

**CURSO TEÓRICO – PRÁCTICO**  
**EL LABORATORIO Y EL**  
**DIAGNÓSTICO DE LAS MICOSIS**  
**SISTÉMICAS**



*Diagnóstico de Micosis Sistémicas  
Departamento Micología  
INEI. ANLIS "Carlos G. Malbrán"*



**Ministerio de Salud**

Secretaría de Políticas, Regulación e Institutos

ADMINISTRACION NACIONAL  
DE LABORATORIOS E INSTITUTOS DE SALUD  
"DR. CARLOS G. MALBRAN"



## EL LABORATORIO Y EL DIAGNÓSTICO DE LAS MICOSIS SISTEMICAS

### AUTORES

**Cristina E. Canteros**

Jefe Servicio Micosis Profundas. Departamento Micología. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas. ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán"

**Graciela O. Davel**

Jefe Departamento Micología. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas. ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán"

**Iris Nora Tiraboschi**

Laboratorio de Micología  
Hospital General de Clínicas "Gral. San Martín"

**Susana Córdoba**

Departamento Micología. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas. ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán"

### AGRADECIMIENTOS

Agradecemos los aportes y actualizaciones realizados por las Bioquímicas Belén Ibarra-Camou y Alejandra Hevia.

Agradecemos la colaboración de todos los técnicos del Departamento Micología por la incalculable ayuda en la preparación de todo el material incluido en esta guía.



INDICE	Página
Generalidades	1
Clasificación de las micosis profundas	3
Breve descripción de las micosis sistémicas endémicas	5
Breve descripción de las micosis sistémicas oportunistas	11
El laboratorio de micología. Medidas de bioseguridad	22
Protocolo unificado para la derivación de muestras y cepas	25
Diagnóstico de las micosis	26
El examen micológico	27
Elección, recolección, transporte y conservación de muestras	34
Procesamiento de especímenes clínicos para examen microscópico directo y cultivo	38
Características de los agentes de micosis sistémicas al examen microscópico directo	44
Identificación de cepas	49
Características macroscópicas y microscópicas de los cultivos de hongos dimórficos	53
Características macroscópicas y microscópicas de los cultivos de hongos monomórficos	56
Características de las levaduras aisladas frecuentemente	62
Interpretación de los resultados	64
Inmunodiagnóstico de las micosis sistémicas. Contrainmunolectroforesis e inmunodifusión	68
Búsqueda de antígenos circulantes. Detección de antígenos del complejo <i>Cryptococcus neoformans</i>	75
Pruebas de sensibilidad a los antifúngicos	78
Procedimientos de laboratorio	89
<b>ANEXO: Esquemas y cuadros utilizados para el diagnóstico de las micosis sistémicas</b>	
Identificación de los principales agentes patógenos primarios oportunistas	103
Identificación de hongos dimórficos agentes de micosis sistémicas	104
Identificación de Mucorales	105
Características fisiológicas de las principales levaduras asociadas al hombre	106
Glosario	108



## GENERALIDADES

Los hongos fueron reconocidos como agentes causales de enfermedad antes que las bacterias; sin embargo, sólo unas pocas especies parecen depender de los tejidos animales para su crecimiento y sólo algunos son parásitos obligados del hombre. Para la mayor parte de las especies fúngicas patógenas, la infección en el hombre es sólo un incidente casual, sin importancia ecológica.

Los hongos son microorganismos eucariotas carentes de clorofila y, como tales, la mayoría se encuentran en la naturaleza como saprófitos, viviendo sobre materia orgánica muerta. De las miles de especies conocidas de mohos (hongos filamentosos) y levaduras (hongos unicelulares) sólo unas pocas, aproximadamente cien, son capaces de encontrar las condiciones óptimas para crecer en el cuerpo humano y causar una enfermedad infecciosa; sin embargo, estos hongos se encuentran normalmente en el suelo, sobre animales o vegetales o asociados a ellos y no forman parte de la flora humana normal. Las excepciones son *Candida albicans* que se encuentra en la mucosa orofaríngea y gastrointestinal de la mayoría de los individuos, y otras especies de *Candida* y *Malassezia* que generalmente forman parte de la flora normal de la piel.

Los hongos capaces de invadir los tejidos humanos pueden ser patógenos primarios u oportunistas. Los **patógenos primarios** son aquellos capaces de producir infecciones específicas en individuos sanos, con características clínicas determinadas que pueden ser reconocidas por el médico y están descritas en los libros de micología médica.

Los hongos oportunistas sólo pueden invadir los tejidos de los individuos con alteraciones de la inmunidad ya sea por enfermedades inmunosupresoras, causas naturales o iatrogénicas, u otras enfermedades crónicas o preexistentes como la tuberculosis (TBC).

La mayoría de los patógenos primarios para el hombre son capaces de invadir la piel y sus faneras (pelos y uñas) o tejido subcutáneo, pero muy pocos pueden parasitar tejidos más profundos que la dermis, causando infecciones sistémicas graves, muchas veces fatales.

Es conveniente recordar que se entiende por **micosis** a toda enfermedad producida por la **invasión fúngica**. El hongo debe estar parasitando a otro organismo (en nuestro caso al hombre) y provocarle algún daño para poder hablar de infección o enfermedad fúngica. De tal manera, una intoxicación alimentaria debida a la acción de una toxina fúngica no es una micosis, como tampoco lo son los envenenamientos agudos o crónicos resultantes de la ingesta de hongos (**micetismo**).

Las enfermedades fúngicas pueden estar confinadas a áreas geográficas específicas (**micosis endémicas**) o

tener distribución mundial; estar limitadas a ciertas poblaciones, relacionadas a determinada edad, sexo, raza, ocupación y condiciones físicas generales. En las últimas décadas se vio un incremento marcado de las micosis superficiales y profundas, especialmente de las oportunistas, relativamente infrecuentes hasta no hace mucho tiempo. Entre los factores que favorecen las infecciones fúngicas cabe mencionar: la asistencia a gimnasios o piletas de natación con duchas de uso común, el aumento de la expectativa de vida de personas sanas y de pacientes afectados por enfermedades hematológica e inmunológica, tratamientos con esteroides, con drogas inmunosupresoras y citostáticos, los tratamientos prolongados con antibióticos que reducen la flora bacteriana normal, los trasplantes de órganos sólidos, las diálisis y otros métodos invasivos (sondas y catéteres), la adicción a drogas inyectables y la infección por VIH.

Las micosis se pueden clasificar de diferentes formas dependiendo del punto de vista que se considere:

- Según el agente etiológico: aspergilosis, histoplasmosis, candidiasis, etc.
- Según su localización: otomicosis (oído), onicomycosis (uñas), etc.
- Según el tejido que invaden y la profundidad en que lo hacen: micosis superficiales y micosis profundas, estas últimas a su vez se subdividen en subcutáneas o localizadas y sistémicas.
- Según el tipo de agente y hospedador involucrado: clásicas u oportunistas.

Estas dos últimas clasificaciones tomadas en conjunto son las más aceptadas y prácticas para encarar el estudio de estas infecciones por lo que las tomaremos como referencia de ahora en adelante.

Las micosis superficiales, ampliamente distribuidas en el mundo, son afecciones producidas por el parasitismo fúngico en las estructuras córneas de la piel y sus faneras (pelos y uñas). Se adquieren por contacto directo o indirecto con animales o personas infectadas, por lo que pueden causar epidemias, pero también pueden contagiarse del suelo. Son causadas por hongos queratinofílicos que normalmente no pueden penetrar tejidos más profundos que la dermis, algunos son parásitos absolutos y son en su mayoría hongos miceliales monomorfos. Tienen buen pronóstico ya que producen lesiones poco inflamatorias, benignas que curan espontáneamente o con medicación específica y no dejan inmunidad. Además, dentro de las micosis superficiales, deben considerarse a las ocasionadas por levaduras de los géneros *Candida* y *Malassezia*.



Las micosis profundas subcutáneas se producen en las capas profundas de la piel (la dermis) extendiéndose dentro de los músculos (a veces llegan a tejido óseo) y pueden involucrar al sistema linfático. Son causadas por la inoculación o implantación traumática de suelo o vegetales contaminados con hongos dentro del tejido del hospedador.

Las micosis sistémicas endémicas en su mayoría se inician por inhalación accidental de esporas del hongo que, transportadas por el viento, llegan a los pulmones; desde allí pueden diseminarse por vía linfática o hematógena a todos los órganos del cuerpo y provocar la muerte del hospedador. Estas infecciones pueden no ser reconocidas hasta que se manifiesten en áreas extrapulmonares tales como piel, mucosas o sistema nervioso central (SNC). Estas micosis son endémicas, y no se contagian por contacto interhumano. Son producidas por hongos cuyo hábitat natural es el suelo y los vegetales y parasitan accidentalmente al hombre. Estos hongos son dimorfos, es decir que poseen una morfología característica en el tejido del hospedador y en cultivo a 37 °C; mientras que en la naturaleza o en cultivo a 24-28 °C desarrollan micelio. Tienen mal pronóstico ya que producen lesiones inflamatorias granulomatosas y destructivas, que frecuentemente conducen a la muerte si el paciente no recibe tratamiento.

El importante problema sanitario mundial que representan actualmente las micosis, requiere que todos los centros de salud y los laboratorios de diagnóstico microbiológico de cierta importancia cuenten con personal capacitado capaz de diagnosticar una patología de este tipo. La falta de diagnóstico de una micosis profunda o la demora del mismo puede llevar al paciente a sufrir daños irreversibles o a la muerte.

Las **micosis sistémicas clásicas** son causadas por hongos patógenos primarios, entre los que se encuentra *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides* spp., *Paracoccidioides brasiliensis*, complejo *Cryptococcus neoformans* y *Blastomyces dermatitidis* (este último no existe en nuestro país).

Estas se inician por la inhalación de esporas del ambiente, afectando el sistema respiratorio, por lo que en general se requiere para su diagnóstico el estudio de muestras representativas de las vías respiratorias. La muestra más frecuente es el esputo, debido a la facilidad en su obtención respecto a los métodos requeridos para obtener otras muestras de secreciones pulmonares (aspiración transtraqueal, aspiración transtorácica, lavado bronquial, bronquioalveolar o biopsias). El esputo cuidadosamente recogido puede ser adecuado para estudio micológico.

Casi siempre la forma pulmonar primaria pasa desapercibida y la enfermedad se disemina por vía

hematógena o linfática localizándose en otras zonas corporales, siendo necesario examinar muestras de líquidos corporales o tejidos provenientes de ellas.

Las **micosis sistémicas oportunistas**, cada vez mas frecuentes, son causadas por hongos saprófitos o comensales en pacientes debilitados o inmunosuprimidos, los más frecuentes son las levaduras, especialmente las del Género *Candida*, Complejo *Cryptococcus neoformans*, *Trichosporon* spp.; y hongos miceliales como *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus* spp., *Zygomycetes* (en particular *Mucor* sp. y *Rhizopus* sp.), *Pseudoallescheria* (*Petrilium*) *boydii* y *Fusarium* sp., además de los patógenos primarios.

En **pacientes con SIDA** son muy frecuentes las infecciones por *Candida* spp. en la boca (75-90%) y esófago (10-35%). En cambio en piel, uñas, pulmón, meninges, peritoneo y otras vísceras ocurren ocasionalmente. La candidemia en estos pacientes es muy rara. La criptococosis afecta entre al 5-20% de estos pacientes, en Argentina su frecuencia de aparición es de aproximadamente 20%. La forma más común es la meningo-encefalitis y suelen verse lesiones cutáneas. El criptococoma, (lesión focal del SNC) en cambio es raro en pacientes con esta patología de base. Aunque el hongo ingresa por el tracto respiratorio, esta etapa generalmente es asintomática tal como ocurre en el resto de los pacientes con criptococosis. Por último las infecciones provocadas por bacterias filamentosas pertenecientes a los géneros *Nocardia* pueden dar formas pulmonares, linfáticas o nódulos subcutáneos, siendo su principal diseminación hacia sistema nervioso central (SNC).



## CLASIFICACIÓN DE LAS MICOSIS PROFUNDAS

### A- MICOSIS SUBCUTÁNEAS

Los principales agentes son: *Sporothrix schenckii*, *Loboa lobo* y los agentes de cromomicosis y micetomas.

Estos hongos penetran a través de la piel por inoculación traumática dando infecciones localizadas del tejido subcutáneo que se manifiestan por pápulas, nódulos, abscesos abiertos o cerrados, ulceraciones, costras y cicatrices. No curan espontáneamente, si se las deja evolucionar sin tratamiento no causan la muerte del hospedador. Se localizan en las zonas periféricas del cuerpo donde la temperatura corporal es menor.

### B- MICOSIS SISTÉMICAS ENDÉMICAS

Los agentes son: *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides* spp., *Paracoccidioides brasiliensis* y *Blastomyces dermatitidis*. Estos hongos provocan una primoinfección pulmonar que sólo desarrolla enfermedad progresiva en un porcentaje muy bajo de los enfermos.

La enfermedad progresiva se manifiesta por lesiones inflamatorias, granulomatosas y destructivas que localizan en pulmón diseminándose generalmente por vía linfática o hematogena a otros órganos del

cuerpo y frecuentemente provocan la muerte del paciente de no mediar tratamiento.

### C- MICOSIS SISTÉMICAS OPORTUNISTAS

Los principales agentes son: *Candida albicans* y otras especies de levaduras, Complejo *Cryptococcus neoformans*, *Pneumocystis jirovecii*, *Nocardia asteroides* (bacteria filamentosa) y otras especies de *Nocardia*, hongos miceliales hialinos (hialohifomicetes) y de micelio coloreado (feohifomicetes)

Las micosis **endógenas** son aquellas en que el agente causal reside normalmente en piel o tracto digestivo del hombre (comensal) y de allí invade el resto del organismo. Esto ocurre cuando se produce la ruptura de la integridad del revestimiento cutáneomucoso del hospedador o disminuye la resistencia local y/o general permitiendo el ingreso a circulación, el principal agente que utiliza este mecanismo es *C. albicans*.

Las micosis **exógenas** son aquellas en que el agente causal reside en el medio ambiente y además de una puerta de entrada generalmente respiratoria, necesita de una disminución de las defensas del hospedador. Los principales agentes son *Aspergillus fumigatus* y otras especies de *Aspergillus*.

En los cuadros siguientes se esquematizan las entidades clínicas causadas por los agentes de micosis sistémicas, la puerta de entrada y localización.

Tipo de micosis	Vía de infección	Localización más frecuente	Agente causal
<b>CROMOMICOSIS</b>	Inoculación o implantación traumática del hongo en el tejido del hospedador 	Superficie de la piel, generalmente de las extremidades inferiores	<i>Fonsecaea pedrosoi</i> , <i>F. compactum</i> , <i>Phialophora verrucosa</i> , <i>Cladophialophora bantiana</i> , <i>Exophiala (Wangiella) dermatitidis</i> .
<b>MADUROMICETOMA</b>		Superficie de la piel, generalmente de las extremidades inferiores	<i>Madurella mycetomi</i> , <i>M. grisea</i> , <i>Pseudoallescheria (Petriellidium) boydii</i> , <i>Exophiala jeanselmei</i> , <i>E. dermatitidis</i> , <i>Acremonium</i> sp. y otros hongos del suelo.
<b>ACTINOMICETOMA</b>			<i>Nocardia asteroides</i> , <i>N. brasiliensis</i> , <i>Streptomyces somaliensis</i> , <i>S. pelletierii</i> , <i>Streptomyces paraguayensis</i> , <i>Actinomadura madurae</i> .
<b>ESPOROTRICOSIS</b>		Piel de manos, brazos y piernas	<i>Sporothrix schenckii</i>
<b>QUISTES FEOMICOTICOS</b>		Piel lisa	<i>Exophiala (Phialophora) jeanselmei</i> , <i>Exophiala spinifera</i> , <i>Phialophora parasitica</i> , <i>Phialophora repens</i> , <i>Phialophora richardsiae</i> , <i>Phoma</i> spp.
<b>LOBOMICOSIS</b>		Mucosa nasal, piel lisa	<i>Loboa lobo</i>
<b>ENTOMOSTOROMICOSIS</b>		Piel lisa, tejido nasal y cara	<i>Basidiobolus</i> spp. <i>Conidiobolus coronatus</i>



Tipo de micosis	Vía de infección	Localización	Agente causal
<b>COCCIDIOIDOMICOSIS</b>	Inhalatoria	 <p>Primoinfección pulmonar, puede diseminarse hacia otros órganos y producir lesiones en piel</p>	<i>Coccidioides immitis</i> , <i>C. posadasii</i>
<b>HISTOPLASMOSIS</b>			<i>Histoplasma capsulatum</i> var. <i>capsulatum</i>
<b>BLASTOMICOSIS</b>			<i>Histoplasma capsulatum</i> var. <i>duboisii</i> (en AFRICA)
<b>PARACOCCIDIOIDOMICOSIS</b>			<i>Blastomyces dermatitidis</i>
<b>CRYPTOCOCCOSIS</b>			<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
<b>ASPERGILOSIS</b>		Primoinfección pulmonar, en general involucra SNC y/o piel. Puede afectar otros órganos corporales	Complejo <i>Cryptococcus neoformans</i> <i>Cryptococcus</i> spp.
		Pulmón, piel, tejido mucocutáneo y cualquier órgano corporal	<i>Aspergillus fumigatus</i> y <i>Aspergillus</i> spp.
<b>CANDIDIASIS</b>	Endógena	Sangre, tejido cardíaco, hígado, bazo, riñones, tejido subcutáneo. (Los pulmones son colonizados pero raramente invadidos)	<i>Candida albicans</i> , <i>Candida</i> spp. y otras levaduras
<b>MUCORMICOSIS</b>	Inhalatoria o inoculación	Cara, senos paranasales, tracto gastrointestinal, pulmones	<i>Rhizopus</i> spp., <i>Absidia</i> spp., <i>Mucor</i> spp., <i>Mortierella</i> spp., <i>Cunninghamella</i> spp., <i>Syncephalastrum</i> spp.
<b>CROMOMICOSIS CEREBRAL</b>	Inhalatoria o inoculación accidental	Cerebro y sistema nervioso central	<i>Cladophialophora bantiana</i> , <i>Exophiala (Wangiella) dermatitidis</i> , <i>Fonsecaea pedrosoi</i> .
<b>OTRAS MICOSIS SISTÉMICAS POR HONGOS OPORTUNISTAS</b>	Inhalatoria o inoculación	Pulmones, tejidos profundos, órganos corporales y sangre	<i>Acremonium</i> spp., <i>Alternaria</i> spp., <i>Aureobasidium pullulans</i> , <i>Beauveria bassiana</i> , <i>Cercospora apii</i> , <i>Chaetoconidium</i> spp., <i>Curvularia</i> spp., <i>Emmonsia parva</i> var. <i>parva</i> , <i>Fusarium</i> spp., <i>Geotrichum</i> spp., <i>Helminthosporium</i> spp., <i>Paecilomyces</i> spp., <i>Penicillium</i> spp., <i>Pseudoallescheria boydii</i> , <i>Phialophora parasitica</i> , <i>Phoma hibernica</i> , <i>Scopulariopsis brevicaulis</i> , otros mohos.
<b>NOCARDIOSIS</b>	Inhalatoria	Pulmones, sistema nervioso central, piel y otros órganos.	<i>Nocardia asteroides</i> <i>Nocardia brasiliensis</i> <i>Nocardia caviae</i>
<b>PNEUMOCISTOSIS</b>	Inhalatoria	Pulmones	<i>Pneumocystis jirovecii</i>



## A) BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS MICOSIS SUBCUTÁNEAS

### DEFINICIÓN

Son infecciones que involucran la piel y tejidos subcutáneos producidas por un grupo muy heterogéneo de hongos y bacterias incluidas dentro de los actinomicetales aeróbicos como principales agentes etiológicos.

Las entidades clínicas más conocidas son los micetomas, la cromomicosis y la esporotricosis cutánea (de esta última ver oportunistas).

Se caracterizan por producir lesiones en el sitio de inoculación. No se transmite de hombre a hombre ni del animal al hombre.

### ECOLOGÍA Y DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

La infección se produce mayormente en áreas tropicales.

### SINTOMATOLOGÍA Y CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

Estos microorganismos inoculados traumáticamente, tienen la capacidad de invadir dermis, pudiendo llegar a músculo y aun a hueso, pueden provocar una lesión localizada y circunscripta (forma fija de la esporotricosis), invadir lentamente los tejidos adyacentes (micetomas y cromoblastomicosis), diseminarse vía linfática (esporotricosis) e infrecuentemente pueden diseminarse por vía hematogena y linfática (raros casos de cromomicosis).

Los **micetomas** provocados tanto por actinomicetes y eumicetes se caracterizan por aumento de volumen (generalmente de miembros inferiores), con deformación de la región, se observan orificios fistulosos, por donde drena un exudado filante de aspecto seropurulento y los granos (colonias del microorganismo).

En ocasiones se pueden observar costras y ulceraciones. Pueden aparecer cicatrices fibrosas hipo o hiperpigmentadas.

La **cromomicosis**, cuyos agentes pueden ser *Fonsecaea pedrosoi*, *Fonsecaea (Phialophora) compacta*, *Phialophora verrucosa*, *Cladophialophora (Cladosporium) carrionii*, *Exophiala (Wangiella) dermatitidis*, *Cladophialophora* sp. y *Rhinocladiella aquaspersa*; se caracteriza por lesiones en el sitio de inoculación, con formación de nódulos cutáneos eritematoides, verrucosos y luego pediculados, con aspecto de coliflor. Luego aparecen ulceraciones de 1 cm de diámetro, cubiertas de material hematopurulento y en algunos casos hay zonas de cicatrización en el centro de la lesión.

La **esporotricosis** (causada por *Sporothrix schenckii*) se caracteriza por lesiones únicas en el sitio de inoculación, en forma de nódulo, úlcera o verruga (forma fija) o, más comúnmente, múltiples lesiones que siguen la cadena linfática (forma linfangítica).

### FRECUENCIA SEGÚN EDAD, SEXO, RAZA Y OCUPACIÓN

Sus agentes están relacionados en su mayor parte con tareas rurales, ya que estos microorganismos se encuentran en la naturaleza asociados al suelo y los vegetales. Aparece en personas adultas ya que son de evolución lenta.

### FACTORES PREDISPONENTES

El factor predisponente está relacionado a la inoculación traumática del microorganismo.

### PRONÓSTICO Y EVOLUCIÓN

La evolución es crónica y progresiva, sin regresión espontánea. Puede afectar tejidos profundos, músculo y hueso. Tienen respuesta poco satisfactoria al tratamiento, aunque los nuevos antifúngicos como el posaconazol han mostrado una eficacia superior en comparación con otros antifúngicos. En muchos pacientes se debe realizar resección quirúrgica de la lesión.

## B) BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS MICOSIS SISTÉMICAS ENDÉMICAS

### COCCIDIOIDOMICOSIS

(Fiebre del valle, fiebre de San Joaquín, enfermedad de Posadas-Wernicke, reumatismo del desierto, granuloma coccidial).

### DEFINICIÓN

Enfermedad infecciosa producida por *Coccidioides* spp. Actualmente, se reconocen dos especies: *Coccidioides immitis*, agente de la enfermedad en el Valle Central de California, EEUU y *Coccidioides posadasii* en el resto de América. La infección es adquirida por vía inhalatoria pudiendo adoptar las siguientes formas:

- 1) **Coccidioidomicosis primaria:** enfermedad respiratoria aguda benigna que cura espontáneamente.
- 2) **Coccidioidomicosis progresiva:** padecimiento crónico maligno y diseminado que afecta los tejidos cutáneo, subcutáneo, visceral y óseo.



## ECOLOGÍA Y DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

*Coccidioides* sp. es un hongo dimorfo cuya fase saprófita o filamentosa vive en el suelo de zonas áridas y semiáridas de suelo seco y alcalino, con temperaturas ambientales de 26 a 32 °C durante el verano y de 4 a 12 °C en el invierno, con precipitación anual que no sobrepase 500 a 600 mm. Este tipo de suelo es pobre en materia orgánica y rico en sales minerales. El hongo crece bien después de un invierno con algunas lluvias seguido de un verano seco y caluroso. No sobrevive en lugares húmedos donde compite con otra flora fúngica.

