio, deben evitarse grandes exposiciones al ambiente, abriendo tan sólo los medios de cultivo positivos en cabinas de bioseguridad clase II.

- El vertido de todo material infeccioso debe realizarse en recipientes identificados como contenedores de material infeccioso, para que puedan ser descontaminados apropiadamente.

17.5. Medidas de barrera primaria

Están constituidas por los equipos de protección personal y las cabinas de seguridad biológica [3].

17.5.1. Equipos o prendas de protección personal

A todo el personal que trabaje en una Unidad de Micología se aconseja respete las siguientes recomendaciones:

17.5.2. Cabinas de seguridad biológica

Son cámaras de circulación forzada que, según sus especificaciones y diseño, proporcionan diferentes niveles de protección. Es necesario distinguir entre las campanas de extracción de gases, las cabinas de flujo laminar y las cabinas de seguridad biológica.

La **campana de gases** o vitrina extractora de gases es un recinto ventilado que captura los humos y vapores procedentes de las manipulaciones de los productos químicos empleados en el laboratorio. Si bien constituye un equipo muy útil en la contención de riesgo químico, no ofrece protección alguna frente a riesgos biológicos.

Las **cabinas de flujo laminar** son recintos que emplean un ventilador para forzar el paso de aire a través de un filtro HEPA (*High Efficiency Particulate Air*) barriendo la superficie de trabajo. El flujo de aire puede ser vertical u horizontal. Estas cabinas ofrecen protección únicamente al material que se maneja en su interior, pero nunca al operador por lo que no son recomendables para el trabajo con material biológico. Sin embargo, es un instrumento

Recomendaciones para la protección del personal de laboratorio:

- No se recomienda el uso de lentillas durante el trabajo en el laboratorio.
- Los guantes constituyen la medida de barrera más empleada para la protección de manos:
 - Las manos deben lavarse obligatoriamente al quitarse los guantes.
 - Sólo deben emplearse para protección contra riesgos biológicos y físicos (calor o frío), pero no para otras tareas (manejar volantes, teléfono, abrir puertas, etc.).
- La mascarilla sólo tiene utilidad para protección frente a polvo (partículas), aerosoles, gases y vapores químicos.
- La bata o pijama como vestuario de protección personal:
 - No debe salir fuera de su lugar de uso (cafetería, calle, etc.).
 - Nunca deben ser lavados fuera del recinto hospitalario.
 - No es aconsejable el empleo de ropa de calle que aumente la superficie corporal expuesta (pantalones cortos, sandalias, etc.).

útil en las denominadas “zonas limpias” como pueden ser las destinadas a vertido de medios de cultivo, preparación de reactivos que deban ser estériles, etc.

Las **cabinas de seguridad biológica (CSB)** son recintos ventilados diseñados para limitar al máximo el riesgo del personal del laboratorio expuesto a agentes infecciosos. Especialmente porque muchas de las actividades realizadas en el laboratorio implican la formación de aerosoles. Estos equipos tienen como objetivo principal proporcionar una zona de trabajo que minimice la probabilidad que una partícula transportada por el aire tienda a escapar hacia el exterior de la cabina pudiendo contaminar al operario y la zona que le rodea. Además, algunas de ellas, ofrecen protección al material que se manipula.

Las CSB disponen de dos sistemas que impiden la salida de contaminación: las barreras de aire y los filtros. La barrera de aire se crea permitiendo que este fluya en una sola dirección y a una velocidad constante dando lugar a una verdadera “cortina” de aire, sin turbulencias, que se conoce como flujo de aire laminar. Los filtros tienen como finalidad atrapar las partículas contenidas en este flujo de aire. Los que se emplean habitualmente son los filtros HEPA, que retiene con una eficacia del 99,9% partículas de hasta 0,3 micras de diámetro. Existen tres tipos de CSB: Clase I, Clase II y Clase III. A continuación se describen sus principales características, a excepción de las de Clase III, ya que estas no son necesarias en el área de Micología.

CSB Clase I

Son cámaras cerradas con una abertura al frente para permitir el acceso de los brazos del operario. El aire penetra por este frontal, atraviesa la zona de trabajo y todo él sale al exterior a través de un filtro HEPA. La velocidad de flujo del aire es de unos 4,4 m/s. Son apropiadas para manipular agentes biológicos de los grupos 1, 2 y 3. La mayor desventaja que presentan es que no proporcionan protección al material con el que se trabaja, no evitando que este se pueda contaminar. Por lo tanto se desaconseja su uso para el trabajo en el área de Micología.

CSB Clase II

Se diferencian de las anteriores porque, además de ofrecer protección al operario y a su entorno, ofrecen protección al producto frente a la contaminación. La superficie de trabajo está bañada por aire limpio que ha atravesado un filtro HEPA (Figura 17.2). La salida de aire se produce a través de otro filtro HEPA. Son válidas para el manejo de agentes biológicos de los grupos 1, 2 y 3, entre los que incluyen los hongos y por tanto las recomendadas para el laboratorio de Micología. Existen varios tipos de cabinas de Clase II según sus características

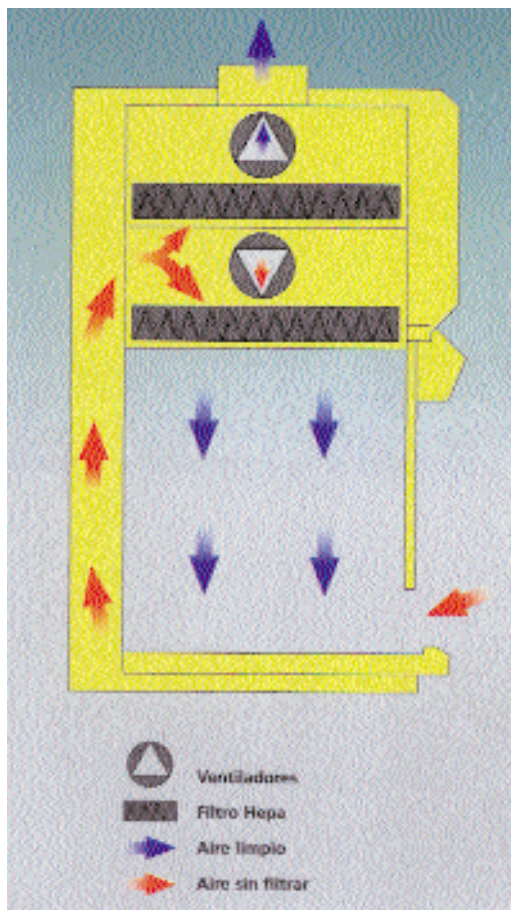


Figura 17.2. Cabina de seguridad biológica de clase II A.

de construcción, flujo de aire y sistema de extracción.

Clase II-A: Expulsa el aire filtrado al laboratorio o puede ser conducido fuera de él y recircula en un 70%.

Clase II-B1: Expulsa el aire filtrado al exterior del laboratorio y recircula el 30%.

Instalación de la CSB:

1. Debe situarse lo más lejos posible de las rejillas de aire acondicionado, campanas de gases, puertas y zonas de mucho tránsito de personal, que puedan interferir en el flujo laminar.
2. Las ventanas del laboratorio deben permanecer siempre cerradas.
3. Debe existir al menos 0,3 m entre la salida de aire de la cabina y el techo del laboratorio.
4. Se instalará sobre una superficie sólida y nunca móvil. Si es posible, en un recinto cerrado de acceso restringido.

Al iniciar el trabajo:

1. Poner en marcha la cabina durante 15-30 min.
2. Comprobar que el manómetro situado en la parte superior del frontal se estabilice e indique la presión adecuada.
3. Encender la luz fluorescente.
4. Limpiar la superficie de trabajo con un compuesto yodado como la povidona yodada (Betadine, Topionic, etc.) y enjuagar posteriormente para retirar los restos de yodo.
5. Antes y después de trabajar en una CSB debe realizarse lavado de manos y brazos.
6. Se aconseja emplear bata de manga larga y guantes de látex para minimizar el desplazamiento de la flora bacteriana cutánea hacia el interior del área de trabajo y proteger las manos y los brazos del operario de toda contaminación.

Durante la manipulación:

1. Colocar todo el material a utilizar en la zona de trabajo antes de empezar, situando el material contaminado en un extremo de la superficie de trabajo y el no contaminado en el extremo opuesto de la misma.
2. Se recomienda trabajar a unos 5-10 cm por encima de la superficie y alejado de los bordes de la misma, procurando no obstruir las rejillas de aire con materiales o residuos.
3. Una vez el trabajo haya comenzado y sea imprescindible la introducción de un nuevo material, se recomienda esperar de 5 a 10 min antes de reiniciar la tarea. Ello permite la estabilización del flujo del aire. Debe recordarse que cuanto más material se introduzca en la CSB, la probabilidad de provocar turbulencias de aire se incrementa.
4. Evitar al máximo las corrientes de aire ambientales provenientes de puertas o ventanas abiertas, movimientos de personas, sistemas de ventilación del laboratorio, etc. que perturben el flujo establecido en el interior de la CSB. Así mismo, deberían evitarse movimientos bruscos dentro de la CSB, con movimientos de brazos y manos lentos para impedir la formación de corrientes de aire que alteren el flujo laminar.
5. Debe evitarse el empleo de mecheros Bunsen, cuya llama crea turbulencias en el flujo, además de dañar potencialmente el filtro HEPA. Cuando se precise el empleo de asas o espátula micológica de níquel o platino es aconsejable el incinerador eléctrico o bien el empleo de asas desechables.
6. Si se produce un vertido accidental de material biológico se recogerá inmediatamente, descontaminando la superficie de trabajo y todo el material que en ese momento exista dentro de la CSB.
7. No se empleará nunca una CSB cuando esté sonando alguna de sus alarmas.

Al finalizar el trabajo:

1. Limpiar el exterior del material que se haya contaminado.
2. Vaciar la CSB por completo de cualquier material.
3. Limpiar y descontaminar la superficie de trabajo con un jabón desinfectante y después con un compuesto yodado (povidona yodada). La limpieza tiene por objeto eliminar la suciedad que se halle adherida a la superficie (que sirve de soporte a los microorganismos) y la materia orgánica, contribuyendo de forma decisiva a la eficacia de la descontaminación posterior con el yodóforo. A fin de evitar la coloración residual de los compuestos yodóforos en las superficies, estas deben enjuagarse con agua.
4. Dejar en marcha la CSB durante un tiempo prudencial (10-15 min).
5. Cerrar la apertura frontal.
6. La luz ultravioleta, presente en algunas CSB, tiene poco poder de penetración por lo que su capacidad descontaminante es muy limitada, además de constituir una fuente de accidentes por exposición, por lo que debería evitarse su empleo.
7. Nunca se debe utilizar la CBS como almacén transitorio de equipo o material de laboratorio para evitar el acúmulo de polvo.
8. Evitar introducir en la CSB materiales que emitan partículas con facilidad, como algodón, papel, madera, cartón, lápices, etc.

Mantenimiento:

1. Semanalmente conviene levantar la superficie de trabajo para limpiar y descontaminar por debajo de ella.
2. Semanalmente, con un paño mojado, se limpiarán todas las superficies exteriores con objeto de eliminar el polvo acumulado.
3. Mensualmente se revisará el estado de las válvulas interiores con que vaya equipada.
4. Anualmente se certificará por una entidad cualificada.
5. Se llevará a cabo una desinfección completa en las siguientes situaciones:
 - a. En caso de que se haya producido un vertido importante
 - b. Antes de cualquier reparación
 - c. Antes de iniciar los controles periódicos
 - d. Siempre que se cambie el programa de trabajo
 - e. Cuando se substituyan los filtros HEPA
 - f. Cuando se cambie de lugar, incluso si el cambio es dentro del mismo laboratorio.
6. La desinfección completa se realizará con vapores de formaldehído por personal debidamente entrenado y equipado con prendas de protección adecuadas.

Clase II-B2: Expulsa el aire filtrado al exterior del laboratorio y no recircula.