Se comprobaron infecciones espontáneas en bovinos, burros, equinos, llamas, porcinos, ovinos, perros, ardillas, conejos, ratas, ratones, chinchillas, monos, gorilas y coyotes que habitan en el área endémica.

Se encuentra distribuido en las zonas secas y áridas de América. En Argentina los casos notificados corresponden a la zona árida especialmente serrana, desde la región chaqueña hasta la provincia de Río Negro.

## SINTOMATOLOGÍA. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS.

**Coccidioidomicosis primaria:** en el 60 % de los casos aparece como una infección respiratoria leve o completamente asintomática, tan ligera y fugaz que no obliga a la consulta médica y sólo se descubre por la subsiguiente intradermoreacción positiva a la coccidioidina.

El microorganismo es inhalado en el polvo de zonas endémicas, y los síntomas, si aparecen, lo hacen después de un período de incubación de 10 a 15 días. Los síntomas corresponden con una infección leve de vías respiratorias altas, estos son fiebre moderada (37,5 a 38 °C), escalofríos, dolores pleurales y tos no productiva; en el 28% de los casos la tos se acompaña de pequeñas hemóptisis. En el 8% de los casos aparecen dolores poliarticulares y a veces reacciones alérgicas de piel, conocidas como eritema nudoso. Los dolores poliarticulares, el eritema nudoso y la conjuntivitis flictenular, forman la tríada propia de la primoinfección.

**Coccidioidomicosis progresiva:** algunas neumonitis progresan hacia una enfermedad parecida a la tuberculosis con consolidación y formación de cavidades y posterior diseminación a otros órganos y tejidos, incluyendo piel y sistema nervioso central (SNC).

La forma **diseminada aguda** se presenta en aproximadamente 0,5 a 1% de los casos clínicamente activos en hombres blancos y en personas de color aumenta a un 10%. Se presenta bruscamente dentro de los nueve meses de la enfermedad (media 3-5 meses). Es semejante a la tuberculosis miliar, se caracteriza por fiebre, esplenomegalia, lesiones micronodulares en

ambos campos pulmonares, adenopatías múltiples, ataque óseo y del SNC con líquido cefalorraquídeo (LCR) como en la meningoencefalitis tuberculosa.

Las manifestaciones cutáneas son polimorfas; comienzan como una mácula y pueden evolucionar hacia vesícula, pústula y ulceración vegetante. Se presentan generalmente en el segmento cefálico, alrededor de los orificios naturales. Otras veces la diseminación ocurre entre los 9 meses y 10 años con lesiones en piel, tejido subcutáneo, huesos, articulaciones, SNC y otras vísceras. Las lesiones cutáneas son comúnmente únicas y pasan por la gama de pápula, pústula y úlcera. A veces asumen el aspecto de lesiones gomosas inflamatorias que ulceran o por el contrario se reabsorben espontáneamente. Las de tejido celular subcutáneo son de tipo de absceso frío. La localización osteoarticular puede simular un micetoma, las lesiones ganglionares se caseifican y pueden fistulizar adquiriendo el aspecto de la escrófulodermatitis. La localización en SNC tiene la sintomatología de una meningitis crónica o de un tumor.

Los trabajadores de laboratorio, en particular mujeres embarazadas, son extremadamente susceptibles a la enfermedad por inhalación de los conidios del cultivo a 28 °C, donde las producen en abundancia.

La infección percutánea es rara, sólo se vio en pocas oportunidades y se produjo por inoculación del hongo por traumatismo en personal de laboratorio, dando una lesión chancroide en el sitio de inoculación, posteriormente afecta la cadena ganglionar hasta los ganglios linfáticos regionales; en estos casos la curación fue espontánea, por lo que no se detecta con frecuencia.

En pacientes con SIDA se dan las formas neumónicas localizadas con una buena sobrevida mientras que la forma pulmonar difusa con lesiones retículo nodulillares son muy graves con una sobrevida inferior a un mes. Las formas diseminadas y pulmonares crónicas se dan en menos de un 1% en zonas endémicas.

## FRECUENCIA SEGÚN EDAD, SEXO, RAZA Y OCUPACIÓN.

Puede ocurrir en cualquier edad desde los 3 meses hasta los 70 años. Hasta la pubertad no se observa diferencia entre sexos, luego se ve eritema nudoso en 25% de las mujeres infectadas por primera vez y sólo en un 5% de los varones en igual situación. Los varones son 4 veces más susceptibles a padecer la forma diseminada, sin embargo, durante el embarazo la mujer pierde su inmunidad relativa a la diseminación y alcanza o supera la susceptibilidad de los varones.

La raza caucásica es más resistente, mientras que los



japoneses, aborígenes americanos, chinos y negros son más susceptibles a padecer la forma diseminada.

#### FACTORES PREDISPONENTES

Además de la raza y el sexo la inhalación de conidios parece ser un factor predisponente.

La coccidioidomicosis puede aparecer como una complicación, inmediata o tardía, en pacientes inmunocomprometidos ya sea por una enfermedad de base inmunológica o por tratamientos inmunosupresores. En pacientes con SIDA residentes en áreas endémicas la coccidioidomicosis aparece como causa de una reactivación de la infección.

#### EVOLUCIÓN

Las formas asintomáticas o subclínicas curan espontáneamente dejando una fuerte protección. Cuando la primoinfección es sintomática puede curar sola o requerir tratamiento específico, curando en días o semanas sin dejar rastros. La evolución depende del número de conidios inhalados, del estado inmunológico del hospedador, del diagnóstico precoz y del tratamiento oportuno ante la sospecha de una diseminación. Si la infección primaria persiste durante 5 a 6 semanas se debe sospechar de una forma progresiva de la enfermedad.

Por el examen radiológico cabe postular una forma diseminada a partir de la forma primaria si aparece:

- 1- Consolidación pulmonar progresiva aguda.
- 2- Infiltrado de tipo tuberculoso con aumento de la densidad, moteado, fibrosis y cavitación en los vértices o en las áreas subapicales.
- 3- Adenopatías mediastínicas de grado intenso.
- 4- Si se hallan afectados huesos o articulaciones.

La diseminación linfohemática es la más grave y puede llegar al SNC.

En el caso de las formas diseminadas agudas el pronóstico es grave con un 50-60% de mortalidad. Los focos calcificados y fibrosos pueden contener hongos viables por lo que es necesario mantener al paciente en un buen estado inmunológico; siendo la edad (niños y ancianos), la raza y la gravedad factores a tener en cuenta. La presencia de cavidades residuales, en cambio, le confieren al paciente una sólida protección.

### HISTOPLASMOSIS

(Fiebre del Valle de Mississippi, enfermedad de Darling, retículoendoteliosis, citomicosis retículoendotelial, histoplasmosis capsulati).

#### DEFINICIÓN

Enfermedad infecciosa cuyo agente etiológico es

*Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*. La infección es adquirida en la mayoría de los casos por vía inhalatoria, presentando una gran variedad de manifestaciones clínicas. La enfermedad pulmonar primaria aguda y benigna se conoce como **histoplasmosis primaria**; esta cura parcialmente dejando como secuelas áreas múltiples de calcificación en el parénquima pulmonar y en los ganglios linfáticos regionales, o cura completamente sin lesiones cicatrizales visibles. Sin embargo, puede transformarse en un padecimiento progresivo, conocido como **histoplasmosis progresiva**, que se caracteriza por leucopenia, anemia secundaria y pirexia irregular. A menudo se observa ulceración de la cavidad nasal, bucal, faríngea y del intestino, linfadenopatía generalizada, esplenomegalia.

El carácter intracelular del *H. capsulatum* en el sistema retículoendotelial es análogo a *Toxoplasma* y *Leishmania*, y el cuadro clínico de la histoplasmosis progresiva tiene muy pocas diferencias con el Kala-azar.

#### ECOLOGÍA Y DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

*Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* es un hongo dimorfo cuya fase saprofítica filamentosa tiene un hábitat natural en suelos enriquecidos con guano de murciélagos, gallinas, palomas, estorninos y otras aves. Su estado perfecto, *Ajellomyces (Emmonsia) capsulata*, puede crecer y conservar su virulencia en competencia con la flora microbiana natural.

Los suelos deben poseer gran capacidad para retener agua, deben ser ricos en nitrógeno, fosfatos, hidratos de carbono y cationes que inhiben el desarrollo de algunos microorganismos, además de contener piedra caliza o mármol. Estas condiciones las reúnen cuevas, grutas, espacios cerrados y oscuros, construcciones abandonadas donde se pueden acumular grandes cantidades de guano de aves y/o murciélagos.

Los estudios de laboratorio indican que se necesita un alto grado de humedad y una temperatura que fluctúe en un rango de 20 a 30 °C, lo que se corresponde con una región climática subtropical húmeda.

Se comprobaron infecciones espontáneas en los siguientes animales: murciélagos, vacunos, ovinos, porcinos, gatos, perros, monos, osos, zorros, ratas, cobayos, ardillas, coatíes, hurones, ratones domésticos, mapaches, zarigüellas, marmotas y ratas. Inclusive, recientemente se describieron infecciones espontáneas en delfines, felinos grandes e inclusive en una liebre de la patagónica.

En Argentina los casos notificados corresponden a la región actualmente denominada llanura del Río de la Plata que incluye las provincias de Buenos Aires, Entre



Ríos, sur de Córdoba y este de La Pampa. También se notificaron casos autóctonos en Tucumán, Salta y Chaco pero en bajo porcentaje. En 2002 se informó un brote de histoplasmosis en la Provincia de Neuquén, y en 2009 uno en una zona del cono urbano bonaerense.

#### SINTOMATOLOGÍA. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS.

El hongo ingresa al organismo por vía inhalatoria y llega al parénquima pulmonar eludiendo los mecanismos de defensa inespecíficos, dando lugar a la primoinfección. El período entre la inhalación y la aparición de los primeros síntomas es de aproximadamente una semana, y el tipo de primoinfección depende del número de conidios inhalados; generalmente este número es bajo, con lo que la mayoría de las primoinfecciones son **asintomáticas** o **subclínicas** pasando desapercibidas o dando una forma respiratoria leve que no obliga a la consulta y se diagnostica retrospectivamente por hipersensibilidad a la histoplasmina y la aparición de focos pulmonares calcificados en radiografías.

Cuando la inhalación es masiva la primoinfección pulmonar es sintomática dando una forma **respiratoria aguda** que, de acuerdo a su gravedad, puede clasificarse en benigna, moderada o grave. El cuadro clínico va desde síntomas que simulan un resfriado de 3 a 4 días de duración, a cuadros pseudogripales de 7 a 15 días de duración con dolor torácico, tos con expectoración mucopurulenta, fiebre, astenia y anorexia, hasta cuadros graves que simulan neumonía atípica primaria, esta última surge como brotes epidémicos.

El examen radiológico muestra infiltrados neumónicos múltiples con algún grado de compromiso ganglionar hilar mediastinal. Generalmente hay aumento de tamaño de los ganglios linfáticos.

La reactividad a la histoplasmina decae con el tiempo, por lo que los residentes de áreas endémicas pueden sufrir reinfecciones con cierta frecuencia. Al igual que la primoinfección esta reexposición, si es con un pequeño número de conidios, generalmente no produce sintomatología pero, si el número es masivo, se manifiesta como una enfermedad pseudogripal con una reacción granulomatosa pulmonar (miliar) que cura sin calcificación. Los individuos mayores de cuarenta años desarrollan una **histoplasmosis respiratoria crónica** que se caracteriza por tos con expectoración mucopurulenta o hemóptisis, dolor torácico, febrícula vespertina, astenia, anorexia y pérdida de peso. La radiografía evidencia nódulos infiltrados fibrosos y cavitación habitualmente en lóbulos superiores y bilaterales; las cavidades generalmente están acompañadas de enfisema pulmonar y suelen estar asociadas a tuberculosis.

La forma clínica más frecuente de observar es la diseminada crónica con afectación pulmonar y diseminación extrapulmonar especialmente a mucosas oral, nasal, laríngea, adenopatías, y hepatoesplenomegalia. La cicatrización fibrosa de las lesiones puede producir estenosis laríngea, bronquiectasias, fibrosis pulmonar o mediastinal.

Las formas diseminadas agudas son infrecuentes y se observan en niños o pacientes severamente inmunocomprometidos. Se presentan como un síndrome febril, con pérdida de peso y compromiso del sistema retículo endotelial (adenomegalias, hepatoesplenomegalia) con escasa o ninguna manifestación pulmonar.

Las formas subagudas de la enfermedad se presentan en pacientes con inmunocompromiso celular. En los pacientes HIV positivos se comporta como enfermedad marcador de SIDA, cuando el paciente tiene menos de 200 CD4/mm<sup>3</sup>. Cursa con compromiso pulmonar (intersticial, nodular o cavitario) con diseminación extrapulmonar, especialmente a piel y médula ósea. En piel presenta lesiones papulosas de 0,5 a 1 cm con umbilicación central, preferentemente ubicadas en cara y tronco. El compromiso de médula ósea se presenta con anemia y los hemocultivos por lisis centrifugación son positivos en más del 60% de los pacientes.

*Histoplasma capsulatum* puede ser recuperado de hemocultivos, mielocultivos y visualizarse en frotis de sangre periférica, raspado de las lesiones cutáneas y mucocutáneas (comunes en estos pacientes) con coloración de Giemsa prolongado.

Los huéspedes inmunocomprometidos no SIDA en tratamiento inmunosupresor con corticoides, desarrollan histoplasmosis subaguda que no suele tener afectación pulmonar clínica y presentan con gran frecuencia lesiones cutáneas que se inician como placas eritematosas infiltradas que evolucionan a la necrosis.

#### FRECUENCIA SEGÚN EDAD, SEXO, RAZA Y OCUPACIÓN.

Todas las edades son susceptibles, pero la histoplasmosis enfermedad, en nuestro país se observa predominantemente en varones mayores de 40 años.

No parece haber razas más afectadas que otras.

En México, la histoplasmosis, es considerada una enfermedad ocupacional ya que se asocia a los mineros y a las personas que recogen guano de murciélagos de cuevas o grutas, el que se utiliza como fertilizante orgánico. En EEUU, también se la asocia a profesiones relacionadas a la limpieza de edificaciones antiguas, cúpulas y puentes donde se asientan grandes colonias de murciélagos. Hábitos de esparcimiento como el turismo espeleológico son una de las principales causas



de brotes en Centro y Norte América. El personal de laboratorio que manipula el hongo a menudo da infecciones sintomáticas o asintomáticas que se acompañan de hallazgos radiológicos localizados en el aparato respiratorio con intradermorreacción y serología positivas.

#### FACTORES PREDISPONENTES

Inhalación de conidios de áreas infectadas tales como cavernas donde habitan aves y murciélagos, gallineros, nidos de palomas y otros suelos ricos en guano.

Enfermedades que comprometen la inmunidad mediada por células tales como SIDA, leucemias, linfomas y tratamientos inmunosupresores con corticoides por colagenopatías, trasplante, etc, pueden ser factores de riesgo en personas residentes en áreas endémicas.

#### EVOLUCIÓN

El pronóstico es excelente en casi todos los casos de infección primaria, pero muy grave en su forma diseminada. Los niños suelen morir en el término de unas pocas semanas. Los adultos son más resistentes pero pueden morir antes de que se sospeche la enfermedad.

### BLASTOMICOSIS NORTEAMERICANA

Blastomycosis, enfermedad de Gilchrist.

#### DEFINICIÓN

Infección crónica producida por *Blastomyces dermatitidis*, cuyo estado perfecto es *Ajellomyces dermatitidis*. Se caracteriza por la formación de lesiones granulomatosas y supuradas en cualquier región del cuerpo, pero con preferencia en pulmón, piel y huesos.

#### ECOLOGÍA Y DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

Se la describe en países septentrionales del continente americano: EEUU y Canadá. *Blastomyces dermatitidis* es un hongo dimorfo que no se puede aislar de fuentes naturales aunque probablemente se encuentre en el suelo.

Se comprobaron infecciones espontáneas en animales que residen en el área endémica, tales como perros, caballos e incluso un caso de infección en foca.

**No existen casos autóctonos en Argentina.**

#### SINTOMATOLOGÍA. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS.

La infección primaria es pulmonar y puede desarrollar dando una infección respiratoria leve que cura pudiendo o no dejar cicatriz, o transformarse en

una bronconeumonía o neumonía lobar que puede llegar a ser crónica o diseminarse rápidamente a piel y otros órganos. Las lesiones de piel son prominentes y crónicas de tipo verrugoso o papilomatoso difuso. La infección percutánea es rara, ocasionalmente ocurre como resultado de accidentes de laboratorio. Suelen verse nódulos ulcerados con adenitis regional que curan espontáneamente.

#### FRECUENCIA SEGÚN EDAD, SEXO, RAZA Y OCUPACIÓN.

Afecta todas las edades y ambos sexos, con mayor frecuencia en hombres de mediana edad. Aunque parecieran ser más susceptibles los individuos de raza negra, puede afectar a todas las razas. La enfermedad se presenta con mayor frecuencia en individuos de clase económica baja. No existe ocupación alguna relacionada a este padecimiento.

#### EVOLUCIÓN

La **blastomycosis cutánea** rara vez produce la muerte del paciente y las lesiones no tratadas pueden persistir durante años. La **blastomycosis diseminada** es mortal a menos que se instaure tratamiento.

### PARACOCCIDIOIDOMICOSIS

Blastomycosis sudamericana, granuloma paracoccidoidal, enfermedad de Lutz-Splendore-Almeida.

#### DEFINICIÓN

Enfermedad sistémica granulomatosa y supurativa crónica de la piel, mucosas, ganglios linfáticos y otros órganos, causada por el hongo dimorfo *Paracoccidioides brasiliensis*.

#### ECOLOGÍA Y DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

*Paracoccidioides brasiliensis* fue aislado a partir del suelo, más frecuentemente de Brasil, pero su hábitat natural no es completamente conocido. En pocas oportunidades se aisló de suelo de áreas rurales con pH ácido, rico en materia orgánica, dedicado al cultivo de café, algodón o caña de azúcar, próximo a grandes ríos de zonas subtropicales y húmedas con temperatura media de 18-23 °C, precipitación pluvial anual de 800-2000 mm y una altitud menor a 1800 metros sobre el nivel del mar.

No se detectaron infecciones espontáneas en animales silvestres ni domésticos. Esta enfermedad es endémica de áreas rurales y subtropicales de América del Sur, donde se notificaron casos en todos los países exceptuando Chile y las Guayanas, y predominando en Brasil.



En Argentina el área endémica comprende las provincias de Chaco (con una mayor incidencia), Formosa, Misiones, Corrientes, norte de Entre Ríos, Santa Fé, Tucumán y Salta.

#### SINTOMATOLOGÍA. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS.

Como en las otras micosis endémicas, el ingreso del hongo es por vía inhalatoria.

La **infección pulmonar primaria** es generalmente subclínica y puede simular una neumonitis inespecífica a partir de la cual frecuentemente se produce una diseminación hematógena o linfática precoz, en especial hacia las membranas mucosas y mucocutáneas, con poca evidencia de compromiso pulmonar.

Luego de 3 a 4 semanas del contacto infectante la inmunidad mediada por células sensibilizadas (inmunidad específica) hace que se produzcan reacciones granulomatosas, necrosis y destrucción del microorganismo lo que en general lleva a la involución de la infección; en otras oportunidades la infección no puede ser frenada y continúa activa, o se reactiva después de meses o años de latencia en el pulmón u otro órgano. El período de incubación puede variar desde 2 semanas a 35 años. La diseminación de la enfermedad puede originar dos tipos clínicos: la **forma tipo infantojuvenil**, poco frecuente, se presenta en niños, adolescentes o adultos con mal estado inmunológico, con tratamientos antituberculosos o con yoduros. Se caracteriza por fiebre, astenia, adinamia, pérdida de peso, anemia, hepatoesplenomegalia y adenopatías múltiples. Luego de algunas semanas aparecen abscesos subcutáneos fríos, lesiones óseas en las metafisis de los huesos largos o costillas, las adenopatías se reblandecen, se adhieren a la piel, se fistulizan y supuran. Sólo los adultos presentan compromiso pulmonar con tos, expectoración purulenta o hemoptóica y disnea. En la piel aparecen lesiones múltiples, erupciones papulosas o pápulo-pustulosas, pero las mucosas pocas veces se ven afectadas.

La forma **tipo adulto puede ser uni o multifocal**. Esta última es la más frecuente, se presenta en adultos y se caracteriza por lesiones mucocutáneas, ganglionares o pulmonares. Con menos frecuencia disemina a bazo, intestino e hígado y raramente a otros órganos. La mucosa bucal es generalmente afectada y muestra ulceraciones de fondo granulomatoso, con puntillado hemorrágico que asienta sobre una base rojo-violácea. Los labios presentan una inflamación difusa, fría, de consistencia dura y dolorosa a la presión que se conoce como induración. Se puede observar además paradentosis, úlceras en amígdalas, necrosis de epiglotis y granulomas o úlceras de laringe lo que provoca disfonía, disfagia y disnea de tipo

obstructivo. Con menos frecuencia estos hallazgos se repiten en las mucosas traqueobronquiales y pueden conducir a estenosis de las vías aéreas. También pueden observarse úlceras cutáneas, generalmente periorificiales, síndrome de Addison y granulomas cerebrales. Las lesiones pulmonares presentan escasos síntomas y signos clínicos.

Algunos pacientes desarrollan procesos pulmonares de evolución prolongada cuyos síntomas iniciales son tos, expectoración mucopurulenta, ó hemoptoica, disnea de esfuerzo, astenia, anorexia, pérdida de peso y puede o no presentar febrícula; no se observan cavidades pulmonares, los signos clínicos son escasos, detectándose enfisema, roncus o estertores subcrepitanes de localización variable. Produce fibrosis pulmonar de intensidad creciente que lleva a una insuficiencia respiratoria crónica con aumento de la disnea, aparición de cianosis subungueal y dedos hipocráticos. En esta forma **pulmonar crónica** no se detectan lesiones extrapulmonares.

#### FRECUENCIA SEGÚN EDAD, SEXO, RAZA Y OCUPACIÓN

Afecta todas las edades, especialmente a individuos entre 30 y 50 años. Los varones son más afectados que las mujeres, en proporciones que oscilan entre 12:1 y 50:1 según la región estudiada. No se detecta una notoria predisposición racial. Es más frecuente en trabajadores manuales especialmente de áreas rurales.

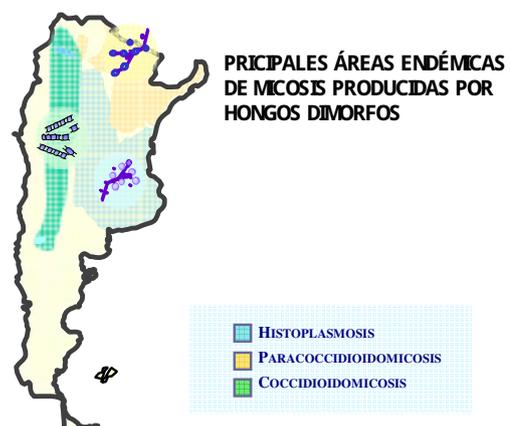
#### FACTORES PREDISPONENTES

El etilismo crónico, la mala nutrición, y enfermedades subyacentes juegan un rol importante, como así también la exposición al agente etiológico.

Esta micosis sistémica endémica no aparece con frecuencia asociada a pacientes inmunocomprometidos.

#### EVOLUCIÓN

Habitualmente es crónica, progresiva y suele conducir a la caquexia en varios años si no se instaura el tratamiento adecuado.





## C) BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS MICOSIS SISTÉMICAS OPORTUNISTAS

### CRÍPTOCOCOSIS

Blastomycosis europea, torulopsis, enfermedad de Busse-Buschke, granulomatosis criptocócica.

#### DEFINICIÓN

Infección subaguda o crónica de evolución generalmente grave, causada por el complejo *Cryptococcus neoformans* (estado perfecto: *Filobasidiella neoformans*) que puede afectar pulmones, piel y otras partes del cuerpo. Presenta una marcada predilección por el sistema nervioso central (SNC).