Clase II-B3: Expulsa el aire filtrado al exterior del laboratorio y recircula el 70%.

Hasta el momento, no existe en España ninguna legislación relativa a los requisitos que deban cumplir las CSB. La práctica más habitual consiste en exigir a los proveedores correspondientes la declaración de conformidad, bien con la norma británica BS 3928 o con la estadounidense NSF 49.

Las recomendaciones generales son las siguientes:

Tabla 17.2. Propiedades de algunos desinfectantes sobre microorganismos fúngicos [5].

Tipo de desinfectante	Grado de acción desinfectante
Fenólicos	+++
Hipocloritos	+
Alcoholes	-
Formaldehídos	+++
Glutaraldehídos	+++
Yodóforos	+++
Amonios cuaternarios	+
+++ buena; ++ media; + débil; - ninguna	

Mesa de trabajo o poyata de laboratorio:

- La limpieza debe ser diaria al finalizar el trabajo o cuando se produzca un derramamiento.
- Para ello puede emplearse hipoclorito al 0,5%, que se consigue diluyendo la lejía estándar al 1% con agua.

Cabina de bioseguridad:

- Debe procederse a su limpieza con compuesto detergente líquido y papel para realizar el arrastre de materia orgánica que pueda existir.
- A continuación puede emplearse compuestos de yodo de alta eficacia frente a los elementos fúngicos. Dada su acción colorante y corrosiva sobre los metales, es preferible usar los derivados yodóforos como la povidona yodada (polivinil-pirrolidona) diluida al 2%, que es de acción inmediata. A los pocos minutos es recomendable enjuagar con agua para eliminar la coloración residual. Es preferible no utilizar etanol al 70% para eliminar los restos de yodo dado que en las CSB en las que recircule el aire se desaconseja su uso por su volatilidad.

Estufas:

- Se procederá a su limpieza y desinfección mediante detergente líquido y posterior aplicación de povidona yodada al 2%. En este caso, para eliminar la coloración residual del yodóforo puede emplearse etanol al 70%.
- En aquellos casos en que se observe un incremento de las contaminaciones en los medios de cultivo por hongos ambientales, especialmente *Aspergillus* spp., puede procederse, tras la limpieza y desinfección ya comentada, a la aplicación de un compuesto fenólico en dilución acuosa a niveles de entre 400 y 1300 ppm (fenol en una dilución 1:1000). A diferencia de los compuestos yodados, este compuesto tiene un efecto residual prolongado.

Derrame accidental:

- Cubrir con un papel de filtro la zona afecta. Ello permite delimitar con claridad la extensión de superficie afecta por el derrame.
- Verter encima del área afecta, con cuidado, hipoclorito a una concentración superior que la empleada para limpieza (lejía casera diluida al 1:10). Dejar actuar 20 min. También puede emplearse compuestos de yodo.
- Con guantes retirar los desechos en un contenedor para material infeccioso.
- Enjuagar para evitar coloración residual.

17.6. Agentes desinfectantes

En la [Tabla 17.2](#) se describen las propiedades de algunos desinfectantes frente a los microorganismos fúngicos [5,6].

Basándose en ello, los de mayor utilidad en el área de Micología son los siguientes:

Hipoclorito sódico

Los desinfectantes que contienen hipoclorito sódico (lejía) son potentes agentes oxidantes que liberan Cl_2 (gas cloro). La exposición al cloro produce irritación de mucosas incluida la del tracto respiratorio superior y piel. Debe emplearse bata y guantes resistentes.

Compuestos cuaternarios

Incorporados a múltiples soluciones desinfectantes, son generalmente menos cáusticos que otros desinfectantes. Sin embargo, debe tenerse cuidado con su manipulación ya que es conocida su capacidad para irritar la piel y producir alergias.

Formaldehído y glutaraldehído

Son compuestos altamente tóxicos. El formaldehído puede estar presente en el laboratorio en forma gaseosa, líquida (solución de formalina) o sólida (paraformaldehído). Puede producir, tras exposición aguda, irritaciones oculares y del tracto respiratorio superior; y tras exposición crónica, dermatitis, alergias cutáneas y respiratorias. Se sospecha además de su poder carcinogénico en humanos. Ambos compuestos deben ser sólo manipulados en campana de gases y con protectores de ojos impermeables.

17.7.2. Colorantes

Son utilizados en la mayoría de casos en cantidades muy pequeñas. Sin embargo, deben tomarse precauciones para evitar su exposición especialmente a los derivados de la acridina, como el naranja de acridina, que son carcinogénicos. El bromuro de etidio es un poderoso mutágeno de efecto acumulativo utilizado en técnicas de biología molecular. Debe evitarse estrictamente el contacto con estas sustancias mediante el empleo de guantes.

17.8. Gestión de residuos

17.8.1. Gestión de residuos infecciosos

17.7. Normas de protección frente a productos químicos

Una forma rápida y fiable para identificar el riesgo de una sustancia o preparado químico es su etiqueta. En ella, el fabricante o proveedor, de acuerdo con la legislación existente, debe identificar las sustancias peligrosas que lo componen e informar de los riesgos (frases R) y los consejos de prudencia (frases S). Además, junto al producto, debe adjuntarse la ficha de datos de seguridad en la que se amplía la información y se detallan los riesgos de su utilización y las medidas de seguridad a adoptar [7].

La exposición a los compuestos químicos puede producir efectos agudos o crónicos y la aparición de enfermedades. Estos efectos son función directa de la toxicidad del agente químico, la dosis absorbida y la vía de entrada al organismo: por inhalación, dérmica (mucosas y piel intacta), digestiva o percutánea.

El correcto almacenamiento de los compuestos químicos constituye la primera medida de actuación, separando aquellas familias de productos incompatibles. Se separarán ácidos de bases, oxidantes de inflamables, sustancias cancerígenas, etc. Los envases más pesados así como los ácidos y las bases fuertes se colocarán en los estantes inferiores. Los productos peroxidables (éter etílico, éter isopropílico, etc.) pueden provocar detonaciones por contacto con el aire o incluso por choque o fricción, por ello no es aconsejable almacenarlos una vez abiertos más de 6 meses, a no ser que contengan un inhibidor eficaz.

Entre los compuestos más empleados en el área de Micología figuran:

17.7.1. Agentes desinfectantes

Residuos líquidos

La mayoría de laboratorios someten a los residuos líquidos a un tratamiento de esterilización por autoclave.

Residuos sólidos

Sus formas más frecuentes de tratamiento son la incineración y la esterilización por autoclave. En el primer caso deben depositarse en recipientes rígidos que serán transportados de forma regulada por empresas autorizadas para su incineración. Sin embargo, la esterilización por autoclave es la manera más común de tratar este tipo de residuos en el propio laboratorio. Debe tenerse en cuenta que los programas para materiales limpios no sirven para los desechos, siendo recomendable prolongar el tiempo y aumentar la presión del proceso de autoclavado en estos casos. La utilización de indicadores químicos y biológicos (suspensiones de esporas de *Bacillus*) no es suficiente para el control de la eficacia del proceso. Algunos autores recomiendan no utilizarlas para evitar una falsa seguridad. Alternativamente, consideran más apropiado el control riguroso sistemático de cada proceso (registro de presión y temperatura) y un mantenimiento apropiado del autoclave.

Objetos punzantes y cortantes

Dado que constituyen un claro riesgo de inoculación accidental deben depositarse en recipientes específicos que sean resistentes a la punción y con cierre seguro. Una vez llenos, se depositan en los recipientes rígidos utilizados para los residuos sólidos.

17.8.2. Gestión de residuos químicos

Ante todo se debería disponer de una lista que identificara todos aquellos residuos peligrosos que sean susceptibles de atención, incluidos aquellos que formen parte de reactivos comerciales. En general pueden eliminarse después de un sencillo tratamiento en el propio laboratorio. Cuando no es posible debe consultarse a las autoridades locales para su vertido controlado. Se recomienda disponer de material absorbente inerte específico para productos químicos. En algunos casos concretos se procederá de la manera siguiente:

Ácidos inorgánicos

Salvo roturas accidentales, no suele ser frecuente tener que eliminar ácidos concentrados (HCl,

HNO₃, H₂SO₄, etc.), aunque sí soluciones diluidas de los mismos. Como norma general no debe eliminarse directamente aquellas soluciones cuya concentración sea superior a 1N. Los ácidos más concentrados se diluyen en agua al 1:5 (especial precaución con el ácido sulfúrico), se neutralizan a pH 6,8 con soluciones de hidróxido sódico y se vuelven a diluir al 1:10 en agua para poder ser eliminados por el desagüe. Las soluciones más diluidas se neutralizan con sosa y se diluyen en agua antes de eliminarse.

Bases inorgánicas, sales básicas y diluciones básicas

Su gestión es parecida a la aplicada en los ácidos. Las bases y sales básicas se neutralizan con ácido sulfúrico diluido. Si son muy concentradas, se diluyen previamente en agua al 1:5. Una vez neutralizadas, se vuelven a diluir en agua (1:10) y se eliminan.

Fenoles

El fenol y sus derivados son irritantes y tóxicos. No deben eliminarse a través de los desagües, ni tan siquiera diluidos. El procesamiento de destrucción química no está al alcance de la mayoría de laboratorios. Lo más aconsejable es separarlos en recipientes específicos y transferirlos a un gestor autorizado de residuos.

Azida sódica

Está presente en muchos reactivos comerciales como conservante. Nunca debe eliminarse directamente por desagües de plomo dado que forma derivados altamente explosivos. Es un tóxico muy potente y agente mutágeno. Es conveniente contactar con las autoridades locales autorizadas para conocer las normas específicas, ya que la destrucción química con nitrato sódico no resulta práctica en la mayoría de laboratorios.

Aldehídos, cetonas y disolventes orgánicos

El formaldehído es el residuo generado en el laboratorio más común dentro de este grupo. No debe ser eliminado directamente por el desagüe. Conviene almacenarlo en recipientes seguros para poderlo eliminar de manera controlada. La destrucción con permanganato potásico es compleja. La eliminación controlada también es aconsejable para los diversos disolventes orgánicos (acetona, cloroformo, xileno y otros derivados bencénicos, etc.).

Bromuro de etidio

Es un mutágeno poderoso de efecto acumulativo utilizado en técnicas de biología molecular. Deben seguirse de forma estricta los procedimientos de manipulación que eviten su contacto (guantes, etc.). Los geles teñidos con bromuro de etidio no deben eliminarse como una basura convencional, sino a través de los sistemas de eliminación de mutágenos y citostáticos propios del centro hospitalario. Las soluciones tampón de electroforesis que contienen bromuro de etidio tampoco deben eliminarse por los desagües. Deberían tratarse con carbón activo (100 mg por cada 100 ml de solución), filtrar la solución formada a través de un filtro de papel y depositarlo todo en el cubo de eliminación de citostáticos. Las superficies pueden descontaminarse aplicando una papilla de carbón activo que se dejará actuar durante un tiempo, depositándose posteriormente en el cubo de eliminación de citostáticos.

Colorantes

Recomendaciones para la manipulación de residuos:

- Los recipientes para desechar los residuos de riesgo en el área de trabajo deben ser rígidos, de volumen inferior a 60 l, impermeables y resistentes a ácidos y álcalis, de cierre hermético y homologados para ser incinerados.
- El almacenamiento y transporte deberá hacerse en condiciones seguras. Deben existir zonas acotadas para su almacenamiento intermedio especialmente si los residuos son de riesgo, no superando en ningún caso las 24 h una vez se ha cerrado.
- Para los residuos no específicos se utilizarán bolsas de color diferenciadas.
- En el caso de objetos cortantes o punzantes deberán utilizarse recipientes rígidos resistentes a la perforación cuyo volumen no supere los 2 l.

No deberían ser eliminados directamente por

los desagües. Se recomienda efectuar las tinciones en cubetas que drenen sobre botellas o bidones que se entregarán, una vez llenos, al gestor de residuos autorizado. Estas medidas deben ser seguidas de manera rigurosa en el caso de la tinción de auramina. El naranja de acridina es también un compuesto mutágeno, por lo que se recomienda almacenarlo en recipientes separados.