#### ECOLOGÍA Y DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

La fase perfecta del complejo *C. neoformans* es un Basidiomycete que vive como saprófito en la naturaleza, generalmente asociada a excremento de paloma, pudiendo ser aislada a partir del suelo con guano de estas aves, restos vegetales y frutas. Es de distribución universal y los casos reportados de criptococosis provienen tanto de áreas urbanas como rurales. Se detectaron infecciones espontáneas en animales domésticos y salvajes pero no en palomas y otras aves, aún cuando su estiércol proporciona un excelente medio para su propagación en la naturaleza.

Provoca mastitis en el ganado vacuno, pero el hombre no se infecta si bebe leche pasteurizada, ya que el hongo es susceptible a las altas temperaturas.

#### SINTOMATOLOGÍA. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

Este hongo penetra al organismo por vía inhalatoria, dando una primoinfección pulmonar leve o subclínica, que puede curar o dejar una masa fúngica en los pulmones. La enfermedad progresiva se produce por diseminación hematógena y generalmente localiza en SNC de individuos con alteraciones en su inmunidad celular.

La primoinfección pulmonar no tiene características propias y se parece a la primoinfección de la tuberculosis, a la forma miliar diseminada, o se presenta como una masa tumoral llamada criptococoma debiendo realizarse el diagnóstico diferencial con un quiste hidatídico o una neoplasia.

Giordano en 1939, hizo una revisión de casos y describió tres tipos de lesiones: (a) meníngeas difusas o circunscriptas; (b) embólicas y (c) perivasculares, estas dos últimas poco frecuentes.

La presentación clínica más frecuente es como un síndrome meníngeo subagudo.

Es una patología asociada al inmunocompromiso. Si se realiza el diagnóstico de una criptococosis debe investigarse, especialmente SIDA, ya que esta es la enfermedad a la que se asocia con mayor frecuencia (del 60 al 90%). Le siguen en frecuencia como factor predisponente de las criptococosis, los tratamientos inmunosupresores, especialmente con corticoides: trasplantes, colagenopatías, enfermedades dermatológicas, etc.

Los síntomas pueden aparecer en forma gradual y comienzan con cefaleas intermitentes que luego se tornan continuas y aumentan su intensidad. En ocasiones el comienzo es brusco con cefalea agudísima y violenta, vómitos, mareos, vértigo, rigidez y dolor de nuca. A medida que progresa surgen trastornos mentales con depresión, desorientación, apatía, inquietud, irritabilidad y delirio. En ocasiones hay estrabismo, nistagmus, diplopía, disminución de la visión que puede llegar a ceguera, parálisis de los nervios craneanos, afacia, etc. En estadios avanzados del SIDA puede aparecer una meningitis aguda y fulminante.

El paciente presenta meningitis y en un 20-30% tendrá alguna masa en SNC (criptococoma).

La meningitis es a líquido claro con hipoglucoorraquia, hiperproteinoorraquia y aumento de la celularidad (50 a 100 cel/mm<sup>3</sup> a predominio linfocitario), pero un LCR normal no excluye el diagnóstico de criptococosis meníngea.

En los pacientes HIV reactivos es frecuente la diseminación extrameníngea: piel, médula ósea, ganglios, etc y la presencia de *C. neoformans* en los hemocultivos. Las lesiones en piel son lesiones papulomatosas que requieren el diagnóstico diferencial con molusco contagioso e histoplasmosis.

Las **formas pulmonares** deben sospecharse en pacientes con tos, expectoración, febrícula, pérdida de peso durante semanas a meses, si se ha descartado TBC pulmonar. Las radiografías de tórax muestran una imagen de aspecto tumoral o lesiones infiltrativas bilaterales confluentes con predominio basal, tanto en los pacientes con SIDA como en los que no tienen inmunocompromiso aparente.

Otras localizaciones descritas son linfadenopatías, pericarditis, artritis, ulceración de la mucosa oral, pleuritis, peritonitis y otras menos frecuentes.

#### FRECUENCIA SEGÚN EDAD, SEXO, RAZA Y OCUPACIÓN

Son afectados tanto varones como mujeres de todas las edades, aunque el grupo etario más afectado es el de 3 a 6 años. Todas las razas son afectadas por igual y no existe relación alguna entre criptococosis y ocupación.



## FACTORES PREDISONENTES

La exposición a suelos contaminados con heces de palomas predispone a la primoinfección.

Como complejo *C. neoformans* es de baja patogenicidad y actúa en la mayoría de los casos como un oportunista, se consideran pacientes de riesgo todos aquellos que poseen alteraciones de la inmunidad celular tales como SIDA, linfomas Hodgkin y no Hodgkin, leucemias, diabetes, pacientes sometidos a trasplantes o terapias prolongadas con corticoides, citostáticos u otras drogas inmunosupresoras.

## EVOLUCIÓN

Las formas meníngeas son graves si no se diagnostican a tiempo o se demora la iniciación del tratamiento con anfotericina B. En pacientes con SIDA las recaídas son frecuentes si no se continúa con una terapia de mantenimiento (profilaxis secundaria).

Las formas pulmonares por lo general tienen mejor pronóstico: si el paciente no es inmunosuprimido cura espontáneamente, si lo es, debe instaurarse tratamiento lo antes posible.

## CANDIDIASIS SISTÉMICAS

### DEFINICIÓN

La candidiasis es una infección primaria o secundaria causada por diferentes especies del género *Candida*, con manifestaciones clínicas agudas, subagudas, crónicas o episódicas, en las cuales el hongo puede producir lesiones cutáneas, mucocutáneas o sistémicas. Provocan diversos procesos patológicos que varían desde irritación e inflamación a supuración crónica o aguda o respuesta granulomatosa.

Aunque muchas formas clínicas, en especial las cutáneas y mucocutáneas, son muy comunes y se conocen desde 1665, las formas generalizadas fueron descritas por primera vez en 1850. A partir del año 1940 se incentiva el interés por las candidiasis ya que al comenzarse a usar la antibióticoterapia se produjeron muchos casos mortales de candidiasis. A partir de esa fecha todos los avances en medicina tendientes a prolongar la vida de pacientes con enfermedades malignas, los trasplantes, las diálisis, las cirugías cardíacas y abdominales y el uso de catéteres y sondas han provocado un incremento tan grande en las infecciones profundas por levaduras que han llegado a ser los principales agentes de infecciones fúngicas nosocomiales, siendo responsables del 30% de las infecciones urinarias y del 5 al 10% de los hemocultivos positivos

### ECOLOGÍA Y DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

*Candida albicans* puede aislarse a partir de piel, mucosa bucal y vaginal, tracto digestivo y materia fecal de individuos sanos. *Candida parapsilosis*, a su vez, puede ser aislada junto a otras levaduras de la piel sana del hombre. Estas levaduras son patógenos potenciales ya que pueden invadir cuando hay una disminución de las defensas del hospedador.

Otras especies de este género fueron aisladas de fuentes naturales tales como jugos de frutas, frutas y granos. Se comprobaron infecciones espontáneas en pájaros, vacunos, porcinos, perros, cobayos, roedores y monos.

Las especies que con frecuencia causan enfermedad son *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii* y *C. krusei*, pero no son las únicas. También se han recuperado con menor frecuencia otras especies del género e inclusive otros géneros de levaduras involucradas en patología.

Todas ellas tienen el mismo aspecto general en el tejido del hospedador y el diagnóstico específico de la enfermedad depende del aislamiento e identificación del microorganismo.

### SINTOMATOLOGÍA. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS (CANDIDIASIS SISTÉMICAS)

Las vías de entrada de las levaduras al torrente circulatorio son el intestino (especialmente en los neutropénicos), la piel facilitado por los catéteres y muy raramente la vía urinaria.

Los antecedentes que con mayor frecuencia presentan los pacientes que desarrollan candidiasis son:

- Internación prolongada (mayor a 3 semanas)
- Tratamiento antibiótico (ya que al disminuir la flora bacteriana, permite una mayor presencia de levaduras)
- Uso de catéteres, que facilitan un fácil acceso de las levaduras desde piel a circulación general (especialmente catéteres venosos centrales).

Otros antecedentes, que se consideran factores de riesgo para desarrollar candidemia son: alimentación parenteral, cirugías (especialmente abdominal), diálisis, tratamiento con corticoides, etc.

Desde el torrente circulatorio las levaduras se diseminan y ocasionan impactos embólicos, con elementos levaduriformes con o sin pseudomicelios en el centro de una lesión abscedada con polimorfonucleares.

Estos impactos embólicos afectan con mayor frecuencia retina, hígado, bazo, riñones y endocardio.

La invasión primaria pulmonar es extremadamente rara, pero este órgano puede verse secundariamente comprometido luego de una diseminación, observándose entonces lesiones nodulares pequeñas distribuidas al azar en ambos pulmones.



La candidiasis diseminada presenta la misma clínica que una sepsis bacteriana: el comienzo puede ser brusco, con fiebre, escalofríos, hipotensión, esplenomegalia, petequias, embolias, taquicardia, taquipnea y compromiso sensorial que puede evolucionar hacia el shock séptico y/o las manifestaciones clínicas que correspondan al órgano afectado.

El espectro de las candidiasis diseminadas en pacientes neutropénicos incluye tanto formas agudas como crónicas. La candidiasis diseminada crónica (CDC o candidiasis hepatoesplénica), se presenta en pacientes con hematopatías malignas y neutropenia. Durante el período de neutropenia el paciente presenta fiebre, con o sin dolor abdominal. Cuando recupera los glóbulos blancos se pueden visualizar (por ecografía, TAC o RNM) los impactos embólicos, especialmente en hígado, bazo y riñón. El síndrome febril se acompaña de valores elevados de las enzimas hepáticas, especialmente la fosfatasa alcalina.

El tratamiento de esta forma clínica puede requerir varios meses, hasta la desaparición o calcificación de las lesiones.

**Según BODEY, la clasificación de la candidiasis invasiva sería la siguiente:**

1. **Candidemia:** Se considera siempre que exista un cultivo positivo.

2. **Candidemia asociada a catéter:** cuando el recuento del retrocultivo en un paciente con catéter es 10 veces mayor al cultivo en sangre periférica, o cuando el recuento de unidades formadoras de colonias del catéter por el método de Maki es  $> 15$  UFC o  $> 100$  UFC si se utiliza el método de Brum Buisson.

### 3. Candidiasis aguda diseminada

Paciente con múltiples órganos infectados

Candidemia asociada con *Candida* en piel/oftalmítis

Candidemia o múltiples biopsias positivas de piel en pacientes neutropénicos severos

4. **Candidiasis crónica diseminada** (Candidiasis hepatoesplénica)

Largos períodos de neutropenia

Leucemia aguda. Anemia aplásica

Fiebre  $> 2$  semanas

Signos o síntomas de hepatoesplenomegalia

Aumento de la función hepática: aumento de la fosfatasa alcalina

Hallazgos anormales por imágenes abdominales

Identificación de *Candida* spp por histopatología o cultivo de sangre.

**FRECUENCIA SEGÚN EDAD, SEXO, RAZA Y OCUPACIÓN.**

No hay predilección por edad, sexo o raza.

### FACTORES PREDISPONENTES

En hospedadores normales varios factores entre los cuales se cuentan el buen estado general, la competencia de la flora bacteriana normal y un sistema inmunológico competente reprimen la invasión y limitan el número de levaduras dentro del rango normal.

El excesivo desarrollo de las mismas se produce cuando se elimina la flora bacteriana normal competitiva, disminuye la resistencia del hospedador por causas naturales o iatrogénicas y otros factores locales entre los que se destacan la maceración de la piel por lavados o inmersión frecuente en agua, la mala higiene bucal, dentaduras mal ajustadas, etc. En recién nacidos la colonización ocurre antes o durante el establecimiento de la flora residente normal, produciendo muguet, eritema del pañal, etc., pero en los niños normales estos trastornos se resuelven rápidamente.

Los cambios fisiológicos que se producen con el embarazo modifican el contenido de carbohidratos de la vagina, provocando un aumento en la población de levaduras que puede expresarse como una vaginitis.

Las disfunciones endócrinas, en particular diabetes, también pueden provocar un aumento en la población de levaduras, al igual que la administración de esteroides. En los diabéticos el índice de portación como flora normal de la piel está muy aumentado, al igual que la colonización (mucosa bucal, intestinal y vaginal), lo que contribuye a las infecciones oportunistas por levaduras.

La ruptura de las barreras normales de defensa ya sea accidental, como en el caso de los traumatismos, quemaduras, o heridas de bala o de cuchillo, o las relacionadas con catéteres conectados, hiperalimentación, diálisis peritoneal, procedimientos quirúrgicos, o la inyección de material dentro de la piel, los músculos y el torrente sanguíneo o el SNC, permiten la colonización por levaduras que puede derivar en una infección generalizada.

Los tratamientos con antibióticos de amplio espectro o contra Gram negativos son uno de los factores predisponentes más importantes de las candidiasis graves y fatales ya que disminuyen los efectos candidicidas de los neutrófilos, irritan la mucosa del epitelio intestinal y aumentan la posibilidad de desarrollo de levaduras produciendo daños en el tejido y subsecuente invasión, que se ve favorecida por el aumento de la "persortion" de las levaduras intactas a través de la mucosa hacia la sangre.

Los corticoides, solos o en combinación con antibióticos, a su vez suprimen la respuesta neutrofílica



a *Candida* (migración de neutrófilos, fagocitosis y digestión de las células englobadas).

La cirugía cardíaca y la drogadicción endovenosa son las principales causas de las endocarditis candidiásicas aunque en los últimos también puede observarse la infección diseminada.

#### EVOLUCIÓN Y PRONÓSTICO

Las formas diseminadas son de pronóstico grave. La mortalidad de los pacientes con candidemia es de alrededor del 40%, y puede ser debida a la falta o retraso del diagnóstico de la misma, lo que impide la instauración de la terapéutica específica, aunque también se relaciona con la enfermedad subyacente, la edad y el estado general e inmunitario del paciente.

### INFECCIONES SISTÉMICAS POR LEVADURAS DEL GÉNERO MALASSEZIA

Las primeras enfermedades extracutáneas relacionadas con ésta levadura fueron descritas a partir de la década del '70 en pacientes con dacriocistitis, mastitis y sinusitis crónica.

Actualmente las especies de *Malassezia* se consideran patógenos emergentes que debe ser sospechado como agente de sepsis asociada a catéteres en población pediátrica que recibe alimentación lipídica parenteral prolongada, especialmente cuando se trata de prematuros de bajo peso internados durante largos períodos en unidades de cuidados intensivos. Si bien esta es la menos frecuente de las infecciones provocadas por *Malassezia* spp., es la más importante debido que su pronóstico es grave y su morbimortalidad elevada.

La primera infección nosocomial causada por *M. pachydermatis* fue descrita en 1980. Esta especie, que hasta ese momento sólo había sido aislada como agente etiológico de infecciones en animales, fue detectada posteriormente en varias oportunidades, como agente etiológico de infecciones nosocomiales en salas de cuidados intensivos de neonatos, donde pudo comprobarse la transmisión nosocomial mediante métodos moleculares.

Posteriormente, se describieron formas clínicas invasivas en pacientes pediátricos causadas por levaduras lipofílicas del género *Malassezia*, y se pudo determinar la persistencia en ambiente hospitalario y transmisión horizontal de *M. furfur* y *M. pachydermatis* utilizando técnicas moleculares.

#### ECOLOGÍA Y DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

Las especies del género *Malassezia* son parásito obligado que sólo puede vivir sobre epidermis viva del hombre y animales. Solo una de las especies descritas no requiere lípido para su crecimiento (*M.*

*pachydermatis*). El resto de las especies son lipofílicas y no desarrollan en medios de cultivo de rutina. Además de agregado de aceite de oliva estéril u otras fuentes de ácidos grasos saturados de 12 a 16 carbonos en los medios de cultivo, algunas especies sólo crecen a 32 °C.

Las especies lipofílicas son: *M. furfur*, *M. sympodialis*, *M. globosa*, *M. obtusa*, *M. restricta*, *M. slooffiae*, *M. yamatoensis*, *M. japonica*, *M. dermatitis* y *M. nana*. El género se encuentra aún en revisión por lo que siguen describiéndose nuevas especies asociadas a diferentes patologías.

#### SINTOMATOLOGÍA Y CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

Poco se sabe si en cada entidad clínica descrita está involucrada alguna o varias de las especies del género. El hecho de que se sigan incorporando especies nuevas al género hace difícil determinar el papel de cada una de estas especies en la patología fúngica. Todas las especies son colonizantes de piel sana de humanos y/o animales o como causantes de infecciones superficiales. Estudios más extensos, deberían realizarse para determinar las especies involucradas en infecciones sistémicas.

#### FACTORES PREDISONENTES

La alimentación lipídica parenteral en pacientes pediátricos parece ser la principal causa predisponente. Es difícil detectar el agente a menos que el cultivo de la sangre se realice en medios de cultivos especiales e incubados a 32 °C.

#### EVOLUCIÓN Y PRONÓSTICO

En cualquiera de los casos se recomienda remover el catéter y eliminar la alimentación lipídica. Si la fungemia persiste o hay trombocitopenia el tratamiento antifúngico con anfotericina B parenteral o algún compuesto azólico es lo indicado.

La detección del microorganismo en la punta del catéter, de retrocultivos o cultivos de sangre periférica en medios de cultivos adecuados lleva a un rápido diagnóstico. El pronóstico es grave y su mortalidad alta.

### ASPERGILOSIS

#### DEFINICIÓN

Es una micosis exógena causada por ciertas especies del género *Aspergillus*, en especial *Aspergillus fumigatus*. Se caracteriza por la presencia de lesiones granulomatosas inflamatorias en la piel, oído externo, senos nasales, órbita, ojo y especialmente bronquios y pulmones. Ocasionalmente puede afectar válvulas



cardíacas, cavidad pleural, mediastino, huesos, cerebro y meninges.

### ECOLOGÍA Y DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

Las especies del género *Aspergillus* están ampliamente distribuidas en la naturaleza, se las encuentra sobre desechos vegetales acumulados en lugares húmedos y templados.

Se observaron infecciones espontáneas en insectos, plantas, animales domésticos y aves, estas últimas parecen ser muy susceptibles, observándose hasta un 40% de infección en pingüinos por *Aspergillus fumigatus*. Estas especies ubicuas, si bien se encuentran en el suelo, sus esporas están flotando en el aire de ambientes rurales y urbanos.

### SINTOMATOLOGÍA. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

Las formas de aspergilosis comúnmente vistas son las enfermedades pulmonares, de las cuales se pueden reconocer tres tipos:

#### 1-Aspergilosis broncopulmonar alérgica y alveolitis extrínseca aspergilar.

La aspergilosis alérgica aparece como un asma a partir de la inhalación de conidios del medio ambiente, se debe a una hipersensibilidad inmediata de tipo I de Gell y Coombs.

La aspergilosis broncopulmonar alérgica es la forma más severa, en ella el hongo desarrolla sobre la membrana bronquial generando una respuesta de hipersensibilidad mixta; en este caso el asma puede ser severa y el esputo sanguinolento. La alveolitis extrínseca aspergilar es semejante al "pulmón de granjero" y se debe a la formación de complejos antígeno-anticuerpo-complemento e hipersensibilidad mediada por células.

El asma aspergilar se da en individuos atópicos, está vinculada a climas templados y húmedos y en general se asocia a trabajadores de granja, silos, acúmulos de heno, etc., o a viviendas húmedas con paredes enmohecidas.

#### 2-Aspergiloma o aspergilosis intracavitaria

También conocida como bola fúngica o micetoma aspergilar. Se produce en cavidades pulmonares preformadas, habitualmente estériles, con amplia comunicación con los bronquios, a donde llegan las esporas. Estas cavidades originadas por una tuberculosis previa, una neumoniosis, quistes hidatídicos evacuados, bullas de enfisemas, cavidades secuenciales de otras micosis sistémicas tales como coccidioidomycosis e histoplasmosis, quistes aeríferos congénitos, abscesos pulmonares cerrados y neumatoceles post-estafilocócicos.

El síntoma más común es la hemoptisis pero puede presentarse como una bronquitis crónica con expectoración purulenta y moderado deterioro del

estado general. Sólo un 10 a 30% de los casos cursan asintomáticos.

#### 3-Aspergilosis invasiva.

Esta forma es la más seria y se produce por fallas en el sistema inmunitario, especialmente por ausencia de polimorfonucleares. Los conidios inhalados llegan a los alvéolos pulmonares y al no ser fagocitados y destruidos por los macrófagos alveolares o los polimorfonucleares de la circulación, germinan en el parénquima pulmonar y los filamentos penetran los vasos sanguíneos, en particular arteriolas, donde producen trombos. Hay necrosis del parénquima pulmonar y una diseminación de émbolos sépticos que generalizan la infección.

En los pacientes neutropénicos (o fuera de la neutropenia con tratamiento inmunosupresor) la manifestación clínica puede ser sinusal (con dolor malar, ocupación de los senos y áreas necróticas en el tabique) o pulmonar. El paciente neutropénico y febril presenta dolor torácico, tos y hemoptisis. La radiografía de tórax puede ser normal pero en la tomografía se evidenciará en los estadios iniciales una imagen nodular con una zona de vidrio esmerilado que lo rodea (imagen de doble halo) que en la evolución se cavitará dando una imagen de aire creciente. Desde la lesión pulmonar se pueden producir émbolos sépticos con impacto en otros órganos, especialmente en piel.

Otras formas de aspergilosis son causadas por implantación directa. Los órganos involucrados pueden ser los oídos (otitis) y los ojos (queratitis).

También se comprobaron casos de bronquitis crónica pseudomembranosa y obstructiva, denominada también aspergilosis semi-invasiva, que se observa en pacientes asmáticos, EPOC, diabéticos, etc, de evolución subaguda y más benigna que la aspergilosis invasiva.

### FRECUENCIA SEGÚN LA EDAD, SEXO, RAZA Y OCUPACIÓN.

Los adultos se infectan con más frecuencia que los niños, y los varones adquieren la enfermedad en mayor porcentaje que las mujeres. Todas las razas son afectadas por igual. Los trabajadores de silos de cereales, los granjeros y personas que están expuestas al polvo de los granos que tienen gran contenido de esporas adquieren la enfermedad con mayor frecuencia.

### FACTORES PREDISONENTES

Las inmunodeficiencias producidas por enfermedades tales como leucemias linfáticas, linfomas, enfermedad de Hodgkin, agranulocitosis, mielomas y tratamientos inmunosupresores tales como terapias prolongadas con corticoides, citostáticos y radiaciones son causas predisponentes y especialmente trasplante de médula ósea alogéneo. Otro factor es la exposición a dosis masivas de esporas, por ejemplo, campesinos



expuestos al polvo de las trilladoras y en general los que aspiran el polvo de los granos o trabajan con restos vegetales depositados en lugares húmedos.

### EVOLUCIÓN

Tiene pronóstico favorable en los casos leves, restringidos a los bronquios, pero grave cuando es afectado el parénquima pulmonar en forma masiva con formación de abscesos.

Las formas alérgicas se producen por brotes, generalmente con buen pronóstico pero, sin tratamiento, provocan fibrosis pulmonar, que con los años lleva a una insuficiencia respiratoria y cardíaca.

Las formas intracavitarias tienen buen pronóstico si la lesión es circunscripta y el pulmón posee buena capacidad funcional, en cuyo caso se puede extirpar el aspergiloma (el tratamiento antifúngico es poco efectivo). Si no se lo extirpa es difícil suponer la evolución del paciente, ya que el hongo puede morir dentro de la cavidad por sí mismo y otras veces provocar hemoptisis fatales.

Las formas diseminadas tienen muy mal pronóstico y el tratamiento es con voriconazol, anfotericina B deoxicicolato o formulaciones lipídicas ó equinocandinas.

## MUCORMICOSIS (ZYGOMICOSIS)

### DEFINICIÓN

Infección aguda caracterizada por la inflamación y trombosis vascular debida a la invasión de las paredes y la luz de los vasos sanguíneos por los *Zygomycetes*. Dependiendo de la puerta de entrada la enfermedad puede afectar cabeza, pulmones, tracto gastrointestinal o piel.

### ECOLOGÍA Y DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

La mucormicosis generalizada aguda tiene distribución mundial y se presenta en individuos comprometidos, con trastornos metabólicos, neutropénicos, mal nutridos, etc. La mucormicosis subcutánea crónica se ve sólo en los trópicos y especialmente en Africa central.