Metales pesados, mercurio y compuestos organomercuriales

La rotura de termómetros y manómetros puede ser una causa de exposición al mercurio. Se recomienda recoger los restos más visibles y depositarlos en un recipiente cerrado. Los menos visibles pueden recogerse con ayuda de polvo absorbente o azufre y guardar el conjunto en otro envase. Los residuos deben ser almacenados y eliminados de forma controlada.

17.9. Normas de seguridad en el almacenamiento, transporte y envío de material biológico

17.9.1. Almacenamiento

El material infeccioso debe almacenarse en zonas de acceso restringido para minimizar la posibilidad de contaminación del personal y del ambiente.

El sistema básico de embalaje estará compuesto por:

1. Recipiente primario a prueba de filtraciones, etiquetado, que contenga la muestra. El recipiente debe envolverse con material absorbente.
2. Recipiente secundario a prueba de filtraciones, que encierra y protege el recipiente primario. En él se pueden colocar varios recipientes primarios, colocando suficiente material absorbente para evitar choques entre ellos. Los formularios, cartas y otras informaciones de identificación de la muestra deben colocarse pegados con cinta adhesiva en el exterior de este recipiente.
3. Recipiente externo de envío donde se coloca el recipiente secundario para protegerlo de elementos externos como daño físico y agua.

17.9.2. Transporte y envío

No existen regulaciones ni recomendaciones específicas para el transporte seguro de microorganismos patógenos. Sin embargo, si ampliamos la definición y los consideramos como “sustancias infecciosas”, hay varios documentos internacionales

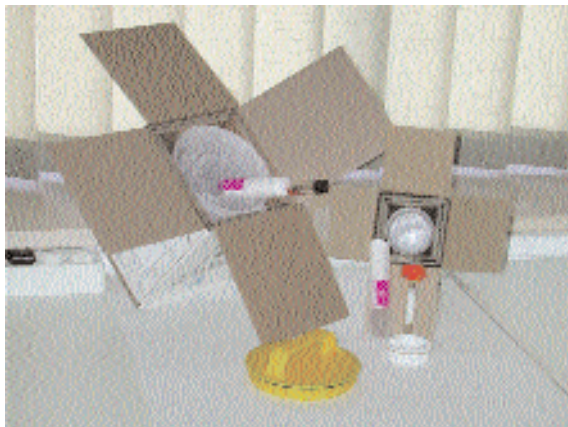


Figura 17.3. Sistema de embalaje para transporte aéreo de material biológico.



Figura 17.4. Sistema de embalaje para transporte terrestre de material biológico.

relacionados con el tema, como los de la Unión Postal Universal (UPU), la Organización Internacional de Aviación (OIA) y la Asociación Internacional de Transporte Aéreo (IATA).

Estas directivas y, en general, todos los documentos internacionales relacionados están basados en texto único común: Recomendaciones del Comité de Expertos de las Naciones Unidas para el transporte de artículos peligrosos.

Estas recomendaciones clasifican las mercancías infecciosas en varias clases, dos de las cuales están relacionadas con los microorganismos patógenos: clase 6.2 (sustancias infecciosas) y clase 9 (sustancias peligrosas misceláneas y artículos).

Los embalajes para transporte aéreo (Figura 17.3) presentan algunas diferencias respecto a los transportados por vía terrestre (Figura 17.4), ya que deben asegurar la protección frente a presiones muy altas (Carburos Metálicos, Embalajes y Mercancías Peligrosas, Esdesla, Sarstedt). En los vuelos internacionales está estrictamente prohibido que los pasajeros transporten sustancias infecciosas.

17.10. Normas de seguridad en caso de accidente

17.10.1. Riesgos no biológicos

Químicos

Pueden deberse a inhalación accidental por no usar cámara de gases, a deglución por pipetear indebidamente o por contacto (salpicaduras de ácidos, álcalis, sustancias tóxicas o cancerígenas). En este último caso la ducha de seguridad puede ser de ayuda y, en cualquier caso, se debe acudir al Servicio de Urgencias. Resulta de gran utilidad consultar la ficha de seguridad del producto causante del accidente y las notas técnicas que se encuentran disponibles en las páginas web del Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales [7,8].

Físicos, eléctricos y fuego

Los accidentes físicos más frecuentes son las heridas causadas por objetos punzantes o cortantes y las quemaduras por vapor de autoclave. En los casos que no puedan solucionarse con las medidas de primeros auxilios se acudirá al Servicio de Urgencias.

En los accidentes eléctricos jamás se intentará apartar al afectado de la fuente eléctrica con

las manos, sino a través de un objeto no conductor, procediendo previamente al corte del suministro eléctrico.

En caso de fuego su extinción se llevará acabo mediante extintores de CO₂. Si se tratara de líquidos que ardieran en su superficie, se procurará

su sofocación sin extintor, dado que la salida de CO₂ a alta presión puede producir salpicaduras del líquido inflamable que está ardiendo.

17.10.2. Riesgos biológicos

Tabla 17.3. Infecciones fúngicas adquiridas en el laboratorio [9].

Hongo	Inhalación	Inoculación transcutánea	Piel	Conjuntiva	Contacto con animal infectado
<i>Blastomyces dermatidis</i>	X	X			
<i>Coccidioides immitis</i>	X	X			
<i>Cryptococcus neoformans</i>		X			
<i>Histoplasma capsulatum</i>	X	X			
<i>Penicillium marneffeii</i>	X	X			
<i>Sporothrix schenckii</i>		X	X	X	
Dermatofitos					X

Referencias

1. Warnock DW. Mycotic agents of human disease. In: Fleming DO, Hunt DL (Eds.) Biological safety principles and practices. Washington D.C., American Society for Microbiology Press, 2000: 111-120.
2. Collins CH. Laboratory-acquired infections. History, incidence, causes and prevention. Oxford, Butterworth-Heinemann, 1993.
3. Loza E, Alomar P, Bernal A, *et al.*. Seguridad en el Laboratorio de Microbiología clínica. Procedimientos en Microbiología clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Madrid, SEIMC, 1999.
4. Protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos durante el trabajo. Real Decreto 664/1997, de 12 de Mayo. B.O.E. nº 124, de 24 de mayo y adaptación contenida en la Orden de 25 de marzo de 1998.
5. Block SS. Desinfection, sterilization, and preservation. Pennsylvania, Lea & Febiger, 1991.
6. McDonnell G, Russell AD. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. Clin Microbiol Rev 1999; 12: 147-179.
7. Fichas de seguridad química del Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales: <http://www.mtas.es/insht/ipcsnspn/spanish.htm>
8. Notas técnicas del Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales: http://www.mtas.es/insht/information/Ind_temntp.htm
9. Sewell DL. Laboratory-associated infections and biosafety. Clin Microbiol Rev 1995; 8: 389-405.

M^a Pilar Arévalo Morales
Álvaro Torres Lana
Delia Cárdenes Perera

18.1. Fundamento

Los programas de control de calidad en el laboratorio de Micología tienen como misión asegurar que la información generada por el laboratorio sea precisa, fiable y reproducible. La consecución de estos objetivos se logra valorando la calidad de las muestras clínicas recibidas, controlando la realización de los procedimientos diagnósticos, los reactivos, medios e instrumentos utilizados, así como la formación y conocimientos del personal del laboratorio. También es necesario revisar y validar los resultados obtenidos.

El interés global podría apartarse un poco de detalles rigurosos, incluso puntillosos, de los controles de calidad a favor de una evaluación más amplia de la certificación de calidad en la atención del paciente. Puede ser más importante asegurarse que los informes lleguen a tiempo al médico peticionario y sirvan como guía esencial para la atención del paciente que preocuparse, por ejemplo, que se controle una tinción cotidiana de azul de lactofenol.

La precisión y la utilidad clínica de un informe elaborado por un laboratorio de Micología dependen de una serie de factores:

- Calidad de la muestra clínica.
- Validez del método de procesamiento.
- La forma en que se realiza este método de procesamiento.
- Reactivos, medios, instrumentos y grado de preparación del personal.
- Realización del informe final de los resultados obtenidos.

Un programa de Control de Calidad monitorea continuamente todos estos factores e identifica las posibles áreas de mejora.

En este Capítulo se detallan los distintos componentes de un sistema de control de calidad en un laboratorio según las fases que existen desde que una muestra clínica es recogida de un paciente hasta que se remite el resultado final.

18.2. Recogida y transporte de muestras

El control de calidad en esta fase hace referencia a normas generales sobre la recogida de muestras de un paciente. Se deben realizar pruebas de cribado de las muestras recibidas como, por ejemplo, contar las células epiteliales en una muestra respiratoria. Como regla no se deben procesar muestras inaceptables a no ser que no puedan ser recogidas de nuevo. En este supuesto se debe hacer constar la calidad de la muestra en el informe. Nunca se deberán procesar las siguientes muestras:

- Torundas reutilizadas.
- Líquido cefalorraquídeo en cantidad menor a 0,3 ml para la detección de antígeno criptocócico.
- Suero hemolizado o lipémico para la realización de técnicas serológicas fúngicas.

18.3. Normas de procedimientos estandarizados

Las normas de procedimientos estandarizados deben basarse en trabajos previamente publicados en libros, revistas y manuales reconocidos, que deben ser citados y estar disponibles siempre durante el horario de trabajo. Las normas deben incluir las fases del procedimiento, los límites de tolerancia, los criterios de aceptabilidad de las muestras clínicas para ese procedimiento, la preparación de reactivos, la forma de realizar los informes y los controles de calidad necesarios y recomendados. Deben ser revisadas anualmente, consignándose y fechándose los cambios realizados en estas revisiones, así como la persona responsable de dichos cambios.

18.4. Control del equipamiento e instrumentación del laboratorio

Como norma general, hay que realizar los controles de calidad y mantenimiento con la frecuencia que sea necesaria para garantizar el correcto funcionamiento del instrumental, siguiendo normalmente las indicaciones del fabricante. Se recomiendan los controles propios de cualquier laboratorio de Microbiología, detallados en la [Tabla 18.1](#).

El material de vidrio reutilizable debe ser limpiado y esterilizado, almacenándose cubierto con papel de aluminio etiquetado con la fecha de esterilización. Hay que utilizarlo antes de tres semanas.

Se deben conservar todos los documentos e informes relativos a un equipo durante toda la vida útil del mismo.

18.5. Control de medios de cultivo

18.5.1. Medios elaborados en el propio laboratorio

Como control de esterilidad, se debe probar un 5% (escogidos al azar) de cada tanda de medios preparados en el propio laboratorio. Se incuba la mitad del 5% a 35 °C y la otra mitad a 25 °C durante 72 h, inspeccionándolos diariamente. Sólo es aceptable el lote elaborado si el porcentaje encontrado de contaminaciones entre los medios incubados es inferior al 5%. Los lotes de medios se deben etiquetar con el número de lote, fecha de caducidad, método de esterilización utilizado y la cantidad de

Tabla 18.1. Control de calidad de los equipos de uso común en Micología.

Equipo	Procedimiento	Periodicidad	Límites de tolerancia
Refrigeradores	Registro de temperatura*	Diario o continuo	2 °C a 8 °C
Congeladores	Registro de temperatura*	Diario o continuo	- 8 °C a - 20 °C - 60 °C a - 80 °C
Estufas	Registro de temperatura*	Diario o continuo	45 °C ± 1 °C 35,5 °C ± 1 °C 30 °C ± 1 °C
Baños de agua	Registro de temperatura*	Diario	36 °C a 38 °C 55 °C a 57 °C
Autoclaves	Prueba con la tira de esporas (<i>Bacillus stearothermophilus</i>)	Semanalmente	Ausencia de crecimiento
pHmetros	Soluciones calibradoras de pH	Con cada uso	0,1 unidades de pH del estándar
Centrífugas	Revisión de revoluciones por minuto (tacómetro)	Mensualmente	Dentro del 5% del ajuste del mando
Campana de seguridad	Medición de la velocidad de aire a través de la apertura frontal	Cada 3-6 meses	1,52 m³ de aire/min. ± 0,152 m³/min.