Los hongos involucrados en esta patología se encuentran formando parte de la flora saprófita del suelo, sobre estiércol, frutas o restos de materia orgánica. Están ubicados taxonómicamente en varios géneros de la Clase *Zygomycete*, Orden *Mucorales*. Los géneros más importantes desde el punto de vista clínico son *Rhizopus*, *Absidia*, *Mucor* y *Rhizomucor*.

Se registraron infecciones espontáneas en equinos, bovinos, porcinos, caninos y aves. La enfermedad no se transmite de hombre a hombre ni del animal al hombre.

### SINTOMATOLOGÍA Y CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

El cuadro clínico depende de la localización de la lesión, pudiendo afectar cara y cráneo, pulmones, tejido subcutáneo, tracto gastrointestinal y otras áreas del cuerpo.

La infección de los senos paranasales, nariz, paladar o faringe se produce por la inhalación de esporas aerotransportadas que llegan a los senos paranasales, donde invaden el tejido y desde allí se extienden por contigüidad hacia SNC. Esta forma clínica, conocida como rino-sinuso-órbito-cerebral, es la más común y se presenta generalmente en individuos con diabetes. Comienza como una sinusitis con escasa secreción sanguinolenta y posterior eliminación de coágulos y zonas de necrosis en las mucosas del tabique nasal, los cornetes o el paladar. Generalmente es unilateral y evoluciona hacia la formación de placas de necrosis en la mucosa palatina con posterior perforación del paladar. Los tejidos blandos de la cara se infiltran y la piel toma un tono rojo violáceo. El hongo puede propagarse desde allí hacia el cerebro en cuyo caso se observan signos neurológicos, pérdida unilateral de la visión y disfunción del quinto y séptimo nervio craneal. Se sospecha esta entidad cuando en un paciente diabético no controlado se observa secreción nasal sanguinolenta, dolor facial u orbitario, ptosis palpebral, anestesia periocular localizada, proptosis del ojo con limitación de los movimientos del globo ocular, fijación de la pupila y pérdida de la visión. La forma cerebral se caracteriza por infección orbitaria y meningoencefalitis en pacientes con diabetes no controlada. Esta forma es fatal y la muerte se produce en uno a cinco días de la aparición del cuadro. La mucormicosis pulmonar es una forma primaria que se produce a partir de la inhalación de esporas aerotransportadas, y el paciente en el que suele desarrollarse es el neutropénico.

El cuadro clínico corresponde al de una bronquitis, neumonía o absceso pulmonar con expectoración hemoptoica. Las pleuras pueden verse comprometidas produciéndose derrames serohemáticos, luego hay invasión de las arteriolas con trombosis e isquemia del parénquima pulmonar.

En hospedadores inmunocomprometidos, la infección se extiende a uno o más lóbulos pulmonares y diseminan por vía hematógena a SNC, tracto gastrointestinal y otros órganos, produciéndose trombosis y embolias en múltiples focos. La evolución es aguda y la muerte del paciente sobreviene en una a cuatro semanas y la forma digestiva da síntomas coincidentes con los del infarto intestinal. Puede ser primaria, producida por la ingestión de alimentos contaminados, o secundaria a la forma pulmonar.

Las formas cutáneas y subcutáneas se producen tanto por implantación traumática directa (forma primaria),



como por diseminación (forma secundaria). Las lesiones de la infección primaria se localizan en el tejido subcutáneo del tórax, abdomen, tercio superior del brazo o región pectoral y aparecen como nódulos que aumentan de volumen con el tiempo; el paciente no presenta fiebre, ni dolor, ni hipertrofia de los ganglios linfáticos regionales.

#### FRECUENCIA SEGÚN EDAD, SEXO, RAZA Y OCUPACIÓN

No se conoce ningún tipo de susceptibilidad relacionada a ellos, sólo se asocia a enfermedades primarias debilitantes.

#### FACTORES PREDISONENTES

La inmunosupresión, diabetes, mala nutrición, quemaduras graves, leucemias y otras enfermedades debilitantes y tratamientos con drogas inmunosupresoras son las causas predisponentes más importantes.

#### EVOLUCIÓN Y PRONÓSTICO

Son procesos de evolución aguda y frecuentemente fatal excepto las formas subcutáneas primarias que son de larga duración y la mayoría de las veces curan espontáneamente.

El tratamiento más efectivo es controlar la enfermedad subyacente. La anfotericina B es la droga de elección asociada a una cirugía que remocione todos los tejidos infectados. El posaconazol podría ser de utilidad como tratamiento posterior al inicial.

### CROMOMICOSIS CEREBRAL

#### DEFINICIÓN

Es una infección del SNC caracterizada por la formación de abscesos, cuyo agente causal es *Cladophialophora bantiana* (*Cladosporium trichoides*) u otros hongos dematiáceos

#### ECOLOGÍA Y DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

Los hongos dematiáceos como *C. bantiana*, se encuentran en la naturaleza como saprófitos, asociados a restos vegetales, y están ampliamente distribuidos en el mundo.

#### SINTOMATOLOGÍA Y CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

Los conidios de *C. bantiana*, *Fonsecaea pedrosoi* y *Exophiala (Wangiella) dermatitidis* entre otros hongos de micelio coloreado penetran al organismo por vía inhalatoria, causando una infección mínima, generalmente asintomática, en pulmón, desde donde diseminan produciendo metástasis en cerebro en forma de abscesos, o a meninges sin producir una lesión localizada. *Cladophialophora bantiana* parece tener un

marcado tropismo por el SNC y el cuadro clínico más frecuente es el absceso cerebral.

#### FRECUENCIA SEGUN EDAD, SEXO, RAZA Y OCUPACIÓN.

No se detectó predilección respecto a sexo y raza.

Se presenta en pacientes de mediana edad que ejercen un oficio al aire libre.

#### EVOLUCIÓN Y PRONÓSTICO

El pronóstico es grave y generalmente fatal.

El drenaje quirúrgico y la resección es el único tratamiento efectivo notificado.

### ESPOROTRICOSIS

#### DEFINICIÓN

La esporotricosis es una infección crónica producida por *Sporothrix schenckii*. Se caracteriza por la formación de lesiones nodulares en piel y tejidos subcutáneos y ganglios linfáticos que se ablandan y ulceran.

En casos excepcionales la infección se produce por vía inhalatoria y se disemina dando formas viscerales o generalizadas considerándose en este caso una micosis sistémica oportunista. Estas formas clínicas se asocian a etilistas crónicos y a individuos inmunosuprimidos.

#### ECOLOGÍA Y DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

*Sporothrix schenckii* es un hongo dimórfico que vive saprofiticamente en el suelo asociado a restos vegetales, madera húmeda, árboles, plantas y cuevas de peludo (tatú mulita).

Tiene distribución mundial pero su frecuencia de aparición aumenta en las regiones cálidas o templadas y húmedas especialmente de América del Sur y Central.

Los animales y el hombre se infectan por inoculación traumática del hongo en el tejido y con menor frecuencia por vía inhalatoria.

La esporotricosis espontánea se describió en caballos, mulas, perros, gatos, ratas y ratones.

#### SINTOMATOLOGÍA Y CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

La forma linfagítica, más frecuente, se caracteriza por la aparición de una lesión papular en el punto de inoculación que luego se ulcera y a partir de la cual se produce una linfangitis nodular y adenopatías regionales. En el 75 % de los casos se desarrollan nódulos múltiples a lo largo de los vasos linfáticos, que luego se ulceran. Los vasos linfáticos que unen los nódulos entre sí se engrosan y endurecen tornándose



palpables. La infección generalmente se asienta en las manos y asciende por los brazos hasta los ganglios axilares donde habitualmente se detiene; de forma similar, si la infección se inicia en las extremidades inferiores avanza hasta la ingle y se detiene.

La forma cutánea fija, presenta placas aisladas dermoepidérmicas, habitualmente vegetantes, de evolución crónica.

En la forma generalizada, se observan lesiones osteoarticulares, hepatoesplenomegalia, compromiso pulmonar y raras veces involucra SNC.

La forma pulmonar aparece como una neumonitis y bronquitis, pudiendo llegar a ser crónica. Se caracteriza por masas nodulares y cavidades con aumento de los ganglios mediastínicos e hiliares. El ensanchamiento de los nódulos linfáticos transbronquiales puede causar obstrucción bronquial.

#### **FRECUENCIA SEGÚN EDAD, SEXO, RAZA Y OCUPACIÓN**

Todas las edades y ambos sexos son infectados, pero los hombres son más afectados probablemente por estar más expuestos. Todas las razas son igualmente susceptibles.

Es más frecuente en agricultores, floricultores e individuos que se dedican a la caza de armadillos extrayéndolos desde sus cuevas. A veces ocurre por inoculación accidental en amas de casa, personas que trabajan en basureros, etc.

#### **FACTORES PREDISPONENTES**

El contacto con el reservorio del hongo es uno de los factores predisponentes más importantes, pero se conoce muy poco respecto a otros posibles factores. La esporotricosis pulmonar se vio asociada a etilismo con mucha frecuencia.

#### **EVOLUCIÓN Y PRONÓSTICO**

Dependiendo del cuadro clínico, el pronóstico es muy bueno cuando las lesiones son cutáneas y más grave para las viscerales; las primeras se tratan con solución saturada de yoduro de potasio y tienen buena respuesta. Las formas viscerales y osteoarticulares, en cambio, se tratan con antifúngicos de uso sistémico.

### **NEUMOCISTOSIS**

#### **DEFINICIÓN**

Es una neumonía intersticial de células plasmáticas, que ocurre en pacientes inmunocomprometidos, cuyo agente es *Pneumocystis jirovecii*, el cual, hasta hace poco tiempo, se lo ubicaba taxonómicamente como un parásito, pero actualmente se lo considera un hongo ya

que por técnicas de biología molecular se determinó que es más afín al reino Fungi.

#### **ECOLOGÍA Y DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA**

Es de distribución mundial y no se transmitiría naturalmente por contacto interhumano.

#### **SINTOMATOLOGÍA. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS**

La infección esta asociada a SIDA, siendo una de las principales infecciones marcadoras del síndrome, se considera que 65% de los pacientes HIV desarrolla la neumonía.

#### **FRECUENCIA SEGÚN EDAD, SEXO, RAZA Y OCUPACIÓN**

Es frecuente en individuos de ambos sexos. Es independiente de la raza y la ocupación del hospedador.

#### **FACTORES PREDISPONENTES**

Está relacionado al retrovirus causante de la inmunodeficiencia en humanos y a otras enfermedades donde hay marcada inmunosupresión.

#### **EVOLUCIÓN Y PRONÓSTICO**

El tratamiento debe ser instaurado inmediatamente. La tasa de mortalidad varía entre 10-50% en cada episodio.

### **OTRAS MICOSIS SISTÉMICAS POR HONGOS MICELIALES OPORTUNISTAS**

Son enfermedades causadas por hongos miceliales saprófitos que invaden los tejidos de individuos con graves alteraciones de la inmunidad. En el cuadro del capítulo correspondiente a clasificación de las micosis profundas se enumeran algunos de los agentes causales de estos tipos de micosis, sin embargo, estos se incrementan día a día.

El cuadro clínico depende del sitio de localización de la infección y del grado de diseminación de la misma. Los factores predisponentes son los mismos que se detallaron para candidiasis sistémicas.



## INFECCIONES FÚNGICAS NOSOCOMIALES

La incidencia de las infecciones fúngicas ha aumentado en los últimos años de forma alarmante y en la actualidad son una importante causa de morbimortalidad ocupando un papel muy importante entre las infecciones nosocomiales.

Este aumento ha venido aparejado a las nuevas tecnologías, desarrolladas para aumentar la sobrevivencia de los pacientes con enfermedades terminales.

Los trasplantes de órganos y de médula ósea, la aparición de nuevos anticancerígenos, antimicrobianos y fármacos que evitan el rechazo del órgano trasplantado, y el desarrollo de nuevas técnicas quirúrgicas, producen una profunda inmunosupresión del paciente haciéndolo susceptible a la invasión por cualquier microorganismo.

El aumento de la incidencia de las infecciones fúngicas sistémicas en pacientes inmunocompetentes también es alarmante, especialmente en aquellos sometidos a intervenciones quirúrgicas (especialmente del tracto gastrointestinal), internados en unidades de cuidados intensivos, con quemaduras extensas o sometidos a diálisis.

Las especies del género *Candida* están emergiendo como el principal patógeno nosocomial tanto en pacientes con enfermedades graves, como en pacientes inmunocomprometidos.

*Candida albicans* es el patógeno más importante en una variedad de infecciones, incluyendo artritis, osteomielitis, endoftalmítis, endocarditis, miocarditis, fungemia primaria y secundaria, meningitis y peritonitis. *C. albicans* y *C. tropicalis* son las especies más frecuentemente aisladas de especímenes clínicos; sin embargo, las comunicaciones internacionales más recientes indican un cambio en la distribución de las infecciones causadas por levaduras, observándose un aumento en las fungemias debidas a *Candida glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* y *C. lusitanae*.

Es importante destacar la aparición de *C. glabrata* como la 2ª especie en frecuencia luego de *C. albicans* en EEUU. Esto también fue observado por Voss *et al.* en 5 hospitales holandeses, donde observaron un aumento de *C. glabrata* que estaba asociada a candidemias en un 5,7 % en 1987, mientras que en 1995 llegó a un 17 %.

Sin embargo, la baja frecuencia de aparición de esta especie y la inexistencia de *C. krusei* en Sudamérica podría sugerir que esta diferencia puede ser debida al aumento en el uso de triazoles en los países más desarrollados, lo que generaría una presión de selección.

Por otra parte, el alto número de candidemias producidas por *C. parapsilosis* en Sudamérica podría estar asociado a un bajo control de la infección

nosocomial, ya que esta especie juega un papel fundamental como patógeno exógeno.

La aparición de drogas azólicas de fácil administración y escasos efectos colaterales (fluconazol e itraconazol) y su amplio uso en profilaxis o en tratamientos continuos a bajas dosis en pacientes infectados con HIV, ha traído aparejada esta selección de especies resistentes al fluconazol (*C. krusei*), de especies que adquieren rápidamente resistencia (*C. glabrata*) y permite que algunas cepas de *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis* también puedan adquirir resistencia e inclusive presentar resistencia cruzada con otras drogas azólicas.

**Los factores de riesgo más importantes en candidiasis diseminada son: colonización, uso de catéteres venosos centrales y exposición a tratamientos múltiples con antibióticos (más de 2).**

El Instituto Nacional de Cáncer (EE.UU.) informó que en la década del 50 el 10% de los pacientes con leucemia moría por infecciones fúngicas, en los 60 el número había aumentado a 30% y en los 70 estaba por encima del 40%. Los agentes más comunes fueron *Candida* spp. (2/3 de las infecciones) y *Aspergillus* spp., pero se detectaron otros como *Trichosporon* spp. y *Fusarium* spp.

Actualmente la candidiasis sistémica ocurre en 20-40% de los pacientes con enfermedades hematológicas malignas y en 10-20 % de los pacientes con trasplante de médula ósea.

Las aspergilosis nosocomiales, aunque menos frecuentes que las candidiasis, son una de las causas más comunes de las neumonías nosocomiales en las unidades de trasplante de médula ósea y de pacientes oncohematológicos, y se asocian con una mortalidad del 85 %.

Cuando el grupo se acota a los paciente neutropénicos se observa que en el 95% de los casos la infección primaria es bacteriana pero, dependiendo del tipo de granulocitopenia del paciente, la infección fúngica secundaria aumenta su frecuencia. En los pacientes con granulocitopenias de corta duración (<1000 neutrófilos/mm<sup>3</sup> <14 días) la infección fúngica es rara, pero en las granulocitopenias prolongadas (<1000 neutrófilos/mm<sup>3</sup> >14 días) son frecuentes y generalmente fatales.

Además de las infecciones sistémicas graves producidas por los patógenos habituales *Candida* spp., *Aspergillus* spp. y *Zigomycetes*, se han detectado en número creciente otras debidas a *Fusarium* spp., *Malassezia* spp, *Trichosporon beigeli*, hongos dematiáceos y otros hongos habitualmente no patógenos.

Las levaduras lipofílicas pertenecientes al género *Malassezia*, responsables hasta hace pocos años sólo de la pitiriasis versicolor, han sido aisladas de infecciones



sépticas en pacientes con alimentación parenteral suplementada con ácidos grasos.

*Trichosporon beigeli*, conocido como saprófito ambiental y responsable de la piedra blanca, ahora aparece en infecciones sistémicas frecuentemente fatales en pacientes inmunocomprometidos.

Por otra parte, infecciones poco comunes como las causadas por *Fusarium* spp., han incrementado en pacientes con trasplantes de MO o con cáncer, y tienen una tasa de mortalidad próxima al 100% en pacientes con neutropenia persistente.

La criptococosis, a raíz de la pandemia del SIDA, aumentó drásticamente el número de casos hasta convertirse en una de las micosis emergentes más graves. Las formas meníngeas en los pacientes infectados con HIV se asocian con una significativa morbimortalidad y ocupa el cuarto lugar dentro de las complicaciones infecciosas que comprometen la vida de estos pacientes.

Cabe señalar la importancia de participar en estudios multicéntricos y próximamente realizar la notificación a través del **Sistema de Vigilancia Laboratorial (SIVILA)**, dependiente del Ministerio de Salud de la Nación. Esto nos permitirá conocer la situación actual y controlar a lo largo del tiempo la aparición de nuevas especies como agentes causales de infección nosocomial, conocer su incidencia y perfil de resistencia a los antifúngicos, comparar la situación con centros homólogos argentinos y extranjeros y contar con datos epidemiológicos de nuestro país.

Por último es necesario recordar que, para controlar estas infecciones, es imprescindible identificar los aislamientos a nivel de especie, realizar estudios de sensibilidad a antifúngicos cuando se detectan fallas en el tratamiento y confirmar posibles brotes mediante técnicas de biología molecular. Estas metodologías requieren de una experiencia que no es fácil de adquirir cuando no se estudia un gran número de cepas. Por ello las técnicas de identificación de especies poco comunes, la determinación de la sensibilidad a los antifúngicos "in vitro" y la subtipificación específica molecular de algunas especies fúngicas se centralizan en el Departamento Micología del INEI, ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán", que actúa como Laboratorio Nacional de Referencia de la Red Nacional de Laboratorios de Argentina en esta especialidad, y se encuentran disponibles para centros de salud del ámbito oficial y privado cuando sea necesario.

Muchos laboratorios en Argentina pueden identificar los patógenos habituales *Candida* spp., *Aspergillus* spp. y *Zygomycetes*, pero pocos son capaces de identificar patógenos emergentes y cepas resistentes a las drogas antifúngicas de uso clínico convencional al nivel de especie.

A fin de poder detectar estos aislamientos en forma temprana que permita implementar un tratamiento adecuado, se hace imprescindible un correcto diagnóstico en el lugar de origen. Por otro lado, el conocimiento de los patrones de sensibilidad de los agentes causales permitirá preestablecer tratamientos empíricos acordes a la situación epidemiológica del país, y además determinar en qué casos y en qué aislamientos será conveniente realizar estudios de sensibilidad "in vitro".

Los agentes etiológicos de las infecciones fúngicas nosocomiales son todos hongos saprófitos o comensales, capaces de encontrar las condiciones óptimas para crecer en el cuerpo humano y causar una enfermedad infecciosa. Se encuentran normalmente en el suelo, sobre animales o vegetales o asociados a ellos, y no forman parte de la flora humana normal (excepto *C. albicans*, que se encuentra en la mucosa orofaríngea y gastrointestinal de la mayoría de los individuos, y *Candida parapsilosis* y *Malassezia* spp. que generalmente forman parte de la flora normal de la piel). Sólo pueden invadir los tejidos de los individuos con alteraciones de la inmunidad ya sea por enfermedades inmunosupresoras, causas naturales o iatrogénicas, y necesitan una puerta de entrada por piel o pulmones. Como mencionamos anteriormente, muchos hongos diferentes han sido encontrados como agentes causales de infecciones en estos pacientes y continúan apareciendo nuevos. Sin embargo, los que se ven con más frecuencia son las levaduras, especialmente las del Género *Candida*, *Aspergillus fumigatus* y otros *Aspergillus*; *Zygomycetes*, en particular los de los Géneros *Mucor* y *Rhizopus*; *Trichosporon beigeli*; *Pseudoallescheria boydii* y *Fusarium* spp.

Muchas localizan en pulmones, pero también pueden invadir piel y sistema músculo-esquelético.



## INFECCIONES BACTERIANAS SIMILARES A MICOSIS SISTÉMICAS

### NOCARDIOSIS

#### DEFINICIÓN

Es una infección pulmonar primaria supurativa, aguda o crónica, producida generalmente por *Nocardia asteroides* y con menos frecuencia por *Nocardia brasiliensis*, que puede diseminarse a tejido subcutáneo y otros órganos corporales con especial predilección por cerebro y meninges. Se caracteriza por la producción de abscesos múltiples en los que se observan filamentos bacterianos delgados, ramificados, parcialmente ácido-alcohol resistentes y Gram positivos o Gram variables.

#### ECOLOGÍA Y DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

*Nocardia asteroides* y *N. brasiliensis* son bacterias aerobias que se encuentran habitualmente en el suelo y tienen una amplia distribución mundial. Existe en la naturaleza una gran variedad de animales que sufren infecciones espontáneas. No se transmite de hombre a hombre ni del animal al hombre.

#### SINTOMATOLOGÍA Y CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

Las bacterias penetran al organismo por vía inhalatoria y llegan al pulmón, donde se produce la primoinfección que con frecuencia se manifiesta como un cuadro respiratorio leve, que cura espontáneamente. Sólo un pequeño número de pacientes desarrolla formas clínicas severas que pueden diseminarse a SNC. La infección pulmonar puede ser benigna, aguda o crónica. Las formas benignas, con cuadros respiratorios leves, curan espontáneamente; las formas agudas cursan con escalofríos, fiebre de 39 a 40 °C, tos con expectoración mucopurulenta hemóptica o con franca hemoptisis en general asociado a dolor pleural, astenia y deterioro del estado general del paciente. En formas más avanzadas se producen empiemas libres o bloqueados; la fistulización de la pared torácica es rara. Cuando se observan estas formas severas el paciente

generalmente está inmunosuprimido por causas naturales o iatrogénicas.

A partir del pulmón la infección suele diseminarse por vía hematógena produciendo abscesos subcutáneos o cerebrales únicos o múltiples. Los síntomas de los abscesos cerebrales son semejantes a los que origina cualquier absceso bacteriano o de otro tipo con vómitos, convulsiones, cefalea y edema de pupila. El compromiso meníngeo ocasiona trastornos visuales y modificaciones del carácter entre otros síntomas.

Las nocardiosis pulmonares, deben descartarse toda vez que se detecten abscesos subcutáneos a *N. asteroides*. Las infecciones percutáneas provocadas por inoculación traumática de estas bacterias originan micetomas actinomicóticos, los cuales se mencionan brevemente a posteriori.

#### FRECUENCIA SEGÚN EDAD, SEXO, RAZA Y OCUPACIÓN

La infección se produce en todas las edades pero con mayor incidencia entre los treinta y cincuenta años. Los hombres se ven más afectados que las mujeres pero no se observa ninguna relación con las razas y la ocupación.

#### FACTORES PREDISPONENTES

La predisposición más frecuente son los tratamientos con corticoides en pacientes con trasplantes de órganos sólidos o médula ósea, enfermedades oncohematológicas, y SIDA.

#### PRONÓSTICO Y EVOLUCIÓN

La evolución y el pronóstico dependen de la forma clínica. El diagnóstico precoz y el tratamiento apropiado llevan a una conveniente resolución de los cuadros pulmonares. La infección generalizada con compromiso del SNC es a menudo fatal aun con tratamiento específico. Las sulfamidas son muy activas frente a *N. asteroides* tanto "in vitro" como "in vivo".



## EL LABORATORIO DE MICOLOGÍA

Los equipos, el instrumental y otros elementos requeridos para trabajar en micología son similares a los utilizados en los laboratorios de bacteriología. Sólo hay diferencia en pequeñas particularidades que en su mayoría son accesibles y de bajo costo. El único aparato costoso imprescindible para trabajar con hongos patógenos primarios agentes de micosis sistémicas, es la cabina de seguridad biológica Clase II (CSBII) (figura 1), sin embargo, este no es necesario para estudiar cepas de levaduras. El resto de los equipos son comunes y se compone de: microscopio binocular con objetivos de 10x, 20x, 40x y 100x; cámaras de cultivo de 35 -37 °C y de 25 - 28 °C, centrífuga de mesa, heladera, autoclave y mechero de Bunsen

Cuando la complejidad del laboratorio es mayor se requieren baños termostatzados y estufas de 35-37 °C con atmósfera de anhídrido carbónico y de 32 °C.

El instrumental necesario comprende: ansas, pinzas, tijeras, bisturís y agujas de disección. La aguja del ansa para subcultivo debe ser rígida y consiste en un hilo de nicrón de 0,7-1,0 mm de diámetro cuyo extremo se aplasta y dobla en ángulo recto y se monta en un mango largo.

Los reactivos específicos para micología son el KOH al 10%, la Tinta China y el azul de lactofenol (LF-AA). Los medios de cultivo para aislamiento primario de mohos y levaduras son: agar Sabouraud glucosa AGS, que se usa sólo o adicionado de cicloheximida y/o antibióticos; el agar infusión cerebro corazón BHI-S, y agar adicionados con bilis de buey u otros más específicos para aislamiento de levaduras lipofílicas.

Los medios de cultivo pueden fraccionarse en placas, tubos o botellas de 100 ml. Por razones de bioseguridad se prefieren los tubos, ya que estos disminuyen las posibilidades de diseminación de los conidios de los hongos que desarrollan pudiendo provocar infecciones al personal. A su vez, el uso de tubos reduce la contaminación del material con esporos del ambiente de trabajo que pueden provenir de hongos saprófitos u oportunistas, desarrollando en los medios e induciendo a errores en el diagnóstico. Las botellas son mejores porque proveen una mayor superficie para el desarrollo de colonias aisladas, pero resultan costosas, por este motivo para el trabajo de rutina se utilizan tubos con tapón de algodón o a rosca. **Las placas se reservan para el aislamiento de levaduras y bacterias y no se emplean para ningún otro material o cepa**, aún cuando se cuente con equipo de seguridad biológica y personal experimentado para la inoculación y examen de muestras provenientes de secreciones respiratorias, orinas, sangre, etc.

Es conveniente sembrar los materiales, sobre todo los de origen respiratorio, con mucha precaución, ya que muchas de las micosis sistémicas requieren diagnóstico diferencial de tuberculosis, y a veces pueden ir asociadas a esta. Es recomendable la siembra siguiendo las normas de bioseguridad, uso de guantes, antiparras y respiradores (figura 2), estos últimos poseen una tela no tejida de polipropileno y poliéster que actúa como filtro con una eficiencia entre 95- 99% según el modelo. Nosotros recomendamos los respiradores tipo 3M N95 o N100 (Catálogo 9332)

En el caso de trabajar con cepas sospechosas de ser hongos dimorfos, y no poseer equipo se debe agregar SF estéril al tubo (figura 3), dejar reposar y finalmente trabajar la cepa, siempre siguiendo las normas de bioseguridad.

Para su identificación definitiva es conveniente enviar los hongos dimórficos a un centro de referencia para que se le realicen pruebas de dimorfismo y producción de exoantígenos.



Figura 1



Figura 2

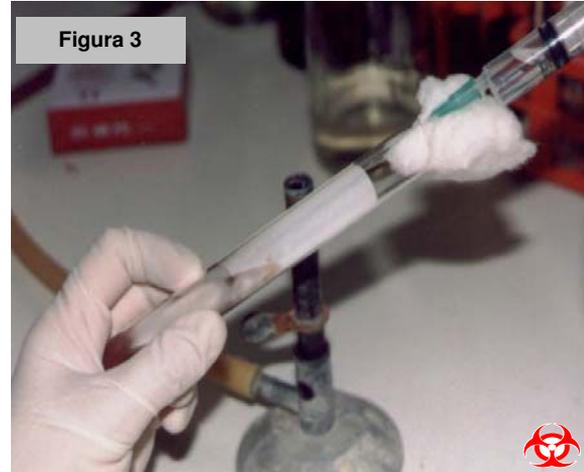


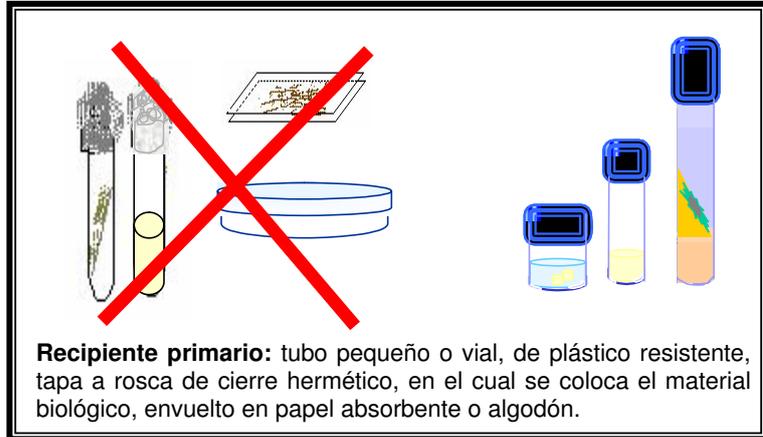
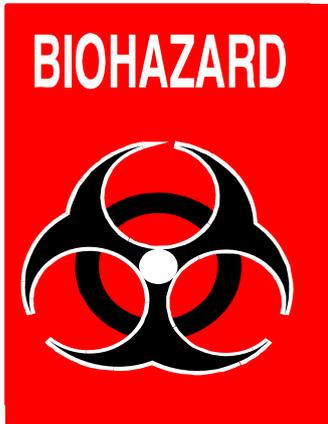
Figura 3

#### MEDIDAS DE BIOSEGURIDAD

1. Todos los hongos filamentosos aislados de muestras clínicas provenientes de pacientes bajo sospecha de micosis sistémica deben ser procesados dentro de la CSB II. NUNCA SE TRABAJAN FUERA DE LA CSB II hongos aislados de muestras de sangre, esputo, biopsias, orina y otros fluidos corporales, pus, exudados, secreciones o líquidos de drenaje, hayan sido enviados o no para diagnóstico micológico.
2. NUNCA OLER LOS CULTIVOS. Si no se posee un equipo es imprescindible estudiar la cepa agregando al cultivo solución fisiológica estéril, introduciéndola entre el tapón de algodón y la pared del tubo ayudados de una jeringa y aguja. Se deja reposar el cultivo cubierto de la solución unas horas para que decanten los conidios, luego se procede a retirar el trozo de micelio necesario para realizar el estudio morfológico o repicar la cepa. Lo más conveniente es derivar la cepa al laboratorio de referencia ya que la humectación del cultivo disminuye el riesgo pero no lo elimina.
3. No trabajar con cepas de *H. capsulatum* ni *Coccidioides* sp. si no se posee CSB II.
4. NUNCA PIPETEAR CON LA BOCA, utilizar siempre propipetas.
5. Esterilizar en autoclave todos los especímenes y cultivos antes de descartarlos y no conservar ni acumular cultivos innecesarios.
6. Utilizar tubos con tapa a rosca o con tapón de algodón para preparar los medios para aislamiento primario, subcultivo o conservación de cepas de colección.
7. Desinfectar diariamente las áreas de trabajo y las mesadas. No dejar acumular polvillo en las esquinas y/o rendijas donde puedan acumularse conidios.
8. No tener macetas con plantas en el laboratorio donde se procesen los especímenes clínicos o cepas. Los hongos pueden crecer en la tierra, incluso los patógenos primarios.
9. Evitar que las embarazadas trabajen con cultivos de *Coccidioides* sp. ya que son más susceptibles que el resto de los individuos a este hongo.

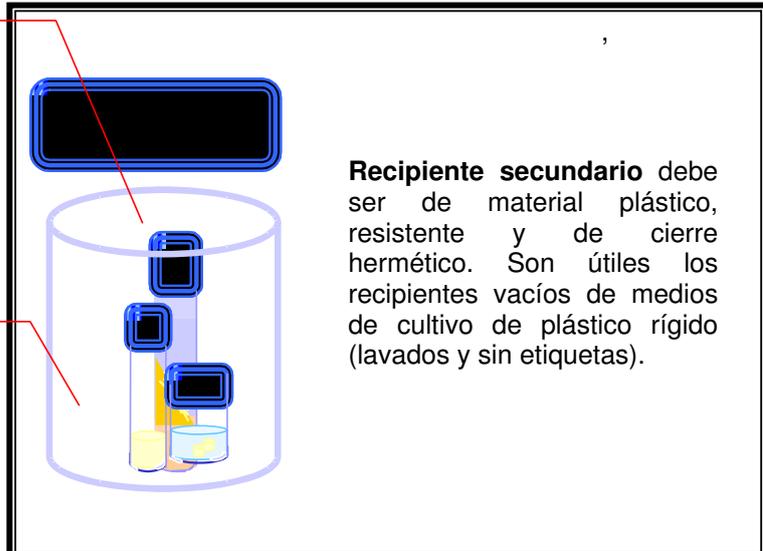


## SISTEMA DE TRIPLE ENVASE PARA TRANSPORTE DE MATERIAL BIOLÓGICO



**Recipiente primario:** tubo pequeño o vial, de plástico resistente, tapa a rosca de cierre hermético, en el cual se coloca el material biológico, envuelto en papel absorbente o algodón.

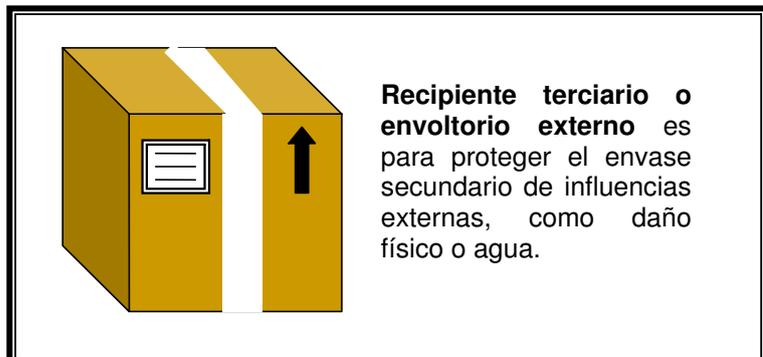
Llenar el espacio entre los recipientes primario y secundario con suficiente material absorbente (papel o algodón), para absorber el contenido del recipiente primario, en caso que ocurra una pérdida durante el transporte.



**Recipiente secundario** debe ser de material plástico, resistente y de cierre hermético. Son útiles los recipientes vacíos de medios de cultivo de plástico rígido (lavados y sin etiquetas).

Pegar con cinta adhesiva, en el exterior del recipiente secundario, el sobre con los formularios con datos del espécimen, notas y otro tipo de información que identifiquen o describan la muestra y también identifiquen al remitente y al destinatario.

Coordinar con quién recibe las muestras, de forma que llegue a tiempo y en buenas condiciones. Estos arreglos con el destinatario, previos al envío, permiten asegurarse que las muestras sean aceptadas y conservadas convenientemente.



**Recipiente terciario o envoltorio externo** es para proteger el envase secundario de influencias externas, como daño físico o agua.

Cuando sea necesario refrigerar la muestra y use hielo común o hielo seco se debe colocar afuera del recipiente secundario en un envase a prueba de fugas de líquido. Para mantener el hielo seco se requiere un paquete extra especialmente diseñado como aislante



**PROTOCOLO UNIFICADO PARA LA DERIVACIÓN DE MUESTRAS Y CEPAS**

**DATOS DEL PACIENTE**

Apellidos y Nombre:		
Edad:	Sexo: H ( ) M ( )	Nacionalidad:

**DATOS DE LA INSTITUCION QUE DERIVA**

Dr.:	Servicio:		
Hospital y/o Institución	Provincia:		
C. postal	e-mail:	TE:	Fax:

**SOLICITUD**

Examen directo ( )	Cultivo ( )	Identificación de aislamiento ( )	Búsqueda de <i>Pneumocystis jirovesii</i> ( )			
Sensibilidad AB ( )	5FC ( )	FCZ ( )	ITZ ( )	KTZ ( )	MCZ ( )	Otro:.....
Anticuerpos anti <i>H. Capsulatum</i> ( )	<i>Coccidioides</i> sp. ( )	<i>P. brasiliensis</i> ( )	<i>Candida</i> ( )			
<i>Aspergillus</i> spp. ( )	<i>Aspergillus fumigatus</i> ( )	<i>Aspergillus niger</i> ( )	<i>Aspergillus flavus</i> ( )			
Detección de antígeno de <i>Cryptococcus neoformans</i> ( )			Detección de antígeno de <i>Aspergillus</i> ( )			

**MOTIVO**

Diagnóstico ( )	Control de Tratamiento ( )
Episodio recidivante ( ) Nº de episodio: ( ) Nº referencia de muestra/s anterior/es:	

**Todos los datos requeridos a continuación son imprescindibles para el procesamiento de la muestra**

**PARA ENVIO DE ESPECIMENES CLINICOS**

Suero ( )	LCR ( )	Hemocultivo ( )	Orina por punción ( )	Otras:
Cortes histológicos o improntas para coloraciones especiales ( )		Muestra de origen pulmonar ( )	Biopsia ( )	Especificar .....

**PARA ENVIO DE AISLAMENTOS**

Levaduras ( )	Hongo micelial ( )	Hongo dimórfico ( )			
<b>NUMERO DE REFERENCIA DE SU MUESTRA:</b>		Fecha recolección:			
<b>ORIGEN DEL AISLAMIENTO ENVIADO</b>					
Hemocultivo ( )	Hemo-retrocultivo ( )	Cateter ( )	Biopsia ( ) (especificar).....		
Orina por sonda ( )	Orina por punción ( )	Micción media ( )	LCR ( )	Ex. Orofaringeo ( )	Ex. Vaginal ( )
Piel ( )	Pelo ( )	Uña ( )	Muestra de origen pulmonar ( )	Especificar:	
Examen directo → Positivo ( ) Negativo ( )			<b>Desarrollo en cultivo</b>		
Especificar estructuras observadas:.....			puro ( ) mixto ( )		
			Especificar:.....		

**DATOS CLINICOS**

Diagnóstico presuntivo:	
Fecha de inicio de los síntomas:	
Inmunodepresión: No ( ) Si ( ) Especificar:	
Otra enfermedad subyacente	
Antecedente de enfermedad pulmonar No p Si p Especificar:..	
Paciente con catéter No ( ) Si ( ) Desde.....Hasta.....	
Paciente con sonda No ( ) Si ( ) Desde.....Hasta.....	
Tratamiento: AB ( ) 5FC ( ) FCZ ( ) ITZ ( ) Otros:.....Desde.....Hasta.....Dosis: .....	
Lugar de Residencia: Otras provincias o países que visitó o habitó:	
Otros datos (contacto con animales, vegetales, madera, trabajo rural, etc.):	
Responsable del envío:	Fecha del envío:



## DIAGNÓSTICO DE LAS MICOSIS

El diagnóstico micológico se apoya en tres procedimientos básicos: (I) la orientación clínico-etiológica, (II) la epidemiología y (III) el examen micológico.

### (I) LA ORIENTACIÓN CLÍNICO-ETIOLÓGICA:

Esta se fundamenta en el estudio del cuadro clínico que presenta el paciente. Tanto las micosis superficiales como las profundas, oportunistas o no, presentan un cuadro más o menos definido que orienta al médico sobre la posible etiología micótica de la afección y lo induce a solicitar un examen micológico. Sin embargo muchas veces es necesario realizar diagnóstico diferencial con otras enfermedades, infecciosas o no, debido a la similitud de sus cuadros clínicos.

### (II) EPIDEMIOLOGÍA:

Los agentes causales de las micosis tienen un nicho ecológico propio, viven saprofiticamente asociados a determinados seres vivos, a sus madrigueras o a los restos de materia orgánica que ellos producen, pudiendo en muchos casos, tener reservorios naturales geográficamente definidos que son coincidentes con el área endémica de la infección que producen.

Los pacientes inmunocomprometidos, a su vez, son muy susceptibles a las micosis sistémicas graves, provocadas por hongos patógenos primarios u oportunistas, capaces de crecer a 37°C.

Por otra parte, muchas micosis tienen como causas predisponentes otras enfermedades y/o tratamientos debilitantes o inmunosupresores.

Con el objeto de orientar la búsqueda hacia determinado agente causal o hacia un grupo de ellos, en el caso de las micosis profundas es necesario:

1. Interrogar al paciente respecto a su trayectoria residencial a fin de determinar si vivió o visitó el área endémica de alguna de las micosis profundas en cualquier período de su vida, ya que las micosis sistémicas pueden manifestarse mucho tiempo después de haberse producido el contacto con el agente causal.

2. Conocer la trayectoria ocupacional del paciente y sus hábitos de esparcimiento con el objeto de detectar la posibilidad de contacto entre éste y el reservorio del agente causal; para ello se requiere saber si el paciente refiere: contacto con plantas, animales o suelos durante sus horas de trabajo o esparcimiento; heridas o traumatismos producidos por vegetales o piedras, mordeduras o arañazos de animales silvestres y hábitos

de caza que impliquen extracción de animales silvestres desde sus cuevas.

3. Determinar si el paciente está o estuvo recientemente medicado con antibióticos, corticoides, citostáticos o radiaciones; si fue sometido a diálisis o transplantes y si tiene antecedentes de TBC, diabetes mellitus, quemaduras graves, leucemias, SIDA u otras enfermedades debilitantes como el alcoholismo.

Este amplio interrogatorio generalmente realizado por el médico debe ser conocido por el laboratorio para aumentar el rango de seguridad de los métodos de diagnóstico micológico.

La sospecha de una determinada micosis permite:

- a) Seleccionar los medios y temperaturas de cultivo más aptos para el desarrollo del hongo.

- b) Elegir el método adecuado de examen directo para la mejor detección del agente en el tejido del hospedero.

- c) Sugerir los análisis complementarios que se crea conveniente.

- d) Interpretar el rol que cumple el agente aislado cuando este no es un patógeno primario.

La conveniencia de una ficha de resumen de datos como la que se propone en párrafos posteriores, frente a un resumen de historia clínica del paciente se basa en que al ser la ficha un cuestionario dirigido puntualiza los datos que necesita conocer el micólogo para realizar su trabajo de laboratorio.

### (III) EL EXAMEN MICOLÓGICO:

Es el conjunto de técnicas y procedimientos, directos o indirectos, que permiten demostrar la presencia de los hongos parasitando el tejido del hospedador. Los más difundidos son, el examen directo del espécimen clínico, el cultivo y las reacciones inmunológicas, pudiéndose utilizar todos o algunos de ellos dependiendo del tipo de micosis a diagnosticar y el nivel de complejidad del laboratorio.

En muchos casos el hallazgo de un hongo a través del **examen micológico** tiene valor diagnóstico por sí solo si se trata de un patógeno primario, este es el caso de los dermatofitos y los agentes dimórficos de micosis sistémicas. Otras veces el examen micológico solo pone de manifiesto un hongo saprófito o comensal, en estos casos es necesario determinar su importancia clínica basándose en las características del cuadro y del paciente.

La conjunción de estos tres procedimientos básicos del **diagnóstico micológico** permite detectar la totalidad de las micosis profundas, sean estas oportunistas o no.



## EL EXAMEN MICOLÓGICO

Es el que se realiza en el laboratorio con el fin de confirmar una sospecha clínica o como parte de un diagnóstico diferencial. Consta de los siguientes pasos, pudiéndose utilizar todos o solo alguno de ellos, dependiendo del cuadro clínico que presenta el paciente y de la micosis sospechada.

- I. Elección, recolección, transporte y conservación de muestras.
- II. Examen directo del espécimen.
- III. Cultivo del espécimen.
- IV. Inoculación en animales susceptibles.
- V. Pruebas inmunológicas.
- VI. Técnicas de biología molecular.

### I-ELECCIÓN, RECOLECCIÓN, TRANSPORTE Y CONSERVACIÓN DE MUESTRAS

La elección del tipo de muestra a recoger según sea la patología que presenta el paciente y la calidad de la misma, son tan importantes o más que la experiencia del micólogo para el correcto diagnóstico.

Si el espécimen entregado al laboratorio para su análisis es de mala calidad, inútiles serán los esfuerzos del laboratorio para detectar y recuperar los hongos que parasitan los tejidos del hospedador.

La correcta recolección, transporte y procesamiento de las muestras son esenciales para tener una buena recuperación de los agentes de las micosis profundas y superficiales.

Las técnicas para toma, conservación, envío y procesamiento de muestras varían según el tipo de micosis sospechada.

Para el estudio de las micosis profundas se utilizan una gran variedad de técnicas de recolección de especímenes, muchas de las cuales deben ser practicadas por el médico de acuerdo al síndrome que presenta el paciente, entre ellas se encuentran los esputos, aspirados transtraqueales, lavados bronquiales, biopsia, raspado de úlceras y punciones. Deben ser inoculadas directamente en los medios de cultivo o recogidas en recipientes herméticos, irrompibles y bioseguros, que proporcionen un ambiente húmedo, que permita la supervivencia de los hongos patógenos. Se considera que el tiempo máximo que puede transcurrir entre su recolección, procesamiento e inoculación en los medios de cultivo no puede ser mayor que dos horas, por lo que en la mayoría de los casos es necesario inocular los tubos "in situ" y luego enviarlos al laboratorio junto con los frotis requeridos para los exámenes microscópicos.

### II-EXAMEN DIRECTO DEL ESPECIMEN

El examen microscópico directo del material es un método directo de diagnóstico porque permite

demostrar la presencia "in situ" del hongo en actitud parasitaria dentro de los tejidos del hospedador.

Es el método más rápido, económico y valioso para el diagnóstico de todas las micosis si, como dijimos antes, la muestra es de buena calidad, fue recogida estérilmente y se remitió al laboratorio en las condiciones adecuadas.

Las modalidades para efectuar el examen directo y la elección de una o un grupo de ellas, depende del tipo de muestra a estudiar y del hongo o grupo de hongos que se sospeche. Incluye la observación en fresco del material con o sin aclaramiento, tinción o contraste, la coloración de improntas o frotis por los métodos de Gram, Kinyoun (KY), Giemsa y Ziehl-Neelsen (ZN) y cortes histológicos teñidos con sales de plata (Gomori, Grocott o metenamina de plata (MNP)), ácido peryódico de Schiff (PAS) o mucicarmin de Meyer (MM)

Las ventajas de estos métodos y las modalidades de preparación se detallarán más adelante, pero se puede decir que para la mayoría de las micosis subcutáneas, solamente es necesario el examen en fresco con aclaramiento del material, mientras que para las sistémicas en general se necesita efectuar además coloraciones.

El examen directo en fresco con KOH al 10%-20% permite observar la mayoría de los hongos; los preparados con Tinta China se realizan para reconocer complejo *C. neoformans*. La coloración de Gram, aunque no es satisfactoria para la mayoría de los hongos, se utiliza para detectar levaduras y bacterias asociadas. La coloración de Ziehl-Neelsen que se realiza rutinariamente para descartar micobacteriosis, permite detectar Nocardias que luego deben ser confirmadas por la coloración de KY. La tinción de Giemsa, imprescindible para detectar *H. capsulatum*, también permite observar otros hongos.

Las estructuras que se observan en el examen directo del material, el tamaño relativo de las mismas y el posible agente causal a quién corresponde, se detallan en el capítulo referido a **CARACTERÍSTICAS DE LOS AGENTES DE MICOSIS SISTÉMICAS AL EXAMEN MICROSCÓPICO DIRECTO.**

Otras coloraciones como el Azul de Metileno (AM), son rápidas y eficientes para detectar elementos fúngicos

La tinción rápida de MNP es la más confiable para detectar elementos fúngicos, aunque la técnica requiere una hora para su desarrollo. La coloración PAS es tan buena como el MNP pero más trabajosa, la de Hematoxilina eosina (HE) es útil para detectar hifas de *Zigomycetes* y la de MM tiñe específicamente las cápsulas mucilaginosas del complejo *C. neoformans*. La coloración de Papanicolaou (PAP), usada en los



laboratorios de citología para detectar células malignas, también detecta hongos tales como *B. dermatitidis*, complejo *C. neoformans* y *Coccidioides* sp. e hifas de *Aspergillus* sp. y *Zigomycetes* entre otros.