* Cada termómetro debe ser calibrado con un termómetro patrón.

medio realizado en ese lote.

18.5.2. Medios comerciales

Los medios adquiridos comercialmente deben ser observados para comprobar el color, el grado de sequedad y presencia de contaminaciones, procediendo como en el caso anterior a realizar controles de esterilidad. Estos medios comerciales están exentos de comprobar su capacidad de proporcionar

los resultados esperados, siempre que los fabricantes hagan constar en la etiqueta que cumplen las normas de calidad del NCCLS (documento M22-A).

Los medios de cultivo elaborados en el propio laboratorio y los comercializados que no cumplan las normas M22-A deberán ser comprobados utilizando cepas de control de calidad con morfología, fisiología y propiedades bioquímicas conocidas. Una relación del método a seguir se resume en la **Tabla 18.2**. Es recomendable usar estas cepas con-

Tabla 18.2. Controles de calidad para medios de cultivo micológicos.

Medio ^a	pH ($\pm 0,2$)	Incubación	Organismo control ^b	ATCC ^c	Resultados esperados
Agar glucosado Sabouraud (SDA) ^d	5,6	4 sem	<i>Candida albicans</i>	60193	Crecimiento
Emmonds modificado ^d	6,9	4 sem	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	9533	Crecimiento
			<i>Escherichia coli</i>	25922	Inhibición con antimicrobianos
			<i>Aspergillus niger</i>	16404	Inhibición con cicloheximida; Crecimiento con gentamicina o cloramfenicol
Agar glucosado de patata (PDA) ^d	5,6	4 sem	<i>Candida albicans</i>	60193	Crecimiento
			<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	9533	Crecimiento
BHIA (Agar-Infusión de Corazón-Cerebro) + Sangre de cordero ^d	7,4	1-3 días	<i>Candida albicans</i>	60193	Crecimiento
			<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	9533	Crecimiento
			<i>Candida albicans</i>	60193	Crecimiento
			<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	9533	Crecimiento
+ Sangre de cordero + antimicrobianos			<i>Candida albicans</i>	10231	Crecimiento
			<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	9533	Crecimiento
			<i>Escherichia coli</i>	25922	Inhibición
			<i>Aspergillus niger</i>	16404	Inhibición con cicloheximida
Agar Czapek Dox	7,3	1-2 sem	<i>Aspergillus niger</i>	16404	Crecimiento
Agar fungus selection ^d	6,9	4 sem	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	9533	Crecimiento
			<i>Candida albicans</i>	10231	Crecimiento
			<i>Aspergillus niger</i>	16404	Inhibición
			<i>Escherichia coli</i>	25922	Inhibición
Agar inhibidor de mohos	6,7	4 sem	<i>Aspergillus niger</i>	16404	Crecimiento
			<i>Candida albicans</i>	10231	Crecimiento
			<i>Escherichia coli</i>	25922	Inhibición
			<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	9533	Crecimiento
Agar extracto de malta	5,6	4 sem	<i>Candida albicans</i>	60193	Crecimiento
			<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	9533	Crecimiento
Agar ascospora	6,5	1-4 sem	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	9763	Ascosporas
			<i>Candida albicans</i>	10231	Ausencia de ascosporas
Agar harina de maíz +/- Polisorbato (Tween 80)	5,8	3 días	<i>Candida albicans</i>	10231	Crecimiento, clamidosporas
			<i>Candida pseudotropicalis</i>	8553	Crecimiento, no clamidosporas
+ Glucosa	5,8	1-4 sem	<i>Trichophyton rubrum</i>	28188	Crecimiento, rojo
			<i>Candida albicans</i>	10231	Crecimiento

Sigue en la página siguiente

Tabla 18.2. Controles de calidad para medios de cultivo micológicos (continuación).

Medio ^a	pH (± 0,2)	Incubación	Organismo control ^b	ATCC ^c	Resultados esperados
Agar patata zanahoria bilis	5,8	1-3 días	<i>Candida albicans</i>	10231	Crecimiento, clamidosporas
			<i>Candida pseudotropicalis</i>	8553	Crecimiento, no clamidosporas
Agar extracto de arroz	5,8	1-2 días	<i>Candida albicans</i>	10231	Crecimiento, clamidosporas
			<i>Candida krusei</i>	6258	Crecimiento, no clamidosporas
Agar alpiste	6,5	1-14 días	<i>Cryptococcus neoformans</i>	32045	Crecimiento, pigmento pardo
			<i>Cryptococcus laurentii</i>	18803	Crecimiento, ausencia de pigmento
Urea de Christensen		1-3 días	<i>Cryptococcus neoformans</i>	66031	Rosa a rojo
			<i>Candida albicans</i>	60193	Ausencia de color
Agar dermatofitos ^d	5,5	7 días	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	9533	Crecimiento, rojo
			<i>Candida albicans</i>	10231	Crecimiento escaso
			<i>Aspergillus niger</i>	16404	Inhibición
			<i>Escherichia coli</i>	25922	Inhibición
Agar <i>Trichophyton</i> #1, #2, #3, #4			<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	9533	Buen crecimiento en todos
			<i>Trichophyton tonsurans</i>		Buen crecimiento en tubos # 3, 4
					Escaso crecimiento en tubos # 1, 2
					Buen crecimiento en tubos # 2, 3
					Escaso crecimiento en tubos # 1, 4
Medio de arroz			<i>Microsporum audouinii</i>		No crecimiento o decoloración pardusca del medio
			<i>Microsporum canis</i>		Crecimiento, color amarillo brillante
			<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	9533	Buen crecimiento
Agar urea dextrosa		6-8 días	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	9533	Rosa a rojo
			<i>Trichophyton rubrum</i>	28188	Ausencia de color
Medios comerciales					
CHROMagar Candida		1-3 días	<i>Candida krusei</i>	6258	Rosa / rugosa
			<i>Candida albicans</i>	10231	Verde
Albicans ID		1-3 días	<i>Candida albicans</i>	10231	Azul
			<i>Cryptococcus laurentii</i>	18803	Ausencia de color
CHROMalbicans Agar		1-3 días	<i>Candida albicans</i>	60139	Azul
			<i>Cryptococcus laurentii</i>	18803	Ausencia de color
Murex CA-50		1-3 días	<i>Candida albicans</i>	60139	Azul
			<i>Cryptococcus laurentii</i>	18803	Ausencia de color
Candi-select			<i>Candida albicans</i>	2091	Azul
			<i>Candida tropicalis</i>	750	Blanco
			<i>Staphylococcus aureus</i>	25923	Ausencia de crecimiento
Mycosel			<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	9533	Crecimiento
			<i>Aspergillus flavus</i>		Escaso o ausencia de crecimiento
			Sin inóculo		No crecimiento

a: Los inóculos no están estandarizados

b: Organismos recomendados para control de calidad. Aunque se citan cepas de la ATCC, se acepta cualquier hongo que ofrezca un resultado similar

c: ATCC, American Type Culture Collection

d: Exento de realizar control de calidad si los medios son comerciales

trol cada vez que se utiliza el medio, pero la periodi-

cidad de estas comprobaciones será establecida por

el responsable del laboratorio, dado que no existen normas concretas, aunque es muy aconsejable realizarlas cada vez que se usa un lote nuevo de medios.

una etiqueta con la fecha de preparación y el nombre de la persona que ha elaborado el colorante. Los procedimientos de preparación de los colorantes y realización de las tinciones deberán estar escritos y disponibles mientras esté abierto el laboratorio. La adquisición de reactivos se deberá limitar a un suministro de seis meses. Los controles de calidad y los resultados esperados, así como la periodicidad con la que deben ser llevados a cabo se especifican en la [Tabla 18.3](#).

18.6. Tinciones y reactivos

Todas las soluciones de tinción y los diferentes reactivos deberán estar etiquetadas con su nombre, el número de lote, la fecha de caducidad y las condiciones de almacenamiento. Los productos comerciales deberán ser fechados a la recepción y en el momento de la apertura para su uso. Las soluciones preparadas en el laboratorio deberán tener

18.7. Técnicas morfológicas de

Tabla 18.3. Controles de calidad de las tinciones.

Calcoflúor

Candida albicans Color azul brillante o verde manzana
Control negativo. KOH mezclado con el blanco de calcoflúor
Comprobar cada vez que se use

Tinta China

Cryptococcus albidus. Presencia de cápsula hialina
Comprobar cada vez que se use y que la tinta china no está contaminada

Hidróxido Potásico Combinar el reactivo antes de su uso utilizando una muestra de esputo para confirmar que se disuelve y que está libre de bacterias y de elementos fúngicos

Lactofenol-azul de algodón

Penicillium spp. Se observará la pared celular de color azul intenso
Comprobar también la esterilidad del colorante

Tabla 18.4. Controles de calidad de los procedimientos de identificación morfológicos.

Tubos germinativos

1) *Candida albicans* ATCC 60193 Control positivo fi tubos germinativos
2) *Candida tropicalis* ATCC 66029 . . . Control negativo fi ausencia de tubos germinativos
Realizar cada vez que se ejecute

Conversión dimórfica

BHI con 10% de sangre de cordero
1) *Histoplasma capsulatum* Crecimiento/conversión a levadura
2) Sin inóculo No crecimiento
Realizar con cada nuevo lote

Perforación de pelo

1) *Trichophyton mentagrophytes* Control positivo fi Perforación
2) *Trichophyton rubrum* Control negativo fi Ausencia de perforación
Ejecutar el control cada vez que se realiza la técnica

Termotolerancia

1) *Aspergillus fumigatus*. Control positivo fi Crecimiento a 45-50 °C
2) *Aspergillus flavus*. Control negativo fi Ausencia de crecimiento

identificación

Los diferentes controles de calidad para las diversas técnicas de identificación basadas en características morfológicas se muestran en la [Tabla 18.4](#).

bioquímica

18.8. Técnicas de identificación

Todas las pruebas bioquímicas deben realizarse según las instrucciones recogidas en los

Tabla 18.5. Controles de calidad de las pruebas de identificación bioquímica.

Medio	Organismo control	ATCC	Resultado esperado
Levaduras: asimilación de carbohidratos			
Control (sin carbohidratos)	<i>Candida albicans</i>	10231	No crecimiento
	<i>Cryptococcus laurentii</i>	18803	No crecimiento
Celobiosa	<i>Cryptococcus laurentii</i>	18803	Crecimiento
	<i>Candida krusei</i>	6258	No crecimiento
Galactitol	<i>Cryptococcus laurentii</i>	18803	Crecimiento
	<i>Candida krusei</i>	6258	No crecimiento
Galactosa	<i>Cryptococcus laurentii</i>	18803	Crecimiento
	<i>Candida krusei</i>	6258	No crecimiento
Glucosa	<i>Cryptococcus laurentii</i>	18803	Crecimiento
	<i>Candida krusei</i>	6258	No crecimiento
Inositol	<i>Cryptococcus laurentii</i>	18803	Crecimiento
	<i>Candida krusei</i>	6258	No crecimiento
Lactosa	<i>Cryptococcus laurentii</i>	18803	Crecimiento
	<i>Candida krusei</i>	6258	No crecimiento
Maltosa	<i>Cryptococcus laurentii</i>	18803	Crecimiento
	<i>Candida krusei</i>	6258	No crecimiento
Melibiosa	<i>Cryptococcus laurentii</i>	18803	Crecimiento
	<i>Candida krusei</i>	6258	No crecimiento
Rafinosa	<i>Cryptococcus laurentii</i>	18803	Crecimiento
	<i>Candida krusei</i>	6258	No crecimiento
Trehalosa	<i>Cryptococcus laurentii</i>	18803	Crecimiento
	<i>Candida krusei</i>	6258	No crecimiento
Xilosa	<i>Cryptococcus laurentii</i>	18803	Crecimiento
	<i>Candida krusei</i>	6258	No crecimiento
Levaduras: fermentación de carbohidratos			
Control (sin carbohidratos)	<i>Candida albicans</i>	10231	Negativo, no gas
	<i>Candida krusei</i>	6258	Negativo, no gas
Celobiosa	<i>Candida lusitanae</i>	34449	Positivo, gas
	<i>Candida albicans</i>	10231	Negativo, no gas
Galactosa	<i>Candida kefir</i>	2512	Positivo, gas
	<i>Cryptococcus laurentii</i>	18803	Negativo, no gas
Glucosa	<i>Candida albicans</i>	10231	Positivo, gas
	<i>Cryptococcus laurentii</i>	18803	Negativo, no gas
Lactosa	<i>Candida kefir</i>	2512	Positivo, gas
	<i>Cryptococcus laurentii</i>	18803	Negativo, no gas
Maltosa	<i>Candida albicans</i>	10231	Positivo, gas
	<i>Candida kefir</i>	2512	Negativo, no gas
Sucrosa	<i>Candida kefir</i>	2512	Positivo, gas
	<i>Candida krusei</i>	6258	Negativo, no gas
Trehalosa	<i>Candida tropicalis</i>	13803	Positivo, gas
	<i>Cryptococcus laurentii</i>	18803	Negativo, no gas

Sigue en la página siguiente

Tabla 18.5. Controles de calidad de las pruebas de identificación bioquímica (continuación).