### III-CULTIVO DEL ESPECIMEN

**Todas las muestras deben cultivarse, háyanse visto o no, estructuras fúngicas en los exámenes directos del material.**

El cultivo es un método indirecto de diagnóstico que permite demostrar la etiología fúngica de la afección cuando se trata de agentes primarios, pero en el caso de hongos saprófitos o comensales que actúan como oportunistas, los resultados deben ser congruentes con el examen directo del material y/o del estudio serológico para que tengan valor diagnóstico. Como se mencionó antes la recuperación de hongos patógenos de las muestras depende de la calidad de las mismas, de su correcta recolección y procesamiento, en especial de aquellas contaminada con bacterias de crecimiento rápido y hongos comensales.

Para el primocultivo de los especímenes clínicos, se usan cuatro clases de medios básicos: uno que permite el desarrollo de todos los hongos, otro enriquecido para recuperar hongos dimorfos de difícil desarrollo y dos medios con antibiótico, uno que inhibe el desarrollo bacteriano y otro que además inhibe el desarrollo de hongos saprófitos. Si se sospecha que la muestra está muy contaminada con *C. albicans* se usa un medio de cultivo adicional que limita su desarrollo y permite recuperar los patógenos primarios.

La selección de los medios de cultivo para cada espécimen depende del sitio desde donde se extrajo la muestra, de la posible contaminación agregada y del tipo de agente que se desea aislar.

Las muestras tomadas de sitios normalmente estériles se siembran en un medio de cultivo que permita el desarrollo de todos los hongos, para ello se puede usar Agar Sabouraud glucosado (AGS) pH = 5.6 o AGS modificado por Emmons (AGS-E) pH = 7.0, este último es el mejor para recuperar hongos dimorfos. El AGS posee la ventaja de disminuir el crecimiento bacteriano por lo que se utiliza en muestras contaminadas. Como medio enriquecido se usa el agar infusión cerebro corazón adicionado con sangre desfibrinada de oveja al 5-10% (BHI-S), pero también puede usarse el Eugon agar de BBL en remplazo del BHI o el Sabhi de Difco.

Cuando hay probabilidad de contaminación bacteriana se usan medios de cultivo adicionados de antibióticos tales como penicilina, estreptomycin, tetraciclinas, cloranfenicol, neomicina o una combinación de ellos. Ninguno de estos antibióticos inhibe el desarrollo fúngico. Los medios de cultivo con Gentamicina pueden inhibir el desarrollo de la fase

levaduriforme de *H. capsulatum*, por lo que habitualmente se usa penicilina (20 U/litro) y estreptomycin (40 U/litro); esto aumenta el trabajo del laboratorio ya que ambos son termolábiles y hay que agregarlos al medio de cultivo una vez esterilizado y enfriado a 50 - 55 °C. En nuestro laboratorio usamos cloranfenicol (250 mg/litro) porque es termoestable y puede esterilizarse junto con el medio de cultivo (AGS-C) e inoculamos simultáneamente un medio sin antibiótico.

Estos medios de cultivo se preparan como se indican en el ANEXO II, pero pueden adquirirse deshidratados; uno de los mejores es el Inhibitori Mold Agar (BBL) que contiene cloranfenicol.

Cuando se sospecha que la muestra puede estar contaminada con bacterias y hongos se inoculan medios de cultivos básicos como el AGS adicionado de cicloheximida y antibióticos (AGS-CC). La cicloheximida en concentraciones de 400 mg/litro inhibe el desarrollo de los hongos saprófitos pero también puede inhibir el de algunas levaduras y otros hongos patógenos, por lo que debe usarse simultáneamente un medio sin inhibidores para evitar falsos resultados negativos. Los medios de cultivo deshidratados comerciales en general no se aconsejan para el aislamiento primario, por lo que es conveniente que cada laboratorio prepare los suyos. La preparación de los mismos se indica en **MEDIOS DE CULTIVO**. En cuanto a medios deshidratados los mejores son el Micobiotic agar (DIFCO) y el BBL Mycosel Agar (BD).

Cuando se procesan especímenes tales como esputos u otras secreciones respiratorias donde *C. albicans* puede inhibir la recuperación de patógenos primarios, se inocula una placa de agar fosfato extracto de levadura a la que se le agrega una gota de hidróxido de amonio una vez sembrado. En este medio *C. albicans* es inhibida pero no así los agentes de micosis sistémicas excepto los oportunistas *Aspergillus* sp. y *Penicillium* sp..

Si la muestra no se envió simultáneamente para estudios bacteriológicos, es necesario inocularla en medios que permitan la recuperación de actinomicetales aeróbicos (*Nocardia* spp.). Para aislar éstos puede usarse Middlebrook 7H10, Lowenstein Jensen, agar glicerinado o Czapek líquido sin sacarosa al que se introduce una varilla o papel de filtro parafinado (CZ-PP). Este último se recomienda para muestras contaminadas, pero en realidad estas bacterias crecen en los medios comunes sin antibiótico.

La temperatura de incubación para el primocultivo es de 25°C-28°C, aunque es conveniente incubar un duplicado a 35 -37 °C a fin de obtener la fase parasitaria de los hongos dimorfos. Muchos micólogos



prefieren incubar un solo juego de medios de cultivo a 30 °C en una atmósfera húmeda de 60% o más, o a 25-28 °C (temperatura ambiente) porque consideran de poca utilidad el primocultivo a 35-37 °C ya que la fase parasitaria puede demostrarse por subcultivos del aislamiento primario (fase filamentosa).

En nuestro laboratorio preferimos incubar los tubos a ambas temperaturas, porque: a) aseguramos la identificación de *H. capsulatum* que no siempre revierte a su fase levaduriforme a partir de la micelial, b) simplificamos y acortamos el tiempo de identificación de hongos dimorfos al no necesitar la prueba de conversión a fase levaduriforme ya que esta se obtiene en el primocultivo a 35°C-37°C, y c) confirmamos el dimorfismo revirtiendo de levadura a fase filamentosa, lo que es más fácil de lograr y lleva menos tiempo y esfuerzo.

Los especímenes inoculados en medios sólidos se incuban inclinados durante la primera semana a fin de permitir que el material se adhiera a toda la superficie del medio de cultivo. Luego pueden colocarse en posición vertical. Los tubos que se incuban a 35 – 37 °C deben protegerse de la deshidratación colocando en la estufa, un recipiente con agua para mantener la humedad y si los tubos tienen tapa a rosca se debe dejar esta floja para que el crecimiento sea óptimo.

Los cultivos para recuperación de Actinomicetes aeróbicos se incuban a 37 °C durante cuarenta días aunque el desarrollo generalmente aparece a los catorce días en el medio CZ-PP y entre los siete y catorce días en los otros medios.

Cuando se desarrollan levaduras en muestras donde son normalmente contaminantes, u hongos ambientales, se aísla la cepa y se continúa la incubación del material hasta la sexta u octava semana, a fin de detectar los agentes de micosis sistémicas primarias de lento desarrollo y difícil recuperación.

Una de las principales causas de error en el diagnóstico de las micosis es descartar los cultivos cuando se aísla *Candida* spp. *Aspergillus* spp. y otros hongos contaminantes ambientales, ya sea porque erróneamente se los considera el agente causal de la patología o porque la contaminación impide el desarrollo de otros agentes.

Cuando en todos los tubos se observa desarrollo de más de un hongo contaminante, exógeno o endógeno, y no queda ningún medio de cultivo donde continuar el estudio para los agentes de micosis sistémicas primarias, se debe solicitar otra muestra explicando detalladamente las razones por las cuales se debe descartar el cultivo o considerar inadecuada la muestra.

Las muestras inoculadas deben ser incubadas por duplicado a 25-28 °C y a 35-37 °C durante 40 a 45 días

como mínimo antes de ser consideradas negativas y se revisan semanalmente a fin de detectar crecimiento de patógenos, si lo hay, lo antes posible.

**No se debe descartar el cultivo antes de los 40 días**, aún cuando se hayan aislado una o más cepas patógenas, en especial si se trata de levaduras u otros agentes que pueden ser contaminantes. Se debe prolongar dos semanas más cuando se sospecha Histoplasmosis.

Cada vez que se obtenga desarrollo de uno o más hongos de una muestra, se aislarán, purificarán e identificarán como se indica en **IDENTIFICACIÓN DE CEPAS**.

La interpretación de los cultivos, en cuanto a la significación clínica de los agentes aislados, es muy sencilla en el caso de patógenos primarios y muy difícil cuando se aíslan hongos saprófitos o comensales de muestras habitualmente contaminadas. Las consideraciones al respecto se detallan en **INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS**.

Los informes para el médico se realizan en forma parcial luego de la observación microscópica del material. Luego se informa semanalmente durante el período de incubación, a menos que se establezca previamente con el médico que sólo se informará si se observa desarrollo. Cuando se obtiene desarrollo de hongos patógenos primarios u oportunistas, que se correspondan o no con las estructuras detectadas en el examen directo se notificará de inmediato, aunque luego deba confirmarse la identificación. En pacientes inmunocomprometidos se deben informar todos los hongos aislados aunque no se hayan visto en el examen directo.

Siempre es conveniente aclarar si el aislamiento es un contaminante habitual exógeno o endógeno de este tipo de muestra, a fin de evitar el tratamiento innecesario.

El informe final se envía cuando finaliza el período de incubación o inmediatamente después de concluida la identificación de las especies aisladas.

#### IV - INOCULACIÓN EXPERIMENTAL

Esta se realiza en animales susceptibles y es de utilidad para el diagnóstico de las micosis profundas, en especial en muestras altamente contaminadas de las que se requiere aislar hongos patógenos de crecimiento lento.

También se usa para aislar patógenos primarios de fuentes naturales, para determinar la patogenicidad de los hongos aislados de muestras clínicas y para confirmar la identificación de hongos dimorfos revirtiendo la fase micelial a la levaduriforme o parasítica. Esta última prueba fue remplazada en gran parte por las de detección de exoantígenos, más rápidas y sencillas de realizar.



Los animales y las vías de inoculación varían según el material y el agente a investigar ya que no todos los animales son susceptibles a los diferentes agentes de micosis profundas.

Los ratones son los animales más usados y la vía de inoculación de elección es la intraperitoneal (IP), esta se utiliza para las muestras estériles, si están contaminadas se debe agregar antibióticos antes de la inoculación para evitar la sepsis bacteriana.

Otros animales tales como los hamsters, cobayos y ratas se pueden inocular por vía IP y/o intratesticular (IT).

Por lo general se inoculan 6 a 8 animales y se comienzan a sacrificar a partir de la segunda semana de a uno por vez, se autopsian y se observan las alteraciones visibles en los órganos, luego se extrae bazo, hígado, riñón y corazón; se homogeneizan por separado y se inoculan a razón de 1 ml de homogenato en ASG, agar BHI-sangre y agar extracto de levadura; se incuban a 30 °C y se observan semanalmente durante cuarenta días. También se realizan frotis y cortes histológicos de los órganos biopsiados tiñéndolos con PAS y coloración de metenammina plata a fin de observar elementos fúngicos.

#### **V-PRUEBAS INMUNOLÓGICAS**

Son métodos de diagnóstico indirecto, esencialmente de dos tipos a) los que demuestran la hipersensibilidad a los agentes fúngicos o **reacciones cutáneas** y b) los que detectan antígenos o anticuerpos específicos en sangre y otros líquidos corporales.

a) **Las reacciones cutáneas** o pruebas intradérmicas, sólo tienen valor epidemiológico. Indican si una persona estuvo en contacto con el hongo productor del antígeno inoculado, pero no puede discernir entre infección pasada o presente; por otra parte una reacción negativa puede indicar que el paciente no estuvo en contacto con el hongo, o por el contrario, que se encuentra en la fase aguda o terminal de la enfermedad, o que su sistema inmune es defectuoso. Si bien no tienen valor diagnóstico, estas pruebas suelen ser solicitadas por el médico por su valor pronóstico; una vez diagnosticada la micosis por un método directo o indirecto, se realizan pruebas cutáneas sucesivas, la reversión de negativa a positiva indica una evolución de la enfermedad favorable al paciente y por lo tanto un buen pronóstico. Por el contrario una reversión de la prueba de positiva a negativa indica un mal pronóstico.

Los antígenos usados con más frecuencia en las pruebas de hipersensibilidad son la histoplasmina, la coccidioidina y la paracoccidioidina; se inoculan simultáneamente ya que presentan reacciones cruzadas, y se considera positiva la reacción más intensa aunque

no necesariamente la mayor magnitud de la reacción indica reacción con el antígeno homólogo.

b) Las **pruebas inmunológicas** permiten detectar antígenos o anticuerpos circulantes; las más difundidas son las reacciones serológicas, que detectan la respuesta de anticuerpos específicos del paciente. Estas son de valor diagnóstico en la mayoría de las micosis sistémicas, en particular en las broncopulmonares donde no solo ayudan al diagnóstico sino a la evolución y determinación del efecto de la terapia. En muchos casos es el primer indicio de una infección fúngica y a veces el único ya que no siempre se puede demostrar el agente causal por exámenes directos y/o cultivos reiterados de las muestras clínicas. Con frecuencia puede hacerse diagnóstico de certeza con una sola prueba serológica.

Cuando se trata de micosis oportunistas tales como candidosis y aspergilosis el análisis serológico es, en muchos casos, el análisis confirmatorio indispensable para determinar la significación clínica del hallazgo del agente causal en examen directo y/o cultivo según sea el caso; siendo muchas veces la única posibilidad diagnóstica.

Las pruebas serológicas más usadas son las de precipitación en geles de agar o agarosa (inmunodifusión radial doble -ID- y contrainmuno-electroforesis -CIE-), la fijación de complemento (FC) y el enzaimmunoanálisis (ELISA) para detección de anticuerpos específicos circulantes. La limitación de estos métodos está dada principalmente por la calidad de los antígenos utilizados, la capacidad de producción de anticuerpos que tiene el paciente y el tiempo de evolución de la enfermedad.

La ID está ampliamente difundida en el mundo por ser rápida, segura, económica, sencilla y permitir diagnosticar el 85% de los casos de histoplasmosis, el 94% de las paracoccidioidomicosis, más del 90 % de las coccidioidomicosis, entre el 50 % y 70 % de las aspergilosis pulmonares alérgicas y el 90 % de pacientes con aspergilomas. Resultados similares se obtienen con la técnica de CIE que tiene la ventaja de ser más rápida y más sensible, pero más costosa.

La FC es más sensible que las técnicas de precipitación en geles de agar (CIE e ID) pero más complicada de realizar y difícil de interpretar; por lo que prácticamente se ha dejado de usar para diagnóstico, se ha remplazado por ELISA para estudiar la evolución de la enfermedad y control de tratamiento.

La búsqueda de antígenos en suero y otros líquidos corporales se usa para diagnosticar candidosis diseminadas en pacientes incapaces de formar anticuerpos y en criptococcosis activa meníngea o extrameníngea. El método más usado es el **Látex** (LA) que tiene una sensibilidad diagnóstica de hasta el



52,6% en candidosis profundas, especialmente cuando el estudio se realiza sobre más de una muestra y un 99 % en criptococosis activa meníngea. Este método además suele adelantar el diagnóstico de candidosis 48 horas respecto del hemocultivo y tiene mayor sensibilidad que el examen directo con tinta china para el diagnóstico de criptococosis.

La búsqueda de antígenos circulantes de *Aspergillus* se puede realizar por aglutinación de partículas de látex (Pastorex *Aspergillus*) y sandwich ELISA (Platelia, Sanofi Diagnostic Pasteur). Estas técnicas detectan un polisacárido antigénico derivado de la pared del hongo, el galactomanano que puede ser detectado en suero u orina. Estas pruebas son de elección para el diagnóstico temprano de formas invasivas de aspergilosis, siempre junto a estudios radiológicos, microbiológicos y evidencias clínicas, con lo cual aumenta su sensibilidad; la que varía entre 25-70 % dependiendo de la población evaluada, mientras que la especificidad varía entre 90-100 %.

Es útil en pacientes inmunocomprometidos, los cuales no tienen capacidad de producir anticuerpos, ya que la presencia de estos últimos producen un rápido clearance de antígenos circulantes. Es aconsejable realizar la prueba en por lo menos 3 muestras seriadas para aumentar la sensibilidad de la misma.

Un resultado negativo no descarta la infección ya que la antigenemia puede ser transitoria.

Fueron descriptas reacciones falsas positivas por reacciones cruzadas con hongos ambientales que pueden contaminar los sueros mal conservados.

Actualmente se están evaluando muchas técnicas, entre ellas, las inmunoenzimáticas, para detectar antígenos en las formas invasivas de aspergilosis, candidosis, histoplasmosis y otras micosis del paciente inmunocomprometido, algunas de ellas con resultados promisorios.

Las técnicas de anticuerpos fluorescentes (AF) para detectar hongos patógenos en muestras clínicas, están poco difundidas por ser poco específicas, sólo pueden utilizarse en muestras de pus, exudados, LCR e improntas de tejido, pero no en esputos y tejidos tomados por biopsia porque ciertos elementos tisulares dan fluorescencia inespecífica y contienen sustancias capaces de degradar la capacidad colorante del conjugado.

Con respecto al diagnóstico de laboratorio se puede decir que cuando sea posible es conveniente basar el estudio de cada caso clínico en tres técnicas básicas: el examen directo (en fresco por aclaramiento y tinción y por coloración de Gram, ZN y Giemsa); el cultivo de la muestra y el estudio serológico por CIE e ID. Utilizando simultáneamente estas técnicas se puede diagnosticar el 100 % de las micosis sistémicas. Sin

embargo somos conscientes que el cultivo de muestras clínicas requiere un equipamiento y capacitación que no siempre se posee, en especial en los centros de salud periféricos. Es por eso que nos atrevemos a sugerir que allí se implementen sólo las técnicas de examen directo y CIE e ID por la facilidad en su realización, por ser las más económicas, las que requieren menos capacitación y no más equipamiento que un microscopio óptico con objetivos de 20x, 40x y 100x, portaobjetos, colorantes, algunos reactivos y elementos comunes en los laboratorios de microbiología de la mayoría de los centros de salud. Con estos dos métodos usados en paralelo y en forma sistemática se pudieron diagnosticar entre un 94% a 98% de los casos de micosis profundas en Argentina, como fue demostrado por las encuestas de micosis broncopulmonares realizadas en el país en los períodos de 1983-1984 y 1986-1987.

## VI - Técnicas de biología molecular

En las últimas dos décadas el estudio de los ácidos nucleicos ha ganado relevancia, sin embargo la utilización de estas técnicas en la micología clínica todavía no ha tomado un rumbo claro y definido, es decir que se han utilizado un gran número de metodologías del ADN recombinante para (i) identificar el agente patógeno desde muestras clínicas, (ii) determinar el origen de una(s) infección(es), (iii) establecer la ruta de infección, (iv) rastrear la transmisión de cepas involucradas en infecciones intrahospitalarias y (v) reconocer cepas resistentes a drogas antifúngicas. A pesar de todos los esfuerzos puestos en ello hasta el momento, la utilización más clara para este conjunto de técnicas ha sido el estudio de brotes intrahospitalarios. Generalmente, el agente etiológico que causa un brote deriva de una sola célula cuya progenie es genéticamente idéntica o muy relacionada. En términos epidemiológicos, los organismos involucrados en un brote tienen una relación clonal, es decir, tienen un origen común.

A lo largo de los años se han utilizado distintos métodos para intentar diferenciar los organismos involucrados en una infección intrahospitalaria, todos los cuales se basan en las características fenotípicas de los aislamientos, como los serotipos de complejo *C. neoformans* o *C. albicans* o las características morfológicas y fisiológicas en medios de cultivo especiales (biotipificación). Si bien algunas de estas pruebas han resultado útiles, queda claro que no permiten una adecuada resolución al nivel de cepa para poder responder a la mayoría de las preguntas epidemiológicas del brote. Por otra parte, la variación fenotípica de los aislamientos puede dificultar la utilización de muchas de estas pruebas. En contraste, la secuencia de ADN de un organismo debería ser insensible a los cambios ambientales y, por lo tanto,



permitir una alternativa más estable para la discriminación entre aislamientos.

Existe un gran número de técnicas basadas en la tecnología del ADN recombinante que se utilizan para la identificación de aislamientos, algunas de las cuales se describen más abajo, pero todas dan como resultado un patrón de bandas (finger print) que debe ser analizado, para lo cual se han planteado varios modelos estadísticos y diseñado programas de computadora capaces de identificar las bandas y generar gráficos en donde se muestran las relaciones genéticas entre los distintos aislamientos. Algunos investigadores sugieren la creación de bases de datos con los patrones de bandas para poder hacer una comparación retrospectiva contra los nuevos aislamientos y así encarar un programa de vigilancia epidemiológica global.

A continuación se detallan someramente las técnicas de biología molecular más utilizadas en micología:

#### **EXTRACCIÓN DE ADN**

Existe gran cantidad de métodos de extracción de ADN por lo cual se hace difícil generalizar, pero en principio se podrían encontrar tres grupos de métodos (i) químicos, donde las células son tratadas con solventes para solubilizar la pared y/o la membrana, (ii) bioquímicos, en este caso la pared y/o la membrana celular se digiere con una o varias enzimas y (iii) físicos, la muestra se puede liofilizar o congelar a bajas temperaturas para luego someterla a tratamientos abrasivos.

Si bien todos y cada uno de los métodos tienen sus pro y contra ya sea por costo, complicación, disponibilidad de reactivos y/o equipamiento, el principal punto a tener en cuenta es la agresividad del tratamiento, ya que el ADN es un biopolímero de gran tamaño y se fragmenta fácilmente.

Otro punto a tener en cuenta es si trabajamos sobre una cepa pura o una muestra clínica. En el primer caso hay que calibrar el tiempo de cultivo, puesto que los cultivos más viejos suelen tener gran cantidad de enzimas capaces de degradar los ácidos nucleicos, además de poseer paredes celulares más gruesas, lo que dificulta su ruptura. Cuando se trabaja con una muestra clínica se puede hacer una pre-extracción para eliminar todo ADN exógeno, esto se puede hacer ya que las células animales no cuentan con pared celular, lo cual las hace susceptibles a tratamientos que no afectan a las células fúngicas.

#### **HIBRIDACIÓN CON SONDAS Y RFLP**

Una vez extraído el ADN se puede someter a distintos estudios, entre ellos el estudio de los polimorfismos en los fragmentos de restricción (RFLP) y la hibridación con sondas específicas.

Si se trata el ADN purificado con endonucleasas de restricción y luego estos fragmentos se los somete a un campo eléctrico sobre un soporte de agarosa, estos se ubicarán en orden decreciente de peso molecular. Para visualizar las bandas se deben teñir con bromuro de etidio, que se intercala entre las bases del ADN y al ser iluminado con luz UV flúorese. Si se comparan los fragmentos obtenidos de distintos individuos de la misma especie (aislamientos) observaremos variaciones en los patrones de bandas debido a diferencias en los lugares en que las enzimas actúan. Por lo tanto las diferencias observadas en cada patrón de bandas (fingerprint) sólo dependen del individuo y de la(s) endonucleasa(s) utilizada(s).

Dado que suele ser muy compleja la interpretación de los RFLP se ha desarrollado la técnica de hibridación con sondas (Southern blot) que simplifica estos patrones permitiendo una lectura más sencilla e incluso identificar el aislamiento, al nivel de especie o incluso género. En este caso, una vez corrido el gel se transfieren los fragmentos de ADN a una membrana de nitrocelulosa o nylon, la transferencia puede hacerse por capilaridad o por un flujo de corriente eléctrica, dado que la membrana tiene carga positiva y el ADN negativa, este se adhiere electrostáticamente. Luego se trata la membrana con álcali o calor para desnaturalizar los fragmentos, los que se ponen en contacto con la sonda, la cual debe estar marcada ya sea radiactivamente, con enzimas que luego darán un color característico o con bioluminiscencia (luciferina-luciferasa), las únicas bandas que veremos en este caso sobre la membrana serán aquellas cuya secuencia de bases coincida con la de la sonda.

La sonda que se utiliza para revelar depende únicamente de lo que se quiera estudiar, dado que si queremos identificar a nivel de género y/o especie deberemos diseñarla para que reconozca zonas bastante conservadas del genoma fúngico; por otro lado, si lo que queremos es identificar aislamientos, deberemos dirigir nuestra sonda contra zonas del genoma menos conservadas, lo que nos revelará un patrón de bandas más complejo que en el caso anterior pero más sencillo que los RFLP.