Medio	Organismo control	ATCC	Resultado esperado
Medios comerciales			
Vitek Tarjetas ID-YST®			
	1. <i>Candida tropicalis</i>	201380	Identificación correcta
	2. <i>Candida tropicalis</i>	201381	Identificación correcta
	3. <i>Candida kefyr</i>	4135	Identificación correcta
	4. <i>Candida magnoliae</i>	201379	Identificación correcta
	5. <i>Candida membranaefaciens</i>	201377	Identificación correcta
	6. <i>Candida membranaefaciens</i>	201378	Identificación correcta
	7. <i>Trichosporon mucoide</i>	201382	Identificación correcta
	8. <i>Trichosporon mucoide</i>	201383	Identificación correcta
Realizar con cada nuevo lote			
API ID 32C®			
	1. <i>Candida glabrata</i>	64677	Identificación correcta
	2. <i>Candida guilliermondii</i>	6260	Identificación correcta
	3. <i>Cryptococcus humicola</i>	64676	Identificación correcta
	4. <i>Candida krusei</i>	6258	Identificación correcta
Realizar con cada nuevo lote			
BactiCard Candida®			
	1. <i>Candida albicans</i>	10231	Identificación correcta
	2. <i>Cryptococcus neoformans</i>	32045	Identificación correcta
Realizar con cada nuevo lote			
RapID Yeast Plus System®			
	1. <i>Candida kefyr</i>	2512	Identificación correcta
	2. <i>Candida glabrata</i>	2001	Identificación correcta
Realizar con cada nuevo lote			
MicroScan Rapid Yeast Identification®			
	1. <i>Candida albicans</i>	66027	Identificación correcta
	2. <i>Candida tropicalis</i>	66029	Identificación correcta
	3. <i>Cryptococcus albidus</i>	66030	Identificación correcta
	4. <i>Cryptococcus neoformans</i>	66031	Identificación correcta
	5. <i>Candida glabrata</i>	66032	Identificación correcta
	6. <i>Cryptococcus unigutulatus</i>	66033	Identificación correcta
Realizar con cada nuevo lote			

manuales de procedimientos de los diversos suministradores. En dicho manual se consigna los controles que se deben utilizar, así como los resultados esperados. Estos resultados deben ser recogidos y fechados; también se debe anotar el lote de los reactivos utilizados. Una lista de los controles de calidad y de los resultados esperados se detalla en la [Tabla 18.5](#).

18.9. Técnicas serológicas

Las técnicas serológicas suelen incorporar sus propios controles (positivo y negativo) que hay que utilizar cada vez que se realicen las mismas. También pueden utilizarse sueros propios del laboratorio con titulaciones ya conocidas (Capítulo 14).

18.10. Pruebas de sensibilidad antifúngica

El NCCLS ha elaborado el documento M27-A en el que se recoge el método de referencia para las pruebas de sensibilidad *in vitro* de levaduras por la técnica de dilución en caldo, haciendo una detallada exposición de los procedimientos del control de calidad, su propósito, ejecución y periodicidad (Capítulo 15).

dad (Capítulo 15).

Es necesario comprobar cada nuevo lote de medio para realizar las pruebas de sensibilidad *in vitro* con uno de los controles de calidad listados en la **Tabla 18.6** para determinar si las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) se encuentran dentro del intervalo esperado, de no ser así hay que retirar el lote.

Cada vez que se realizan estas pruebas de sensibilidad el medio debe ser evaluado para comprobar su esterilidad (incubar una porción de medio sin inocular) y viabilidad (incubar medio con inóculo y sin antifúngico) y deberán incluirse los dos controles de calidad. Los resultados de las pruebas no se informarán a no ser que los controles sean correctos.

Todos los resultados deben ser recogidos, informados y fechados en hojas apropiadas.

Tabla 18.6. Intervalos de CMI recomendados para los controles de calidad en técnicas de dilución en caldo.

Organismo	ATCC	Antifúngico	Intervalo de CMI (µg/ml)
<i>Candida parapsilosis</i>	22019	Anfotericina B	0,5 - 4
		Caspofungina	0,5 - 4
		Fluconazol	1 - 4
		Itraconazol	0,12 - 0,5
		Ketoconazol	0,06 - 0,5
		Posaconazol	0,06 - 0,25
		Ravuconazol	0,03 - 0,25
		Voriconazol	0,03 - 0,25
		5-fluorocitosina	0,12 - 0,5
<i>Candida krusei</i>	6258	Anfotericina B	1 - 4
		Caspofungina	0,25 - 1
		Fluconazol	16 - 128
		Itraconazol	0,25 - 1
		Ketoconazol	0,25 - 1
		Posaconazol	0,12 - 1
		Ravuconazol	0,25 - 1
		Voriconazol	0,12 - 1
		5-fluorocitosina	8,0 - 32

Las instrucciones para la realización y evaluación de las pruebas de sensibilidad, en el caso los sistemas comercializados, Sensititre, Etest, etc., se detallan en los manuales que los diferentes fabricantes proporcionan con sus productos.

©2001 Revista Iberoamericana de Micología - ISBN: 84-607-3050-6



Los sistemas comerciales coinciden con el NCCLS en el uso de las mismas cepas como controles de calidad (Tabla 18.6).

externo.

- Los informes se deben guardar al menos dos años en lugares de fácil acceso. Actualmente los soportes informáticos proporcionan una muy buena accesibilidad a gran cantidad de datos almacenados.

18.11. Elaboración de informes

El proceso de identificación de un agente causal de una infección fúngica debe finalizar con un informe elaborado según normas de calidad previamente establecidas entre el Laboratorio y los distintos Servicios peticionarios. Estas normas de calidad deben incluir los siguientes puntos:

- El Servicio y el médico peticionarios deben quedar indicados de una manera clara e inequívoca, así como el diagnóstico de sospecha principal y las características clínicas y evolutivas necesarias para una investigación etiológica precisa.
- Debe habilitarse una forma rápida de informe preliminar para cuando la relevancia del diagnóstico lo requiera. La forma habitual es la telefónica, que nunca debe sustituir al formato en papel posterior. En este informe definitivo debe indicarse que hubo un informe preliminar telefónico, quién lo dio, quién lo recibió y cuándo fue dado.
- Se deben señalar de forma conveniente los resultados inusuales, para que puedan destacar del resto.
- El laboratorio debe suministrar información relativa a los intervalos de valores normales o interpretar los valores encontrados en términos acordados (sensible, resistente...). También, en su caso, debe hacer referencia a las limitaciones de las técnicas, en caso de existir.
- Si una identificación, total o parcial, o una determinación de sensibilidad no se realiza en el propio laboratorio, se debe consignar en el informe definitivo dónde se ha enviado para el diagnóstico final y adjuntar el informe del laboratorio

18.12. Control de calidad externo

Cada laboratorio, independientemente de su propio Control de Calidad, puede también participar en programas de Control de Calidad externos que permiten, mediante análisis de resultados, controlar los métodos analíticos en toda su extensión: procedimientos, instrumental, sistemas, reactivos, etc., que reflejarán la efectividad y niveles de experiencia del mismo. La Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC) ha concebido un Programa de Control de Calidad al servicio de sus socios y de los profesionales de la Microbiología Clínica que se materializa en el envío de muestras, acompañadas de una historia clínica, que deben ser procesadas por cada laboratorio; los resultados se envían para su análisis a los coordinadores del programa para la elaboración de un informe individual de

• Control de Calidad de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.

Dirección Postal:
SEIMC. Programa de Control de Calidad.
C/ Caballero de Gracia 24, 4º Izda.
28013 Madrid

Teléfono: +34 915 233 099
Fax: +34 915 227 505
E-mail: seimc@seimc.org
<http://www.seimc.es>

• Control de Calidad Externa del Laboratorio Central de Salud Pública del Reino Unido.

Dirección Postal:
Quality Assurance Laboratory.
Central Public Health Laboratory
61 Colindale Avenue
London NW9 5HT
UK

Teléfono: +44 020 890 59890
Fax: +44 020 820 51488
E-mail: organiser@ukneqasmic.win-uk.net
<http://www.pcuq.co.uk/~ukneqasm>

cada laboratorio. El programa es estrictamente confidencial y la participación en el mismo supone el abono de una cuota para cubrir los gastos de manufactura y gestión.

A escala internacional, el Laboratorio Central de Salud Pública del Reino Unido en Londres ofrece la posibilidad de realizar Programas de Control de Calidad Externos que evalúan el funcionamiento de los laboratorios que lo soliciten a la luz de estándares internacionales.

18.13. Listado y manejo de las cepas de control de calidad

Las cepas de referencia usadas como controles de calidad deben obtenerse de fuentes fiables, por ejemplo de la American Type Culture Collection (ATCC) o de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT). Existen también otras instituciones y fuentes comerciales fiables que han demostrado su pericia en la conservación y manejo de estas cepas.

Las cepas de referencia deben conservarse de

forma que se minimice al máximo las posibilidades

• Colección Española de Cultivos Tipo (CECT):

Dirección Postal:
Colección Española de Cultivos Tipo
Universidad de Valencia
Edificio de Investigación
Campus de Burjassot
46100 Burjassot - Valencia

Fax: +34 963 983 187
E-mail: CECT@uv.es
<http://www.uv.es/cect>

• American Type Culture Collection (ATCC):

Distribuidor para España:
LGC Deselaers SL
Perú, 104 Nave 3
08018 Barcelona

Teléfono: +34 932 662 731
Fax: +34 933 073 612
E-mail: info@imatra.es
<http://www.atcc.org>

de mutación. Procesos como la congelación a -70°C o la liofilización, correctamente realizados,

Bibliografía recomendada

- Della-Latta P, Vellozzi EM. Instrument maintenance and quality control. En: Isenberg HD (Ed.) Essential procedures for clinical microbiology. Washington D.C., American Society for Microbiology Press, 1998: 693-747.
- Hazen KC. Mycology and aerobic actinomycetes. En: Isenberg HD (Ed.) Essential procedures for clinical microbiology. Washington D.C., American Society for Microbiology Press, 1998: 255-360.
- Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC. El papel del laboratorio de Microbiología en el diagnóstico de Enfermedades Infecciosas: Indicaciones para su práctica y manejo. En: Diagnóstico Microbiológico. Buenos Aires, Panamericana, 1999: 67-119.
- Land GA. Mycology. En: Isenberg HD (Ed.) Clinical Microbiology Procedures Handbook. Washington D.C., American Society for Microbiology Press, 1992: 6.0.1-6.12.4.
- McGinnis MR. Quality control. En Laboratory handbook of Medical mycology. New York, Academic Press, 1980.
- National Committee for Clinical Laboratory Standard. QC assurance for commercially prepared microbiological culture media. Approved Standard. M22-A. Villanova, National Committee for Clinical Laboratory Standard, 1990.
- National Committee for Clinical Laboratory Standard. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; Approved Standard. M27-A. Villanova, National Committee for Clinical Laboratory Standard, 1997.
- Sewell DL. Quality control. En: Isenberg HD (Ed.) Clinical microbiology procedures handbook. Washington D.C., American Society for Microbiology Press, 1992: 13.2.1-13.2.35.

José Sánchez-Payá

19.1. Fundamento

La aspergilosis invasora junto con otras micosis oportunistas constituyen un grupo de infecciones nosocomiales que, independientemente de la alarma social generada en España en los últimos años, poseen una baja incidencia pero originan una elevada morbi-mortalidad. Por lo tanto, cualquier programa de vigilancia, prevención y control de la infección hospitalaria que se precie, debe disponer de un subprograma específico para la prevención de estas infecciones.

Actualmente no existe suficiente evidencia científica que avale la utilización sistemática de pautas de quimioprofilaxis antifúngica en pacientes de alto riesgo, por lo que las estrategias de prevención y control de la aspergilosis nosocomial deben encaminarse a la obtención de unos adecuados niveles de bioseguridad ambiental (BSA) respecto a hongos oportunistas. Entendiendo por BSA aquella situación ambiental con niveles aceptables de contaminación de esporas fúngicas que hace improbable la adquisición de infecciones de transmisión aérea por parte de enfermos susceptibles.

A efectos prácticos y, en función del riesgo que presentan los pacientes que habitualmente son atendidos en las diferentes áreas o servicios hospitalarios, se pueden distinguir tres zonas o áreas bien diferenciadas:

- **Áreas** en las que habitualmente se atiende a pacientes **de alto riesgo**: i) quirófanos donde se realizan intervenciones de alto riesgo: cirugía con prótesis (cardíaca, neuroquirúrgica, traumatológica), trasplante hepático y pulmonar, ii) áreas de hospitalización (con ambiente protector) donde se atiende a pacientes neutropénicos (<1.000 neutrófilos/ mm^3 mantenidos durante dos semanas de duración o <100 neutrófilos/ mm^3 mantenidos durante una semana) y iii) áreas de hospitalización de receptores de células hematopoyéticas o de órgano sólido.
- **Áreas** donde se atiende a pacientes de **riesgo intermedio**: i) quirófanos donde se realizan el resto de intervenciones quirúrgicas y ii) áreas de hospitalización donde se atiende a pacientes críticos (UCI, Reanimación, Unidad de Grandes Quemados).
- **Áreas** donde se atiende a pacientes de **riesgo bajo**: resto de unidades asistenciales.

Aunque esta clasificación es muy útil para valorar el riesgo de los pacientes según su ubicación, cada vez se describen más casos de micosis invasoras en pacientes no incluidos en los grupos anteriores, como los afectados por enfermedad pulmonar obstructiva crónica en tratamiento con corticoides de manera prolongada.

19.2. Recomendaciones para el control de la bioseguridad ambiental

Estas medidas se pueden resumir, básicamente, en: i) mantenimiento correcto de la instalación de climatización, ii) adecuada limpieza de superficies, iii) aislamiento apropiado de las zonas que lo precisen, especialmente ante situaciones de remodelación u obras, y iv) instrucción periódica al personal sobre los métodos de barrera, circulación

Un aspecto importante a la hora de tener en cuenta las recomendaciones existentes en la literatura científica y la posible controversia que existe con respecto alguna de ellas, es el hecho de que estas se basan fundamentalmente en acuerdos entre expertos más que en pruebas obtenidas a partir de estudios controlados dada la dificultad de realización de estos últimos.

en áreas quirúrgicas, etc. [1-8].

19.2.1. Sistemas de ventilación

Si no existen normativas propias de cada hospital sobre las características de los sistemas de climatización en las áreas asistenciales, es aconsejable seguir las recomendaciones establecidas por organismos o instituciones de reconocido prestigio (Tabla 19.1). Además, es importante tener presente los siguientes aspectos relacionados con los sistemas de ventilación:

El funcionamiento de los sistemas de ventilación debe monitorizarse de acuerdo con las especifi-

Tabla 19.1. Características de los sistemas de ventilación en las diferentes áreas de un hospital.

Área	Movimiento del aire	Cambios de aire/ h mínimos	Humedad Relativa (%)	Temperatura (°C)
Quirúrgica y cuidados críticos:				
Quirófano	Fuera	15	30-60	20-23
Paritorio	Fuera	15	30-60	20-23
Despertar	-	6	30-60	21-24
Cuidados intensivos	-	6	30-60	21-24
C. I. neonatales	-	6	30-60	22-26
Endoscopias	Dentro	6	30-60	20-23
Bronoscopias	Dentro	12	30-60	20-23
Urgencias	Dentro	12	-	22-26
Enfermería:				
Habitación	-	6	-	21-24
Habitación con ambiente protector	Fuera	12	-	24
Habitación de aislamiento	Dentro	12	-	24
Servicios Centrales:				
Radiología intervencionista / Hemodinámica	Fuera	15	30-60	21-24
Lab. Bioquímica	Fuera	6	-	24
Lab. Microbiología	Dentro	6	-	24
Sala autopsias	Dentro	12	-	-

Fuente: adaptado de American Society of Heating, Refrigerating, and Air-Conditioning Engineers. 1999 ASHRAE Handbook: Heating, Ventilating, and Air-Conditioning Applications, Chapter 7: Health Care Facilities. Atlanta GA; 1999: 7.1-7.13.

caciones y recomendaciones del fabricante, disponiendo, además de un plan de mantenimiento de los filtros instalados.

La entrada y salida del aire deben estar correctamente colocadas:

- La extracción se situará a más de siete metros de las tomas de aire.
- Las tomas de aire del exterior deben colocarse, aproximadamente, a 180 cm del suelo o a 90 cm sobre el tejado y protegidas para impedir el acceso de pájaros u otros animales a estas estructuras.

La limpieza de las rejillas de los sistemas de ventilación se programará adecuadamente (ej. cada 6 meses en las áreas de riesgo y una vez al año en el resto del hospital).

Siempre que sea necesario, se utilizarán filtros HEPA portátiles teniendo en cuenta una serie de consideraciones antes de su uso:

- Seleccionar aquellos que recirculen todo, o casi todo, el aire y provean más de 12 cambios de aire por hora.
- No reutilizar filtros que han sido previamente utilizados en zonas en obras.
- Situar el filtro de tal manera que filtre todo el aire de la habitación.

El número adecuado de habitaciones con

ambiente protector en cada hospital estará en función de la población atendida por el centro.

Los sistemas de ventilación no se deben detener nunca, excepto para su mantenimiento, reparación, comprobación de reentrada en situaciones de emergencia o nueva construcción.

Consejos sobre el mantenimiento de los sistemas de ventilación

- Si el sistema se tiene que detener por algún motivo, no parar todo el sistema al mismo tiempo.
- Cuando se cambien, los filtros deben ser introducidos de manera inmediata en bolsas para impedir la dispersión de esporas fúngicas.
- Las actividades de mantenimiento y de puesta en marcha de la instalación deben programarse conjuntamente con el personal encargado del control de infecciones.

En las áreas de riesgo (quirófanos y habita-

ciones con ambiente protector) se procurará disponer de sistemas de ventilación alternativos para su puesta en marcha en caso de necesidad.

19.2.2. Áreas quirúrgicas

Sistemas de climatización

- Temperatura: 20-23 °C, humedad relativa: 30-60%.
- Renovaciones de aire: mínimo 15-20/h.
- En caso de recirculación de aire, un 20% debe ser aire exterior.
- La entrada de aire debe situarse en la parte superior y la extracción cerca del suelo.
- Presión diferencial positiva entre quirófano y áreas adyacentes: 210 pascales.
- Aire filtrado mediante prefiltro, filtro de alta eficacia (90%) y filtro absoluto (HEPA) en posición terminal.
- El sistema de ventilación debe estar funcionando de manera continua.

Procedimientos de limpieza

- Realizar dos limpiezas diarias: la primera debe estar finalizada antes del comienzo de la actividad quirúrgica y la segunda tras finalizar la actividad.
- Comenzar a limpiar por el anfiteatro, continuar por el área intermedia y, posteriormente, por el resto de las áreas.
- Utilizar agua limpia para limpiar cada anfiteatro.
- Limpiar las superficies horizontales entre intervenciones; en caso de salpicaduras, también se limpiarán las superficies verticales.
- Limpiar semanalmente los paramentos horizontales altos, la lámpara y la parte exterior de las rejillas. Para ello, se utilizará agua, jabón y lejía estándar (40 g de cloro libre por litro) a una dilución 1:10.
- No utilizar radiación ultravioleta para desinfección del ambiente del quirófano.

Disciplina intraquirófano

- Vestimenta: bata o pijama quirúrgico, calzas o zapato específico de quirófano, gorro y mascarilla.
- Circulación: restricción del número de personas presentes y de los movimientos del personal.

- Estanqueidad: mantener siempre las puertas y las ventanas cerradas (lo ideal es disponer de puertas con cierre hermético y automático).

Verificación

La verificación del funcionamiento de los sistemas de ventilación se realizará mediante:

- Medición de los cambios de aire por hora y de las presiones diferenciales, con una periodicidad mínima mensual.
- Registro diario (monitorización digital) de presión, temperatura y, si es posible, de la presión diferencial.
- Sustitución de los filtros cuando se colmaten o existan anomalías en su funcionamiento.

Controles microbiológicos

Se realizarán si existen incidencias en los sistemas de climatización, humedades, obras anexas, tras la aparición de casos y siempre que se tenga que evaluar las medidas introducidas para el control de infecciones o se realicen cambios en los protocolos para su control.

La realización de controles rutinarios o periódicos es una medida controvertida, pues se parte de la premisa que si hay un adecuado funcionamiento de los sistemas de climatización y limpieza estos carecen de utilidad. Pero, a su vez, no se puede olvidar que son un excelente indicador indirecto para evaluar el adecuado funcionamiento de estos, por lo que se recomienda que su realización se adapte a las circunstancias particulares en cada caso, siendo razonable utilizar ciertas estrategias como la realización de controles con periodicidad máxima mensual en las áreas de riesgo donde no se pueda realizar una monitorización continua del funcionamiento de los sistemas de climatización.

19.2.3. Áreas con ambiente protector

Están constituidas por las habitaciones para receptores de células hematopoyéticas u órganos sólidos y para enfermos inmunodeprimidos.

Funcionamiento de los sistemas de climatización

- Temperatura: 24 °C, humedad relativa: 40-60%.

Metodología de los controles microbiológicos:

- Se recomienda la utilización de métodos volumétricos (Figura 19.1).
- Para emplear adecuadamente el muestreador volumétrico deben seguirse, de manera estricta, las recomendaciones del fabricante.
- El muestreo se realizará tras 2 o 3 h de actividad quirúrgica.
- Debe utilizarse un medio de cultivo selectivo para hongos (ej. agar Rosa de Bengala) .
- Es aconsejable el muestreo de grandes volúmenes de aire (1 m^3) por estancia.
- Situar el muestreador en la parte alta de la estancia, cerca de la entrada del aire acondicionado, de esta forma se puede evaluar la calidad del aire entrante (Figura 19.2).
- Posteriormente, se realiza otra toma de la parte baja de la estancia, aproximadamente a un metro de altura, para evaluar la remoción de esporas de las superficies horizontales y la entrada de estas por puertas y ventanas.
- Las placas se incuban a 37°C . A las 48 h se realiza una lectura inicial y, a los cinco días, la definitiva (Figura 19.3).
- Es aconsejable la identificación de todas las especies aisladas (Capítulo 13).
- El umbral de bioseguridad para hongos oportunistas es de 1 UFC/m^3 .