Estas dos técnicas aquí descriptas tienen una sensibilidad de alrededor de  $10^5$  UFC por lo que evidentemente sólo pueden aplicarse sobre cultivos puros, lo que nos permite por ejemplo utilizarlas para identificar al agente patógeno o para identificar aislamientos involucrados en infecciones intrahospitalarias.

#### **REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)**

Esta técnica se basa en la existencia de una enzima denominada DNA *Taq* polimerasa cuya temperatura óptima de funcionamiento es de 72 °C y en que todas



Las DNA polimerasas necesitan un fragmento de ADN (primer, cebador o iniciador) para poder comenzar a polimerizar una doble hebra partiendo de una simple.

En un tubo de reacción se coloca la enzima polimerasa, deoxi nucleótidos (las moléculas componentes del ADN), el ADN que será copiado (templado) en baja concentración y oligonucleótidos (10 a 30 bases) que funcionarán como primers, en muy alta concentración, el tubo se coloca en un aparato (termociclador) que es capaz de variar la temperatura desde 0 a 100 °C en muy cortos períodos de tiempo. Cuando el templado es sometido a temperaturas por encima de los 96 °C se desnaturaliza, se desaparean las hebras complementarias, si ahora se baja la temperatura, el ADN es capaz de renaturalizarse, pero como los primers están en mucho mayor concentración que el templado, estos se unirán primero. La temperatura de renaturalización es muy importante, dado que si es muy baja permitiremos que se aparean zonas no homólogas del ADN, nuevamente se eleva la temperatura para permitir esta vez que la *Taq* polimerasa actúe (72° C). Estos ciclos de desnaturalización, renaturalización y extensión se repiten generalmente entre 30 y 40 veces, lo que permite amplificar exponencialmente la zona que queda encerrada entre los primers.

El diseño de los primers depende exclusivamente de lo que se quiere amplificar, si se quiere identificar a nivel de especie o niveles taxonómicos superiores deberán elegirse primers que amplifiquen zonas muy conservadas del genoma fúngico. Por el contrario, si se quiere identificar aislamientos, deberán amplificarse zonas menos conservadas.

La reacción en cadena de la polimerasa es capaz de detectar entre  $10^1$  y  $10^2$  UFC, lo cual la hace lo suficientemente sensible como para aplicarse sobre muestras clínicas para la identificación del patógeno, si lo que nos interesa es reconocer cepas involucradas en infecciones intrahospitalarias deberemos utilizar un cultivo puro.

Una alternativa planteada a esta técnica es la transferencia de los productos de amplificación a una membrana y luego revelado con sondas, las cuales suelen ser especie específicas, la sensibilidad así obtenida está entre 1 y  $10^1$  UFC pero, si bien esto nos permite detectar microorganismos que estén en muy baja concentración en las muestras clínicas correríamos el riesgo de detectar una contaminación como el agente

causal de una infección, sobre todo en hongos oportunistas que suelen estar en el ambiente.

Otra posibilidad es la amplificación de zonas conservadas del genoma fúngico como, por ejemplo, las zonas que codifican para los RNA ribosomales, sin embargo estas regiones suelen tener pequeñas diferencias entre individuos (aislamientos) susceptibles de ser reconocidas por alguna(s) enzima(s) de restricción, por lo tanto luego de la PCR los fragmentos amplificados se tratan con enzimas de restricción específicas y posteriormente se revelan las bandas obtenidas en un gel de agarosa en donde veremos un patrón de bandas muy sencillo el cual debería ser único para cada especie.

#### ELECTROFORESIS EN CAMPO PULSANTE (PFGE)

Consiste en una electroforesis con la única salvedad que el campo eléctrico aplicado cambia de ángulo con respecto al eje central del gel, lo que nos permite separar moléculas de alto peso molecular (cromosomas). Esta técnica se utiliza para identificar individuos que hayan sufrido cambios en el peso molecular de los cromosomas debido a rearrreglos genéticos (inserciones, deleciones o translocaciones). También se puede correr ADN que haya sido tratado con endonucleasa(s) de restricción de corte infrecuente, las cuales producen patrones de bandas sencillos (fingerprint), los que pueden ser revelados por tinción o por hibridación con sondas.

Esta técnica sólo puede aplicarse sobre aislamientos puros dado que las contaminaciones pueden repercutir en los patrones de bandas obtenidos y por lo tanto confundir su interpretación.

Todas estas técnicas que se han presentado aquí también han sido utilizadas con éxito para la identificación de aislamientos o especies patógenas desde cultivos puros. Todavía no se ha podido reproducir esto con muestras clínicas dado la gran cantidad de inhibidores enzimáticos que se encuentran en ellas, lo que hace que la sensibilidad caiga drásticamente cuando se realizan sobre fluidos corporales. También hay que tener en cuenta que estas técnicas no son capaces de diferenciar colonización de infección, por lo que podríamos estar detectando un hongo que es flora normal como agente de infección. Por último no podemos olvidar su alto costo, que hace a este conjunto de técnicas privativas del laboratorio de referencia.



## ELECCIÓN RECOLECCIÓN TRANSPORTE Y CONSERVACIÓN DE MUESTRAS

El diagnóstico micológico preciso no depende solamente de la experiencia del laboratorio, ya que si la muestra es de mala calidad, las condiciones de conservación o envío son inadecuadas, o su procesamiento e inoculación en los medios de cultivo se demora, inútiles son los esfuerzos del laboratorio para detectar el agente causal en el examen microscópico o en el cultivo de la misma.

Las muestras para examen micológicos deben ser representativas, abundantes, libre de contaminantes exógenos y/o endógenos, o de sustancias que inhiban o alteren la viabilidad de los hongos.

Para ello es indispensable conocer las características de los pacientes y de la patología que presentan, elegir adecuadamente el tipo de muestra a recolectar; determinar el sitio más típico y activo de la lesión, prepararlo en forma apropiada y obtener la muestra mediante técnicas e instrumental específico para cada caso, evitando las contaminaciones ambientales por esporas de hongos saprófitos (exógenas) y/o por gérmenes "habituales" de diferentes áreas del cuerpo humano (endógenas).

Es conveniente recoger los especímenes en recipientes estériles irrompibles, de cierre hermético y tamaño adecuado, que proporcionen un ambiente húmedo para evitar la desecación de la muestra. Los recipientes de vidrio deben evitarse porque si se rompen o fisuran en el traslado se producen pérdidas o filtraciones del material patológico violando las **normas de bioseguridad**.

Cuando las muestras son de pequeño tamaño como es el caso de las biopsias, pus o exudado de úlceras o abscesos, se debe agregar 0,5 a 1 ml de solución fisiológica (SF) estéril para evitar su deshidratación.

El agregado de antibiótico a muestras no estériles, para evitar el crecimiento excesivo de bacterias contaminantes, puede hacerse siempre y cuando se esté seguro que la patología no se corresponde con Nocardiosis o Actinomycosis. Las soluciones de antibióticos se agregan a la muestra en cantidades suficientes para lograr una concentración final de 20 U (unidades) de penicilina y 40 U de estreptomycin por ml de muestra. Estos pueden ser reemplazados por cloranfenicol a una concentración final de 0,05 mg/ml pero hay que tener en claro que las altas concentraciones de cloranfenicol o gentamicina pueden inhibir el desarrollo de *H. capsulatum*. La conveniencia de agregar antibióticos a la muestra debe ser evaluada por cada laboratorio, nosotros preferimos no utilizarlos porque generalmente el médico no sospecha las infecciones por *Nocardia* y *Actinomyces*,

y de agregarlo, perderíamos la única posibilidad de diagnóstico. Una vez recogido el material los recipientes se rotulan y se envían al laboratorio junto con la ficha de resumen de datos detallada con anterioridad. Uno de los requisitos básicos para realizar un buen examen micológico, que permita la observación del agente causal en el material y su recuperación, es que el período entre la recolección, el procesamiento y la inoculación en los medios de cultivo no sea mayor de una hora. Períodos de tránsito mayores no sólo ocasionan pérdida de la viabilidad de los hongos patógenos primarios, sino que permiten el crecimiento de microorganismos saprófitos o comensales que eventualmente podrían haber contaminado la muestra, muchos de los cuales por ser patógenos oportunistas pueden inducir a un diagnóstico erróneo.

El almacenamiento de las muestras a 4 °C por un período máximo de 24 horas, previos al procesamiento; no es conveniente, pero puede hacerse.

Los agentes de micosis sistémicas sobreviven varias horas a 4 °C pero las bacterias y hongos saprófitos de rápido crecimiento pueden enmascararlos con su proliferación. Por ello, cuando no se puede hacer llegar la muestra al laboratorio en un tiempo máximo de una hora es necesario procesarla para su observación microscópica e inocularla en los medios correspondientes, para luego hacerlos llegar al laboratorio debidamente protegidos y empacados.

Cuando la recolección dependa de la colaboración del paciente, es necesario que éste entienda lo que debe hacer y cómo. Es menester que se dedique tiempo para explicar al paciente que esas condiciones e indicaciones no son caprichosas, sino que están orientadas a obtener una buena muestra. Hay que insistir en los riesgos de la contaminación ambiental y la de los gérmenes habituales del área relacionada con la muestra a tomar.

## METODOLOGÍA

### I- ELECCIÓN DE LA MUESTRA

Se realiza basándose en el tipo de síndrome que presenta el paciente, su patología de base y las características del mismo. A continuación se detallan las muestras de elección según la localización de la afección. En todos los casos se citan en primer término las muestras más accesibles y que requieren procedimientos más sencillos para su obtención. En algunas oportunidades la muestra más accesible no es la más apta para el estudio micológico, ya sea por las características del paciente o por el carácter oportunista del agente sospechado, en estos casos se recurre a



muestras alternativas generalmente recogidas por procedimientos invasivos.

Los estudios serológicos son de mucha utilidad para el diagnóstico de las micosis sistémicas causadas por patógenos primarios y algunas de las originadas por hongos oportunistas, siempre y cuando el paciente tenga una buena respuesta inmunológica y se utilicen métodos y reactivos estandarizados.

#### A- SÍNDROME PULMONAR

- a) Sangre para estudio serológico y esputo (tres muestras seriadas).
- b) Esputo inducido, aspirado transtraqueal, lavados bronquiales, lavados broquioalveolares, tejidos tomados por biopsias y líquido pleural.

#### B- SÍNDROME MUCOCUTÁNEO

- a) Raspado de la lesión, exudado o pus aspirado, biopsia de tejidos.
- b) Sangre para estudios serológicos.

#### C- SÍNDROME MENINGO-ENCEFÁLICO

- a) Líquido cefalorraquídeo o biopsia de tejidos, según el cuadro clínico.
- b) Sangre para estudios serológicos.

#### D- SÍNDROME SÉPTICO

- a) Hemocultivo seriado (3 muestras como mínimo).
- b) Retrocultivos y punta de catéteres.
- c) Sangre para estudios serológicos.

### II- INDICACIONES PREVIAS AL PACIENTE.

(Preparación del sitio para la toma de muestras)

En el caso de estudios serológicos se suspende el uso de sustancias que modifican la respuesta inmunitaria normal del paciente, durante los 15 a 20 días previos a la toma de muestra; de no ser posible se deberá informar al laboratorio respecto a la medicación que recibía el paciente en el momento de la toma de muestra.

En el momento de la toma de muestra de lesiones externas se lava la superficie afectada con agua y jabón no perfumado, si las lesiones son internas se lava la superficie a punzar con agua y jabón y luego se desinfecta con alcohol yodado o alcohol 70°. Cuando el jabón y/o el alcohol están contraindicados la higiene se efectúa con SF estéril utilizando una gasa o lienzo limpio y hervido (no usar algodón). Si no se cuenta con SF se puede utilizar en su reemplazo un litro de agua hervida con una cucharada de té colmada de sal fina, el agua se debe hervir con la sal en un recipiente con tapa, luego de enfriada se quita la tapa y se usa inmediatamente.

### III- OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS

La técnica a seguir en cada uno de los casos ha sido ordenada alfabéticamente para facilitar su localización y simplificar el uso de esta guía.

Recordar que las muestras deben ser lo más abundantes posible y se debe conservar el material por si se requieren estudios accesorios.

**1-Abscesos:** si es cerrado, la muestra se toma por punción con jeringa y aguja estériles, se trasvasa a un recipiente estéril y se envía inmediatamente al laboratorio (refrigerada).

Si en cambio está fistulizado se drena el pus que se recoge asépticamente en un recipiente estéril colocado en el borde de la lesión. Se envía refrigerado y de inmediato al laboratorio.

En ambos casos se agrega 0,5 a 1 ml de SF estéril si el material es escaso. Generalmente es preferible hacer extirpación-biopsia de la lesión como se indica a continuación.

**2-Biopsias:** se extrae asépticamente el tejido de la lesión, incluyendo la pared y el centro de la misma. El material así obtenido se divide en dos porciones una de las cuales se fija con formol al 10% y se remite al laboratorio de anatomía patológica, y la otra se coloca en un recipiente estéril y se envía de inmediato al laboratorio de micología (refrigerada).

Si la muestra es muy pequeña se agrega 0,5 a 1 ml de SF estéril. Es necesario aclarar bien cual es la muestra correspondiente a cada estudio para evitar confusiones y pérdida del material.

**3-Catéteres:** es recolectado asépticamente por el médico en un tubo estéril con tapa a rosca. Se envía inmediatamente al laboratorio.

**4-Esputo:** antes de la toma de muestra es imprescindible convencer al paciente de la importancia de una buena higiene bucal previa, aclararle que debe quitarse las prótesis dentarias (sí las usa) antes de cepillarse los dientes con dentífrico; luego debe realizar buches y gárgaras con agua hervida y carbonatada, recogiendo una buena expectoración profunda en un recipiente estéril descartable de boca ancha.

La expectoración debe ser la primera de la mañana recogida en ayunas, y enviada rápidamente al laboratorio, refrigerada y acompañada de una muestra de sangre para estudios serológicos, y de la ficha de resumen de datos.

Para un adecuado estudio micológico es necesario procesar tres muestras seriadas, recogidas en días sucesivos, siguiendo las instrucciones dadas con anterioridad. Por ningún motivo las tres muestras se



recogerán en el mismo recipiente. Cada muestra se enviará inmediatamente después de su recolección.

Es conveniente explicarle al paciente que las muestras de saliva o de secreciones nasales no sirven para el estudio, y que se necesita una muestra de secreción proveniente de pulmón para poder hacer el diagnóstico de su enfermedad. Tampoco deberá abrir el recipiente hasta el momento de la expectoración.

Si el paciente está internado el recipiente no le será entregado hasta el momento de la recolección.

#### Debe evitarse

- La demora innecesaria en el envío
- La saliva excesiva o recolección de secreciones nasales
- La deshidratación de las muestras
- El crecimiento excesivo de los contaminantes exógenos y endógenos.

**5-Gomas y adenopatías micóticas:** se hace una extirpación por biopsia de la lesión y se procede como en 2.

**6-Lesiones bucales o faríngeas (Candidiasis):** antes de la toma de muestra se efectúa una higiene profunda de los dientes con cepillo y dentífrico, y de la boca con buches y gárgaras con agua carbonatada hervida y enfriada. Se toma el material con un hisopo que se coloca en un tubo con tapa a rosca y se le agregan unas gotas de SF, todo con estricta asepsia. Se envía inmediatamente al laboratorio.

Cuando sea posible se practicará biopsia y se procederá como en el punto 2°.

**7-Lesiones ulcerosas, vegetantes o tumorales (piel y mucosa):** en lo posible se practica una biopsia, caso contrario se raspa la zona afectada con bisturí, ansa o lanceta estéril. Se recoge el material en un recipiente estéril, agregándole unas gotas de SF estéril y se envía de inmediato al laboratorio, refrigerada.

**8-Líquido cefalorraquídeo:** es recolectado asépticamente por el médico en un tubo estéril con tapa a rosca. Se envía inmediatamente al laboratorio. **ES CONVENIENTE NO REFRIGERAR.**

**9-Líquido pleural, ascítico y otros:** se recogen asépticamente en un recipiente estéril que se envía rápidamente al laboratorio, refrigerado.

**10-Médula ósea:** el material se recoge por punción, con heparina como anticoagulante, se coloca en un tubo estéril con tapa a rosca y se envía de inmediato al laboratorio, refrigerado.

**11-Sangre para estudios serológicos:** se extraen 10 ml de sangre del paciente en ayunas, se trasvasa a un tubo seco evitando la hemólisis y se envía al laboratorio sin refrigerar. Si la muestra tiene un período de tránsito mayor de una hora se separa el suero, se puede agregar unas gotas de merthiolate 1:10000 y se mantiene refrigerado a 4 °C durante el envío al laboratorio. Si su procesamiento se demora más de una semana se conserva a -20 °C.

**12-Sangre para hemocultivo:** se extraen 10 ml de sangre estérilmente y se trasvasa a un tubo estéril con tapa a rosca, conteniendo heparina como anticoagulante se agita por rotación cuidando de no mojar el tapón y se envía al laboratorio sin refrigerar, lo antes posible. No se debe inclinar el tubo durante el envío.

Si el paciente tiene un catéter es conveniente hacer una extracción de sangre a través de este (retrocultivo) para descartar este como foco séptico.

**13-Secreciones bronquiales recogidas por lavado o bronco-aspiración. Lavados broncoalveolares. Secreciones peritoneales:** se recogen asépticamente, en recipiente estéril con tapa a rosca y se envían rápidamente y en refrigeración al laboratorio.

#### IV- ENVÍO DE MUESTRAS AL LABORATORIO

Los materiales se envían inmediatamente al laboratorio, en recipientes estériles, irrompibles, de cierre hermético y de tamaño adecuado, sin medio de transporte, excepto cuando se especifique lo contrario.

**El período de tránsito de la muestra no debe ser mayor de 1 a 2 horas.**

Cada material debe enviarse acompañado de la ficha correspondiente con los datos del paciente (ver protocolo de derivación de muestras en la página 26).

En el siguiente cuadro se detallan las muestras clínicas desde donde pueden recuperarse comúnmente los hongos causantes de micosis sistémicas



Material	Microorganismo	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	<i>Coccidioides</i> sp.	<i>Histoplasma capsulatum</i>	<i>Blastomyces dermatitidis</i>	<i>Sporothrix schenckii</i>	Complejo <i>Cryptococcus neoformans</i>	<i>Malassezia</i> spp.	<i>Candida albicans</i> y otras levaduras	<i>Trichosporum beigelli</i>	<i>Aspergillus</i> spp.	Zygomycetes	<i>Fusarium</i> spp.	<i>Pseudoallescheria boydii</i>	<i>Penicillium</i> sp.	Hongos dematiaceos	<i>Pneumocystis jiroveci</i>	Actinomicetales aeróbicos
Sangre		X	X	X		X	X	X	X	X	X							
Medula ósea				X			X											
SNC			X	X			X		X		X	X		X		X		X
Líquidos de punción			X		X									X		X		X
Biopsias de áreas estériles		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X
Punción suprapúbica				X			X		X									
Materiales respiratorios		X	X	X	X	X	X		X*	X	X	X	X	X	X		X	X*
Exudados y pus						X					X	X	X	X		X		X
Ojos							X		X		X	X	X	X	X	X		
Oídos		X		X					X		X							
Material nasofaríngeo (raspado)		X		X	X		X		X			X						
Material de senos											X	X						
Biopsia de piel y mucosas		X		X	X	X					X	X	X	X	X	X		X

\* de patogenicidad discutida



**PROCESAMIENTO DE ESPECÍMENES CLÍNICOS PARA EXAMEN MICROSCÓPICO DIRECTO Y CULTIVO**

Material	Recolección, conservación y transporte	Preparación del espécimen:	Preparaciones microscópicas:	Cultivo	Buscar	Observación
CATÉTER	Retirar el catéter, cortar la punta de este y colocarlo en un recipiente o tubo estéril	<b>Método de Maki:</b>	-	Rotar 4 veces el catéter sobre una placa de AGS-C.	Levaduras	Los recuentos se realizan después de 48 horas de incubación
		<b>Método de Brun-Buisson:</b> Colocar la punta de catéter en un 1 ml de SF estéril y agitar en un vortex 2 o 3 minutos. Realizar una dilución 1/10.	-	Sembrar 50 µl de la suspensión original y 10 µl de la dilución 1/10 en placas AGS-C.		
ESPUTO, ASPIRADO NASOTRAQUEAL, LAVADO GÁSTRICO	Colocar en un recipiente estéril. Se puede conservar refrigerado si no se lo procesa inmediatamente, sin embargo es conveniente procesarlo lo antes posible ya que la flora contaminante puede inhibir el desarrollo de patógenos primarios.	Volcar el esputo sobre una placa de Petri estéril. Si es demasiado denso, se le agregan 0,5 ml de SF estéril para facilitar su homogenización, si no es tan mucoso se procesa directamente evitando las áreas acuosas compatibles con saliva.	<b>Fresco con KOH</b> <b>Gram</b> <b>Ziehl-Neelsen</b> <b>Giemsa</b> <b>Gram Weigert</b> Kinyon PAS MNP	AGS-E AGS-C AGS-CC ABHI-S	<b>Patógenos primarios</b> ( <i>Coccidioides</i> sp., <i>B. dermatitidis</i> , <i>H. capsulatum</i> , complejo <i>C. neoformans</i> , <i>P. boydii</i> , <i>P. brasiliensis</i> y <i>S. schenckii</i> ). <i>A. fumigatus</i> u otros hongos miceliales oportunistas solos o asociados con <i>M. tuberculosis</i> tienen significación clínica si se observaron hifas en el examen directo. <i>C. albicans</i> rara vez es agente de micosis pulmonares, es parte de la flora normal de boca de pacientes hospitalizados. Para diagnosticar candidiasis pulmonar es necesario realizar los estudios sobre muestras de tejido pulmonar. El serodiagnóstico solo complementa el estudio. La recuperación de <i>Nocardia</i> es de dudosa interpretación ya que pueden estar como flora de orofaringe, por lo que es necesario el análisis de tejido pulmonar, esputo tomado por broncoscopia o aspirado transtraqueal.	<b>La expectoración debe ser profunda.</b> En todos los casos incubar los tubos durante 6 a 8 semanas. Si se aíslan levaduras antes de transcurrido este tiempo, se deben reaislar éstas en YM. Discutir con el médico el valor diagnóstico del aislamiento de levaduras en estos materiales.  Si se sospecha <i>H. capsulatum</i> se controla hasta ocho semanas. Los medios de cultivo para aislamiento de <i>Nocardia</i> se deben incubar a 37°C durante cuatro semanas



Material	Recolección, conservación y transporte	Preparación del espécimen:	Preparaciones microscópicas:	Cultivo	Buscar	Observación
LAVADO BRONQUIAL	Colocar en tubo u otro recipiente estéril. Se puede conservar refrigerado si no se lo procesa inmediatamente, sin embargo es conveniente procesarlo lo antes posible ya que la flora contaminante puede inhibir el desarrollo de patógenos primarios.	Si es muy denso se agregan 0,5 ml de SF estéril para facilitar el uso de pipeta, si no es demasiado mucoso, se procesa directamente.	<b>Fresco con KOH</b> <b>Gram</b> <b>Ziehl-Neelsen</b> <b>Giemsa</b> <b>Gram Weigert</b> Kinyuon PAS MNP	AGS-E AGS-C AGS-CC ABHI-S	Los agentes de micosis sistémicas y oportunistas mencionados en esputo pueden ser aislados desde estos especímenes que al ser recogidos por métodos quirúrgicos limitan la posibilidad de contaminación exógena o endógena.	En esta muestra las bacterias y levaduras comensales de vías respiratorias superiores, habitualmente presentes en grandes cantidades en el esputo, están notablemente reducidas, lo que facilita el aislamiento de los hongos patógenos primarios y ayuda a discernir sobre el significado clínico de la recuperación de una levadura o de un hongo saprófito.
LAVADO BRONQUIALVEOLAR	Colocar en tubo estéril o en cualquier otro recipiente estéril. Procesar inmediatamente para recuento.	Homogeneizar la muestra y dividir en dos fracciones <b>1) Para aislamiento de hongos patógenos primarios y preparados microscópicos</b> centrifugar y resuspender el sedimento en 1ml de sobrenadante. <b>2) Para recuento:</b> hacer diluciones y sembrar en placa (permite discernir sobre la significación clínica del aislamiento de levaduras)	<b>Fresco con KOH</b> <b>Gram</b> <b>Ziehl-Neelsen</b> <b>Giemsa</b> <b>Gram Weigert</b> Kinyuon PAS MNP	AGS-E AGS-C AGS-CC ABHI-S	Esta muestra facilita el aislamiento de los hongos patógenos primarios por la baja contaminación que tiene. ( <i>Coccidioides sp</i> , <i>B. dermatitidis</i> , <i>H. capsulatum</i> , complejo <i>C. neoformans</i> , <i>P. boydii</i> , <i>P. brasiliensis</i> y <i>S. schenckii</i> ) <i>C. albicans</i> rara vez es el agente causal de micosis pulmonares para diagnosticar candidiasis pulmonar es necesario realizar los estudios sobre muestras de tejidos pulmonar, sin embargo muchos autores recomiendan el recuento como una alternativa válida. Esta muestra es la más conveniente para buscar <i>P. jiroveci</i> .	<b>Recuento:</b> Realizar diluciones seriadas 1/10 y 1/100 de la muestra homogeneizada en SF. La muestra sin diluir, y las dos diluciones se inoculan en placas de AGS-C, a razón de 10 microlitros por placa. Incubar a 37 °C durante 48 h. y efectuar los recuentos. En la placa que se inoculó la muestra sin diluir se multiplican las UFC por 100, en la dilución 1/10 se multiplican por 1000 y en la dilución 1/100 se multiplican por 10.000 a fin de obtener las UFC/ml de BAL. Para que el recuento sea válido el porcentaje de células epiteliales en la coloración de Giemsa debe ser inferior al 1%
LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO (LCR).	Colocar en tubo estéril. Procesar inmediatamente.	Centrifugar estérilmente 10 min. a 3000 rpm., descartar el sobrenadante, dejando aproximadamente 1 ml de sobrenadante en los que se resuspende el precipitado. Con este material se realizan las inoculaciones y los preparados para observación microscópica.	<b>Tinta china</b> (observar inmediatamente). <b>Fresco con KOH</b> <b>Gram</b> <b>Ziehl-Neelsen</b> <b>Giemsa</b> Kinyuon PAS MNP	AGS-E BHI-S Medio de ácido cafeico o semillas de girasol	El aislamiento de cualquier hongo micelial o levadura tiene significación clínica si la muestra se recogió en estricta esterilidad. Se puede aislar complejo <i>C. neoformans</i> , <i>C. albicans</i> , otras levaduras, mohos y hongos dimórficos.	