Figura 19.1. Modelo de muestreador volumétrico.



Figura 19.2. Realización de una muestra ambiental a la salida del sistema de ventilación.

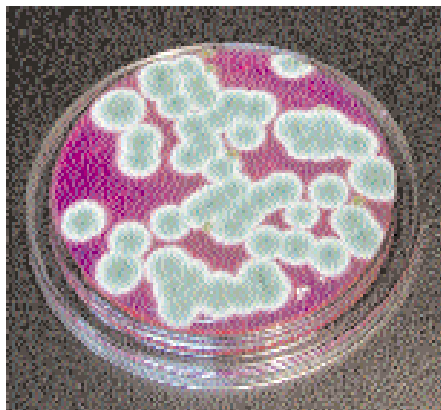


Figura 19.3. Colonias de hongos filamentosos en una placa de control ambiental después de 5 días de incubación.

- Renovaciones de aire: mínimo de 12 renovaciones/h.
- En caso de recirculación de aire, un 20% debe ser aire exterior.
- La entrada de aire debe situarse en la parte superior y la extracción cerca del suelo en la parte opuesta de la habitación.
- Presión diferencial positiva entre habitación y áreas adyacentes: 2,5 pascales, aproximadamente.
- Aire filtrado: prefiltro, filtro de alta eficacia (90%) y filtro absoluto (HEPA) en posición terminal.
- El sistema de ventilación debe estar funcionando de manera continua.

Procedimientos de limpieza

- Realizar dos limpiezas diarias.
- Se debe limpiar de dentro hacia fuera.
- Limpiar semanalmente los paramentos horizontales altos y la parte exterior de las rejillas utilizando agua, jabón y lejía estándar (40 g de cloro libre por litro) a una dilución 1:10.

Otras recomendaciones

- Las habitaciones deben estar selladas adecuadamente (ventanas, cajas de persianas, falsos techos, etc.).
- Las puertas se cerrarán de manera automática.
- Cuando el enfermo abandone la habitación para procedimientos diagnósticos o terapéuticos (tiempo que debe ser reducido al máximo) debe utilizar un equipo de protección respiratoria adecuado, como los respiradores de partículas (P2). No utilizar mascarillas quirúrgicas para tal fin.
- Las medidas a tomar cuando se produzcan incidencias (goteras, interrupciones en los sistemas de climatización, etc.) deben estar protocolizadas. Al igual que cuando se reinicien las actividades en el área después de subsanada la incidencia.

Verificación

El correcto funcionamiento de los sistemas de ventilación debe ser verificado periódicamente:

- Todos los días se monitorizarán los cambios de aire por hora y las presiones diferenciales.
- Cuando los filtros se colmatan, o existan anomalías en su funcionamiento, debe procederse a su sustitución.

Controles microbiológicos

Para su realización se seguirán las mismas indicaciones y metodología que para los quirófanos de alto riesgo.

19.2.4. Áreas de riesgo intermedio

En las áreas quirúrgicas que no sean consideradas de alto riesgo, las medidas recomendadas son similares en lo referente a los procedimientos de limpieza, disciplina intraquirófano y sistemas de ventilación. Para la verificación de estas medidas se aconseja realizar controles microbiológicos específicos para hongos únicamente ante incidencias como

Un consejo...

Como se deduce de todo lo anterior, para lograr un adecuado grado de aplicación de todas las recomendaciones comentadas es necesaria una estrecha colaboración entre los servicios implicados, el servicio de mantenimiento y el personal encargado del control de las infecciones hospitalarias.

las descritas para el área quirúrgica.

Las recomendaciones para las áreas de atención a pacientes críticos son similares a las medidas generales ya comentadas para los sistemas de ventilación, limpieza de superficies horizontales (dos veces al día), limpieza semanal de superficies horizontales altas (techos, baldas, etc.), limpieza de salpicaduras de manera inmediata, sellado de ventanas y, siempre que sea posible, puertas cerradas.

19.3. Obras en el hospital

La realización de obras o reformas estructurales en el hospital es una situación de riesgo que merece ser comentada específicamente; ya que, es un hecho demostrado, el polvo y los escombros que se generan en un proceso de construcción o remodelación pueden ser vehículo de transmisión de microorganismos oportunistas [4,9,10].

Los proyectos de construcción y remodelación de instalaciones hospitalarias suponen un reto muy especial para el personal encargado de la pre-

vención y control de la infección, que deberá participar en todas las fases de las obras para asesorar y asegurarse del cumplimiento adecuado de las medidas de prevención y control de la infección. Los recursos invertidos, antes y durante las obras, en aspectos relacionados con el control de la infección permitirán, tras la finalización del proyecto y su posterior evaluación, el ahorro de tiempo, de recursos, y sobre todo, la disminución de la morbi-mortalidad en los pacientes.

19.3.1. Recomendaciones para el control de la BSA durante el periodo de obras

Para realizar un adecuado control de la BSA durante la realización de obras en el hospital se recomienda adoptar las siguientes medidas:

1. Creación un grupo multidisciplinar para planificar las estrategias de prevención. Estas deben ser referidas tanto a las condiciones del diseño de la zona en reforma, como a las medidas a adoptar durante la ejecución de la obra, así como a las actuaciones a realizar previamente a la apertura de la zona construida o reformada.
Este grupo es el denominado **"Comisión de Obras"** del hospital, el cual asesorará de manera permanente a la Dirección del hospital. Para su constitución se recomienda la siguiente composición:
 - i) miembros ejecutivos (gerencia, dirección médica, dirección enfermería, dirección de gestión),
 - ii) miembros técnicos (responsable de Control de Infecciones, responsable de Mantenimiento),
 - iii) otros asesores (responsables de la Comisión de Infecciones y responsable Médico y de Enfermería del área afectada),
 - iv) dirección facultativa de la obra (director de obra)
 - v) empresa constructora (delegado de obra).
2. Previamente a la realización de una obra, se evaluará el impacto potencial, en los pacientes inmunodeprimidos, de la exposición a ambientes con altas concentraciones de esporas fúngicas.
3. Se realizarán actividades de concienciación y formación del personal encargado de realizar las obras, así como del personal sanitario encargado de atender a los pacientes inmunodeprimidos en las zonas implicadas, acerca del riesgo de infección derivados de las obras y de las medidas de prevención a poner en marcha.
4. Antes de la ejecución de la obra debe exigirse a las empresas contratistas el cumplimiento de las medidas de control de BSA; para ello, se incluirán en el pliego de condiciones técnicas la obligatoriedad de cumplir estas normas, incluyendo

las potenciales penalizaciones si no se desarrollan las medidas acordadas.

5. Se pondrá en marcha un sistema de vigilancia epidemiológica de búsqueda activa de nuevos casos de infecciones fúngicas mediante la vigilancia clínica de infecciones de transmisión aérea en pacientes inmunodeprimidos, los resultados de microbiología así como de los estudios histológicos y/o postmortem.
6. Se verificará, de manera programada, el adecuado funcionamiento de los sistemas de ventilación (filtración y presiones diferenciales, fundamentalmente). Este control se puede facilitar cumplimentando tres tipos de hojas de verificación: 1) previa, para verificar si se han tomado las medidas recomendadas, 2) de seguimiento, para verificar la aplicación continua de estas y 3) de finalización, para verificar si la zona cumple todos los requerimientos recomendados.

19.3.2. Medidas para el control de infecciones durante la realización de obras

Antes, durante y después de la realización de las obras en el hospital, se deben implementar las medidas de control de infecciones:

Antes del comienzo de la obra

Se debe planificar la misma, delimitar el área de actuación con las zonas de riesgo anexas, conocer las instalaciones del área, valorar su potencial repercusión en áreas contiguas de riesgo y definir la necesidad de las medidas de barrera a utilizar. Algunas consideraciones previas a tener en cuenta son las siguientes:

1. Las áreas del hospital se pueden clasificar, en función del riesgo potencial, en: zonas críticas, zonas contiguas a las críticas y zonas del edificio no incluidas en los criterios anteriores.
2. A su vez, las obras se pueden clasificar atendiendo a dos criterios fundamentales: el hecho que las motiva, que permite diferenciar entre obras programadas y accidentales; y el objeto de la obra, distinguiéndose entre planes directores, obras de reparación simple, obras de conservación y obras de demolición.
3. Los principales aspectos a considerar previamente a establecer las medidas a adoptar dependerán del emplazamiento de la obra, la actividad asistencial de la zona, la magnitud de la obra y el tiempo de ejecución.
4. Las obras en zonas críticas, salvo en los bloques quirúrgicos, no son compatibles con la actividad asistencial que se presta en ellas, por lo que debe

- producirse su cese o estudiarse otras alternativas.
5. Para las actuaciones en los bloques quirúrgicos se debe tener en cuenta la tipología de los mismos: i) bloque quirúrgico en una sola planta (habrá que planificar la obra, no dando comienzo a esta sin programar la totalidad de los trabajos, desde el inicio hasta su finalización), ii) bloque quirúrgico en varias plantas (las obras deben realizarse por plantas completas).
 6. Las obras en zonas contiguas a las críticas son las que quizá deban tratarse con mayor rigor, por ser las más proclives a producir contaminaciones por hongos oportunistas. Habrá que valorar la reubicación de pacientes inmunodeprimidos hospitalizados en habitaciones contiguas a las zonas en obras.

Actuaciones durante la ejecución

Irán encaminadas a:

1. Procurar la estanqueidad total respecto a los locales de riesgo (con materiales impermeables a las esporas fúngicas).
2. Crear una presión negativa en el área de trabajo y monitorizarla mediante manómetro o, en su defecto, realizar una prueba de humo para la comprobación periódica de su adecuado funcionamiento.
3. Humidificación de las fuentes de polvo.
4. Establecer circulaciones específicas.
5. Colocación de alfombras desinfectantes en la entrada de la zona en construcción.
6. Incrementar las medidas de limpieza en la zona

7. Evitar dañar las conducciones subterráneas de agua, pues la contaminación con polvo del agua y su posterior aerosolización puede causar legionelosis en los pacientes inmunodeprimidos.
8. En las demoliciones debe procurarse que los medios y sistemas de ejecución limiten la producción de polvo. Para ello se realizarán labores de humectación durante los derribos y manejo de escombros. Además, se asegurará hacia el exterior la estanqueidad del edificio donde estén las áreas críticas (sellados de ventanas y de tomas de aire exterior).

Al finalizar la obra

El área debe ser limpiada y aspirada antes y después de retirada de barrera de aislamiento, se verificará el funcionamiento de los sistemas de ventilación y se valorará la realización de un control microbiológico. La verificación tras la finalización de la obra habrá que adecuarla en función de las características y desarrollo de la misma. Antes de la retirada de las barreras rígidas, debe protegerse la zona con cortinas impermeables o plásticos.

Controles microbiológicos ambientales

Aunque existe una importante controversia sobre la necesidad de realizar cultivos microbiológicos de muestras de aire de manera rutinaria antes, durante o después de las obras, los cultivos ambientales están claramente indicados en las siguientes situaciones o circunstancias:

Medidas a adoptar ante la aparición de casos de aspergilosis nosocomial durante o después de unas obras:

- Comprobar que las presiones diferenciales, la filtración y el estado de las medidas de barrera de la zona en obras y de las áreas para pacientes inmunodeprimidos son adecuadas. Ante la identificación de problemas, estos deben ser inmediatamente corregidos.
- Realizar una búsqueda activa de casos de manera prospectiva y retrospectiva.
- Tomar muestras ambientales de las áreas implicadas como potenciales fuentes de infección según la investigación epidemiológica.
- Cuando sea posible, realizar el tipado molecular de las cepas de *Aspergillus* aisladas en los pacientes y en el ambiente.
- Cuando no sea posible un adecuado funcionamiento de los sistemas de ventilación de las áreas de hospitalización de pacientes inmunodeprimidos, considerar la instalación temporal de sistemas de filtros HEPA hasta que los problemas puedan ser solucionados.

de trabajo y su entrada.

- i) cuando se evidencia la aparición continua de

casos de aspergilosis invasora u otras infecciones fúngicas oportunistas durante la realización de obras,

- ii) para evaluar a corto plazo la calidad de las medidas de control de infecciones introducidas o los cambios en los protocolos de control de infecciones.

Cuando se realicen los controles microbiológicos, deben seguirse las recomendaciones comentadas anteriormente.

técnicas importantes para realizar las mediciones, que los equipos necesarios tienen un alto coste, etc.; sin embargo, los parámetros básicos que se necesitan son relativamente fáciles de medir y el equipo necesario es mínimo. Además, en las nuevas instalaciones estas cuestiones se pueden monitorizar de manera continua.

La posibilidad de una doble instalación en algunas áreas (quirófanos y habitaciones con ambiente protector) sería una cuestión a plantear cuando se diseñen nuevas instalaciones.

19.4. Dificultades y consejos prácticos

19.4.1. En la aplicación de las medidas

Cuando se realice la propuesta de diseño de la estructura y de las instalaciones, ya sea en los planes directores o en las remodelaciones importantes programadas (construcción de un nuevo bloque quirúrgico, de una unidad de trasplante de órganos sólidos o de células hematopoyéticas, de una unidad de críticos, etc), deben revisarse todos los detalles con la máxima exhaustividad posible y ser “inflexibles” en las recomendaciones de mínimos que se establezcan. Ya que existe una serie de intereses (por parte de la dirección facultativa de la obra, empresa constructora, subcontratas de la empresa constructora, empresa de control de calidad de la obra, servicios de infraestructuras de la Consejería de Sanidad, etc.) que convierten una discusión técnica para decidir el mejor abordaje para proteger la salud de los pacientes en una cuestión exclusivamente económica.

La recomendación que se hace de la formación/concienciación del personal de las Unidades con enfermos susceptibles y del personal encargado de realizar obras es básica. Con poco esfuerzo (realización de unas sesiones o talleres donde se explican conceptos básicos sobre la cadena epidemiológica de la infección y las medidas a tomar) se tiene una repercusión muy importante en la aplicación posterior de las medidas.

Se debe tener un interlocutor de confianza (ingeniero-técnico o ingeniero superior) en el Servicio de mantenimiento del hospital que permita una colaboración estrecha con él.

Cuando se solicitan informes sobre presiones diferenciales, cambios de aire por hora, temperaturas, etc., se puede argumentar que hay dificultades

19.4.2. En la verificación del grado de aplicación de las medidas

Aunque las últimas recomendaciones de los CDC no establecen diferencias entre los quirófanos y ofrecen las mismas recomendaciones para todos ellos, se podría plantear clasificarlos en dos grandes grupos según el tipo de procedimientos quirúrgicos a realizar: de riesgo (donde más frecuentemente se han descrito infecciones fúngicas de localización quirúrgica: cirugía cardíaca, trasplantes y neurocirugía) y sin riesgo (el resto de procedimientos).

La clave de las estrategias de prevención y control pasan por un adecuado funcionamiento de los sistemas de ventilación; por lo tanto, cuanto mejor monitorizados se tengan estos aspectos (presión diferencial, cambios de aire por hora y funcionamiento adecuado de los filtros, fundamentalmente) a ser posible de manera continua, mejor será la capacidad de maniobra para corregir los problemas que se presenten y, por tanto, mayor será la eficacia en el control de infecciones.

19.4.3. En los controles microbiológicos

El número de UFC/m³ de aire considerado anómalo es un tema muy controvertido. Es evidente que en áreas protegidas (filtros HEPA, más 12 c/h, presión positiva, adecuada estanqueidad de la estancia y adecuados procedimientos de limpieza) los controles deben ser negativos o como mucho 1-2 UFC/m³, estas cifras son indicadoras de un adecuado grado de aplicabilidad de las recomendaciones sobre BSA. Por el contrario, si en estas áreas se detectan 3-5 UFC/m³, el grado de aplicabilidad de las recomendaciones no es el adecuado por lo que debe plantearse el cese de la actividad asistencial en el área. En la mayoría de las ocasiones, estos problemas se resuelven corrigiendo los parámetros de

ventilación, si estuviesen alterados, limpiando las superficies y la porción terminal del conducto del aire acondicionado o cambiando los filtros.

mente es la de continuar o no con la actividad, por ejemplo quirúrgica, tras la detección de unos niveles anómalos. Antes de adoptar una decisión al respec-

Otra cuestión que se plantea muy frecuente-

Tabla 19.2. Actitud ante una situación de ausencia de bioseguridad en área quirúrgica.

Criterio (*)	Causa	Solución	Responsable
Crecimiento fúngico por encima del umbral de bioseguridad en las muestras a la entrada de aire	Sistema de ventilación	Cambio o ajuste de los filtros (intermedios y/o HEPA) Limpieza de rejillas tras su retirada	S. de Mantenimiento S. de Limpieza
Crecimiento fúngico por encima del umbral de bioseguridad en las muestras del entorno del paciente	Remoción de esporas fúngicas desde las superficies horizontales	Limpieza usando agua + jabón + lejía (1 parte de lejía por cada 9 de agua jabonosa).	S. de Limpieza
	Entrada desde el exterior por defectos en la estanqueidad	Cierre correcto de puertas y ventanas Disciplina intraquirófano	Personal Servicios médicos y quirúrgicos
<p>(*) Ambas situaciones no son excluyentes. En situación de no bioseguridad:</p> <ul style="list-style-type: none"> En los quirófanos de alto riesgo: <ul style="list-style-type: none"> Se mantiene actividad quirúrgica, excepto la cirugía con prótesis o implantes y trasplantes que se suspende. En los quirófanos de atención estándar (algunos autores establecen niveles tolerables hasta 10 UFC/m³): <ul style="list-style-type: none"> Se mantiene actividad quirúrgica, excepto la cirugía con prótesis o implantes que se suspende. <p>En ambos casos se realizará nueva verificación de la bioseguridad tras la aplicación de las medidas de mejora. Si a las 48 h el control microbiológico indica bioseguridad, se reanuda toda la actividad quirúrgica. El circuito de información recomendado es: el servicio de Microbiología remite el resultado al Servicio de Medicina Preventiva. Este servicio valora el resultado y propone medidas y acciones a la Dirección del hospital, al Jefe de Servicio y a la Supervisión del quirófano correspondiente. Se informará periódicamente a la Comisión de Infecciones.</p>			

Tabla 19.3. Actitud ante una situación de ausencia de bioseguridad en área de hospitalización.

Criterio (*)	Causa	Solución	Responsable
Crecimiento fúngico por encima del umbral de bioseguridad en las muestras a la entrada de aire	Sistema de ventilación	Cambio o ajuste de los filtros (intermedios y/o HEPA) Limpieza de rejillas tras su retirada	S. de Mantenimiento S. de Limpieza
Crecimiento fúngico por encima del umbral de bioseguridad en las muestras del entorno del paciente	Remoción de esporas fúngicas desde las superficies horizontales	Limpieza usando agua + jabón + lejía (1 parte de lejía por cada 9 de agua jabonosa).	S. de Limpieza
	Entrada desde el exterior por defectos en la estanqueidad	Cierre correcto de puertas y ventanas Disciplina del personal sanitario y visitantes	Personal sanitario Personal sanitario y visitantes
<p>(*) Ambas situaciones no son excluyentes. Como norma general, no se debe clausurar el área, sino realizar las propuestas de mejora de forma inmediata. El paciente se trasladará a una habitación del área acondicionada previamente. El circuito de información recomendado es el siguiente: el Servicio de Microbiología remite el resultado al Servicio de Medicina Preventiva. Este Servicio valora el resultado y propone medidas y acciones a la Dirección del hospital, al Jefe de Servicio y a la Supervisión. Se informará periódicamente a la Comisión de Infecciones.</p>			

to, debe revisarse cómo se ha realizado la toma de la muestra, después se debe valorar la susceptibilidad de los pacientes y, por último, se aplicarán las medidas correctoras oportunas. En contadas ocasiones tendrá que suspenderse la actividad programada. Para orientar la toma de decisiones revisar las Tablas 19.2 y 19.3.

En el caso de realizar controles microbiológicos de rutina en quirófanos de riesgo, se recomienda hacerlos los miércoles, para tener la primera lectura, a las 48 h, el viernes siguiente. En el caso que sean anómalos, se deben tomar medidas correctoras ese mismo día o el sábado por la mañana y evaluar la eficacia de éstas con nuevos controles (que se leerán el lunes a primera hora).

Comentario final

Referencias

1. Prevention and control of nosocomial pulmonary aspergillosis. In CDC Guidelines for prevention of nosocomial pneumonia, 1994. MMWR 1997; 46(Nº RR-1): 58-62.
2. Grupo de trabajo de la Sociedad Española de Medicina Preventiva, Salud Pública e Higiene y el INSALUD (Orden alfabético: Arribas JL, Fernández JM, Fernández J, García J, García B, Pastor V, Rodríguez P, Sáinz A, Sánchez J). Recomendaciones para la verificación de la bioseguridad ambiental (BSA) respecto a hongos oportunistas. Medicina Preventiva 1999; V-1:15-20.
3. Thio CL, Smith D, Merz WG, *et al.* Refinements of environmental assessment during an outbreak investigation of invasive aspergillosis in a leukemia and bone marrow transplant unit. Infect Control Hosp Epidemiol 2000; 21:10-23.
4. Centers for Disease Control and Prevention. Draft guideline for environmental infection control in healthcare facilities, 2001. Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC). <http://www.cdc.gov/ncidod/hip>
5. Noskin GA, Peterson LR. Engineering infection control through facility design. Emerg Infect Dis 2001;7:354-357.
6. Centers for Disease Control and Prevention. CDC/IDSA/ASBMT guidelines for the prevention of opportunistic infections in hematopoietic stem cell transplant recipients. MMWR 2000; 49(RR-10):1-66.
7. Manuel RJ, Kibbler CC. The epidemiology and prevention of invasive aspergillosis. J Hosp Infect 1998; 39: 95-109.
8. Streifel AJ. Air cultures of fungi. Epidemiology and infection control microbiology. In: Isenberg HD (Ed.) Clinical microbiology procedures handbook. Washington D.C., American Society for Microbiology Press, 1992: 11.8.1.
9. Grupo de trabajo de la Sociedad Española de Medicina Preventiva, Salud Pública e Higiene y el INSALUD (Orden alfabético: Arribas JL, Cruzet F, Fernández JM, Fernández J, García J, García B, Pastor V, Rodríguez P, Sáinz A, Sánchez J, Sanz C). Recomendaciones para la vigilancia, prevención y control de infecciones en hospitales en obras. Madrid, Insalud, 2000.
10. Cheryl DC, Barr BA. Infection control issues in construction and renovation. Infect Contrl Hosp Epidemiol 1997; 18: 587-596.

A pesar de las grandes lagunas de conocimiento sobre algunos aspectos, como pueden ser las medidas a adoptar en un determinado momento para realizar un adecuado control de la BSA frente a hongos (ej. definir las áreas que deben disponer de filtros HEPA) o la realización de algunas actuaciones para verificar el adecuado grado de aplicación de las medidas (ej. la realización rutinaria de controles

Agradecimientos.

A la Sección de Micología Médica de la Asociación Española de Micología por invitarme a colaborar en sus foros de discusión científica.

A los profesionales de los grupos de trabajo de la Sociedad Española de Medicina Preventiva, Salud Pública e Higiene y el INSALUD que han elaborado los documentos: Recomendaciones para la Verificación de la Bioseguridad Ambiental (BSA) respecto a Hongos Oportunistas y Recomendaciones para la Vigilancia, Prevención y Control de Infecciones en Hospitales en Obras.

ambientales y su periodicidad), existen evidencias suficientes como para estructurar y poner en marcha

una serie de medidas para la prevención de las aspergilosis u otras infecciones fúngicas por hongos oportunistas en determinados pacientes o situaciones de riesgo.