Material	Recolección, conservación y transporte	Preparación del espécimen:	Preparaciones microscópicas:	Cultivo	Buscar	Observación
LÍQUIDO PLEURAL, PERITONEAL Y SINOVIAL.	Colocar en tubo estéril.	Líquido purulento: procesar directamente Líquido límpido: centrifugar 10 min a 3000 rpm., descartar estérilmente el sobrenadante dejando aproximadamente 1,5 ml en los que se resuspende el precipitado.	<b>Fresco con KOH</b> <b>Gram</b> <b>Ziehl-Neelsen</b> <b>Giemsa</b> Kinyuon PAS MNP	AGS-E AGS-C AGS-CC ABHI-S	La recuperación de cualquier hongo micelial o levadura desde esta muestra es significativa si se recogió en estricta esterilidad.	
PUS, EXUDADOS Y LÍQUIDOS DE DRENAJES	Colocar en tubo estéril. Remitir rápidamente al laboratorio. Se pueden conservar en la heladera, sin embargo no es conveniente.	<b>En especímenes muy pequeños:</b> es conveniente agregar 0,5 a 1 ml de SF estéril. Si la muestra es suficiente para inocular los medios de cultivo y realizar las preparaciones microscópicas se procesa directamente.	<b>Fresco con KOH</b> <b>Gram</b> <b>Ziehl-Neelsen</b> <b>Giemsa</b> Kinyuon PAS MNP	AGS-E AGS-C AGS-CC ABHI-S	Agentes de micosis subcutáneas ( <i>S. schenkii</i> , cromomicetes y agentes de micetomas). Agentes de micosis sistémicas diseminadas oportunistas o no como <i>Coccidioides sp.</i> , <i>H. capsulatum</i> , <i>P. brasiliensis</i> , <i>Aspergillus sp.</i> , <i>Candida sp.</i> y <i>Zygomycetes</i> .	Si se sospecha <i>H. capsulatum</i> se controlan los tubos hasta ocho semanas
RASPADO DE LESIONES MUCOCUTÁNEAS	Raspar la mucosa en profundidad con un bisturí estéril desafilado.	<b>Realizar la siembra directamente</b>	<b>Fresco con KOH</b> <b>Giemsa</b> <b>Gram</b> <b>Ziehl-Neelsen</b> Kinyuon PAS MNP	AGS-E AGS-C AGS-CC ABHI-S	Esta muestra facilita el aislamiento de los hongos patógenos primarios por la baja contaminación que tiene. <i>Coccidioides sp.</i> , <i>B. dermatitidis</i> , <i>H. capsulatum</i> , complejo <i>C. neoformans</i> , <i>P. boydii</i> , <i>P. brasiliensis</i> y <i>S. schenckii</i> y agentes oportunistas ( <i>C. albicans</i> y otras especies de levaduras). Este método permite una mejor visualización de elementos fúngicos por lo dirigido de la toma de muestra.	Ayuda a discernir sobre el significado clínico de la recuperación de una levadura o de un hongo saprófito, donde la visualización en el examen directo del agente es fundamental. Este método de toma de muestra es más efectivo para el estudio de materiales provenientes de mucosas, sin embargo a veces no es posible por causas inherentes al paciente (pacientes pediátricos).
TEJIDOS (BIOPSIAS O AUTOPSIAS)	Colocar en tubo estéril	<b>Muestra mayor 3 mm:</b> se procesan directamente colocándola en una caja de Petri estéril y triturándola con un bisturí. <b>Muestras menores de 3 mm:</b> agregar de 0,1 a 0,5 ml de SF estéril y homogeneizar. Inocular aproximadamente 10 fragmentos ó 0,1 ml del espécimen homogeneizado en los medios de cultivo, asegurando una buena distribución y que queden bien adheridos a la superficie del agar.	<b>Fresco con KOH</b> <b>Gram</b> <b>Ziehl-Neelsen</b> <b>Giemsa</b> Kinyuon PAS MNP	AGS-E AGS-C AGS-CC ABHI-S	Todo hongo micelial o levadura aislado de estas muestras es significativo. En el caso de agentes dimórficos la sola observación de elementos compatibles con <i>Coccidioides sp.</i> , <i>H. capsulatum</i> , <i>P. brasiliensis</i> tiene valor diagnóstico.	Los preparados microscópicos coloreados por Giemsa, PAS y MNP, no son tan buenos como los cortes histológicos pero son mejores que los montajes húmedos con hidróxido de potasio, estos últimos son difíciles de observar debido a que el material fibroso que contienen es morfológicamente similar a las hifas. Para eliminar esta causa de error puede realizarse una biopsia enriquecida.



Material	Recolección, conservación y transporte	Preparación del espécimen:	Preparaciones microscópicas:	Cultivo	Buscar	Observación
ORINA POR PUNCIÓN SUPRAPUBICA	Recoger el material en recipiente estéril	Centrifugar estérilmente 10 ml de orina a 3000 rpm. durante 10 minutos, descartar el sobrenadante y con el precipitado realizar las inoculaciones y los preparados para observación microscópica Para recuento tomar una ansada con ansa calibrada de orina sin centrifugar y sembrar en placa.	<b>Examen en fresco</b> <b>Giemsa</b> <b>Gram</b> <b>Ziehl-Neelsen</b>	AGS-E AGS-C	Una sola colonia de complejo <i>C. neoformans</i> , <i>H. Capsulatum</i> u otro agente de micosis sistémica es significativo. <b>Es la más conveniente para el diagnóstico de candidiasis renal.</b> <i>Candida albicans</i> desarrolla en la primer semana, otras levaduras requieren un período mayor de incubación.	Se considera significativo el aislamiento de cualquier levadura si se descarto la posibilidad de contaminación y el paciente no tenía una sonda vesical en el momento de la toma de muestra o algunas horas antes, en cuyo caso no sólo se deberá descartar la posibilidad de contaminación sino también la de candiduria transiente a partir de la colonización de la sonda.
ORINA POR SONDA,	Colocar una sonda nueva en momento de recoger la muestra. Recoger el material en recipiente estéril			AGS-C placa AGS-CC placa	Una sola colonia de complejo <i>C. neoformans</i> , <i>H. Capsulatum</i> u otro agente de micosis sistémica primaria tiene significación clínica. Es discutido el hallazgo de levaduras aún con recuentos significativos, sin embargo es importante tener en cuenta el estado general del paciente. En neonatos puede ser el primer síntoma de una candidiasis.	La visualización microscópica de una a cuatro células por campo de 400 aumentos, en orina no centrifugada, es equivalente a un recuento de 15.000 UFC/ml y por lo tanto indicativa de infección activa. En candidiasis del tracto urinario generalmente el riñón esta siempre involucrado, hay candiduria, pero no siempre piuria, albuminuria o uremia; los hemocultivos son positivos en un 45% de los casos y se detectan anticuerpos precipitantes en el suero del 75% de los pacientes. Un recuento mayor o igual de 10.000 UFC/ml es indicativo de infección activa, recuentos menores indican colonización del tracto urinario. Este criterio no es aplicable para pacientes con sonda Foley permanente, donde los recuentos tienden a ser altos aun en ausencia de infección renal a <i>Candida</i> .
ORINA DE CHORRO MEDIO	Higienizar la zona de genitales externos, realizar taponamiento vaginal si es mujer, eliminar el primer chorro y recoger en frasco estéril el 2° chorro. Es conveniente una retención mínima 3 horas.			Sólo para diagnosticar enfermedades fúngicas diseminadas causadas por patógenos primarios.		



Material	Recolección, conservación y transporte	Preparación del espécimen:	Preparaciones microscópicas:	Cultivo	Buscar	Observación	
SANGRE PARA HEMOCULTIVO	Lisis-centrifugación	Extraer 9 ml de sangre con anticoagulante en un tubo estéril, de fondo cónico y tapa a rosca, remitir inmediatamente al laboratorio.	Agregar al tubo con 9 ml de sangre 1 ml de solución de saponina al 50% preparada en agua destilada esterilizada en autoclave a 1 atm 120°C 15 minutos de tal forma que la concentración final sea al 5%. Agitar tratando de no formar espuma, dejar en contacto entre 2 a 4 horas (no más de cuatro horas). La saponina 5% produce un 100% de lisis de glóbulos rojos y más de un 50% de lisis de glóbulos blancos en ese tiempo de contacto indicado. Centrifugar a 1500 g en centrífuga refrigerada y dejar un pellet de entre 0,5 a 1 ml.	<b>Giemsa</b> <b>Gram</b> <b>Ziehl-Neelsen</b> Kinyoun PAS MNP	AGS-E AGS-C ABHI-S	La recuperación de cualquier moho o levadura desde una muestra de sangre es significativa si esta se recogió en estricta esterilidad. Se puede aislar agentes de micosis sistémicas diseminadas como <i>Coccidioides</i> sp., <i>H. capsulatum</i> , <i>P. brasiliensis</i> y otros agentes de micosis oportunistas nosocomiales tales como <i>Candida</i> spp., <i>Aspergillus</i> spp. y mucorales. <i>C. albicans</i> desarrolla en los medios de cultivo en aproximadamente una semana; <i>C. neoformans</i> , otras levaduras y hongos patógenos primarios pueden requerir en cambio cuatro a seis semanas de incubación a 25-28 °C para crecer.	En ambos casos de sospechar histoplasmosis, se puedan realizar 4-6 microhematocritos, centrifugarlos, separar la capa de glóbulos blancos y con ellos hacer extendidos para colorear con Giemsa y poder observar las levaduras intracelulares características de <i>H. capsulatum</i> .
	Inoculación en medios líquidos	Extraer estérilmente entre 5 a 10 ml de sangre al paciente, desinfectar con alcohol 70° el diafragma de goma de las botellas de medio de cultivo y usando una aguja estéril, se coloca en el tubo con el medio. Pueden utilizarse botellas para cultivo de bacterias aeróbicas	Incubar los frascos recibidos a 25-28°C durante cuatro a seis semanas con observación diaria. Previamente se airean los frascos.	<b>Gram</b> <b>Giemsa</b>	BHI bifásico o medio líquidos para aerobios de uso bacteriológico. Se realizan subcultivos a las 48 horas y una vez por semana durante 6 semanas en AGS y se examina al microscopio con coloración de Gram.	Los medios de uso común en bacteriología habitualmente permiten el aislamiento de levaduras aunque su porcentaje de recuperación y el de los hongos patógenos primarios es mucho menor que en los bifásicos. <b>Es importante</b> después de cada observación en el medio bifásico agitar con suavidad el frasco a fin de reinocular la superficie del agar. Actualmente los medios para métodos automatizados (Bactec, Bact-aler ) permiten buena recuperación de levaduras.	
MÉDULA OSEA	Colocar en tubo estéril, con o sin heparina.	Inocular directamente en los medios de cultivo.	Realizar un microhematocrito, y con la capa de blancos realizar <b>Giemsa</b> , <b>Gram</b> <b>Ziehl-Neelsen</b> , MNS.	AGS-E AGS-C ABHI-S	Este material sólo se envía al laboratorio de micología cuando se sospecha una micosis sistémica, en especial <b>histoplasmosis</b> , pero el aislamiento de cualquier hongo micelial o levadura tiene significación clínica si la muestra se recogió en estricta esterilidad.	Incubar el material hasta 8 semanas.	

AGS E agar Sabouraud modificado por Emmons, AGS-CC: agar Sabouraud con cloranfenicol y cicloheximida, AGS-C: agar Sabouraud con cloranfenicol, ABHI-S: agar infusión cerebro corazón sangre. **NOTA** Los medios usados se preparan en tubos a menos que se indique lo contrario. Para preparados microscópicos es conveniente usar portaobjetos limpios, preferiblemente nuevos, previamente flameados y dejados enfriar a temperatura ambiente. Para realizar frotis finos se puede presionar y deslizar un portaobjetos limpio sobre el que contiene la muestra. Realizar siempre extendidos de más en caso de necesitar realizar coloraciones adicionales.



En la siguiente tabla se esquematiza el procesamiento de muestras clínicas según su origen y según se traten de muestras normalmente contaminadas o no.

	Examen directo							Cultivo						
	Fresco con KOH	Tinta china	GRAM	GIEMSA	GRAM WEIGERT	KINYOUN	MNP (tinción de plata)	Sabouraud sin antibiótico	BHI sangre / Sabouraud sangre	Sabouraud con antibiótico	Sabouraud con antibiótico y cicloheximida	Medio bifásico	Medio de ácido caféico	Czapec sin sacarosa y papel parafinado
<b>Muestras estériles</b>														
SANGRE PARA LISIS CENTRIFUGACIÓN			X	X			O	S	S	S				
HEMOCULTIVO EN FRASCO			X	X			O	Rp		Rp		S		
MÉDULA ÓSEA	X		X	X		X	O	S	S	S	S			S
SNC	X	X	X	X		X	O	S	S	S	S			S
LÍQUIDOS DE PUNCIÓN	X		X	X		X	O	S	S	S	S			
BIOPSIAS	X		X	X	X	X	O	S	S	S	S			
PUNCIÓN SUPRAPÚBICA	X						O	Sp						
<b>Muestras no estériles</b>														
MATERIALES RESPIRATORIOS	X		X	X	X*	X	X*	S	S	S	S			S
EXUDADOS Y PUS	X		X	X		X	O	S	S	S	S			S
OJOS	X		X	X				S	S	S	S			
OIDOS	X		X	X				S	S	S	S			
MATERIAL NASOFARÍNGEO	X		X	X			O	S	S	S	S			
MATERIAL DE SENOS	X		X	X				S	S	S	S			
BIOPSIA DE PIEL Y MUCOSAS	X		X	X		X	O	S	S	S	S			

O= optativo

X= realizar siempre

X\*= en caso de sospecha de *P. carinii*

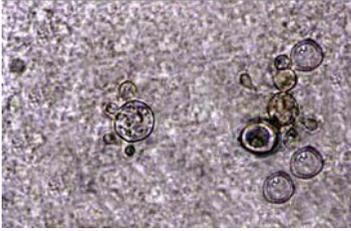
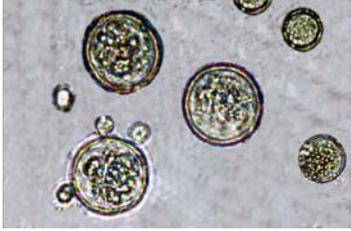
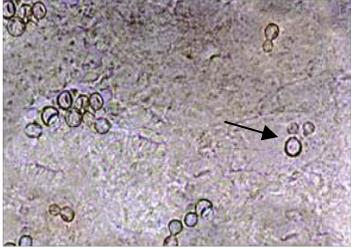
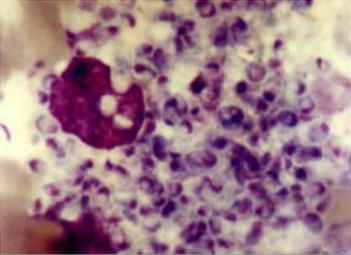
Rp = repique en placa

S= siembra directa

Sp= siembra en placa



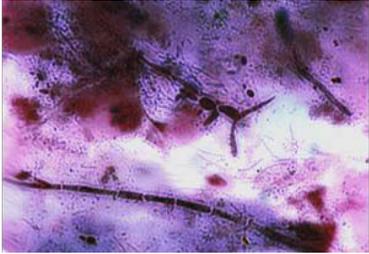
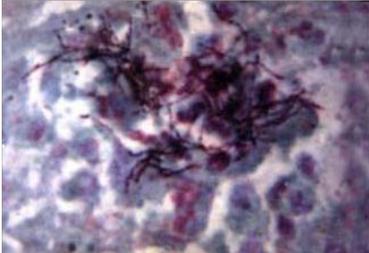
## CARACTERÍSTICAS DE LOS AGENTES DE MICOSIS SISTÉMICAS AL EXAMEN MICROSCÓPICO DIRECTO

AGENTE	CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS AL EXAMEN DIRECTO	
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	<p>Las formas características de este agente se observan, tanto en el examen directo con KOH como en las coloraciones de Giemsa, PAS y MNP, como células esféricas de brotación múltiple y anisométrica de 10 a 25 <math>\mu\text{m}</math> de diámetro cuyos brotes pueden tener de 1 a 10 <math>\mu\text{m}</math> de diámetro, de paredes gruesas y refringentes que asemejan una doble pared. Estas estructuras pueden ser escasas en la muestra predominando células de gemación simples de 1 a 10 <math>\mu\text{m}</math> que pueden confundirse con <i>B. dermatitidis</i> (no existe en nuestro país). También pueden verse las características ruedas de timón que consisten en grandes células esféricas rodeadas de múltiples brotes periféricos de pequeño tamaño. Otras veces aparece como cortas cadenas de 3 a 4 células.</p>	 <p>Fresco con KOH 400x</p>
<i>Coccidioides</i> sp.	<p>Se observa en el examen directo con KOH y las coloraciones de MNP, HE y PAS como cuerpos esféricos de 20 a 60 <math>\mu\text{m}</math>, de paredes gruesas y sin yemas, en cuyo interior contienen gran cantidad de endosporos de 2 a 5 <math>\mu\text{m}</math>. Las esférulas más pequeñas pueden no contener endosporos (esférulas inmaduras). No se observan con la coloración de Gram ni con Tinta China.</p>	 <p>Fresco con KOH 400x</p>
<i>Blastomyces dermatitidis</i>	<p>Se observan en el examen directo con KOH y en las coloraciones de Giemsa, PAS y MNP como células esféricas de brotación simple (unigemente), el brote es de cuello ancho. Esta micosis se encuentra casi exclusivamente en los EE.UU.</p>	 <p>Fresco con KOH 400x</p>
<i>Histoplasma capsulatum</i> var. <i>capsulatum</i>	<p><b>No se observa sin coloración.</b> En las tinciones de Giemsa, PAS y MNP se ven como levaduras intracelulares ovaladas de 2 a 5 <math>\mu\text{m}</math> de diámetro mayor, generalmente ubicadas dentro de grandes macrófagos y ocasionalmente dentro de polinucleares. Tienen la particularidad de colorearse en medialuna. No se ven con la coloración de Gram.</p>	 <p>Giemsa 1000x</p>



<i>Sporothrix schenckii</i>	<p>En el examen directo en fresco y en la coloración de PAS se pueden observar el cuerpo asteroide formado por una célula central ovalada o esférica de 3 a 5 <math>\mu\text{m}</math> de diámetro rodeada por una corona de rayos de material eosinofílico, pero su hallazgo es ocasional. En los cortes histológicos teñidos por PAS o Giemsa generalmente se observan levaduras en forma de cigarro, esférica y ovalada, de 1-3 x 3-10 <math>\mu\text{m}</math>, cuyo citoplasma se tiñe irregularmente. En general son muy difíciles de detectar. No se ven con KOH ni en la coloración de Gram.</p>		Fresco con KOH 400x		Giemsa 1000x
Complejo <i>Cryptococcus neoformans</i>	<p>Se observa mejor en los preparados con Tinta China y con la tinción de Mucicarmín de Mayer. Se ve como una levadura de pared gruesa, gemante o no, de 4 a 20 <math>\mu\text{m}</math> de diámetro, rodeada de una cápsula refráctil mucóide que se tiñe de rojo en la coloración de Mayer. En ocasiones puede tener brotación múltiple. También se tiñe con Gram, MNP, PAS y Giemsa. Se pueden detectar en el examen directo con KOH pero generalmente no se aprecia la cápsula característica.</p>		Tinta china 400x		
<i>Malassezia</i> sp.	<p>En el examen directo se ven levaduras con brotación monopolar sobre una base ancha, en forma de botella. En muestras de micosis sistémicas no se ven los filamentos cortos que se observan en las micosis superficiales. Se tiñen muy bien con azul de metileno al 1%. También se tiñen con Gram y Giemsa.</p>		Gram 1000x		
<i>Candida albicans</i> , y otras levaduras	<p>Se observan en el examen directo con KOH y las coloraciones como levaduras en gemación, de 3 a 8 <math>\mu\text{m}</math> de diámetro, que pueden formar pseudomicelio. Son positivas a la coloración de Gram y se tiñen también con PAS, MNP y Giemsa.</p>		Gram 400x		



<i>Trichosporon beigeli</i>	<p>Esta levadura se ve en los preparados en fresco con KOH como células levaduriformes, pseudomicelio, micelio verdadero con artrosporas (artroconidias) y blastosporas de 2 a 7 x 3 a 14 <math>\mu</math>m. Cuando no observan blastosporas es necesario diferenciarlo de <i>Geotrichum</i> sp. Se tiñen con Gram y Giemsa.</p>		Gram 400x
<i>Nocardia</i> spp.	<p>No forma granos cuando causa infecciones sistémicas. Se observa en la coloración de Gram como una bacteria filamentososa ramificada, de no más de 0,2 a 2 <math>\mu</math>m de diámetro que puede fragmentarse dando formas cocoides y bacilares, Gram positivas o Gram variables. Por ser parcialmente ácido alcohol resistente se tiñe con la tinción de ZN, siendo necesario confirmar su presencia con la coloración de Kinyoun. También se pueden observar en las preparaciones con KOH y las coloraciones de Giemsa, PAS y MNP.</p>		Kinyoun 1000x
<i>Aspergillus</i> spp.	<p>En el examen directo con KOH se ven hifas hialinas, de 3-10 <math>\mu</math>m de diámetro, ramificadas dicotómicamente en ángulo de 45°, tabicadas y de aspecto uniforme. En los cortes histológicos de las biopsias de pulmón suelen verse además las cabezas aspergilaras. Se colorean bien con MNP, PAS y Giemsa. Difícilmente se observan con la coloración de Gram.</p>		Fresco con KOH 400x
<i>Zygomycetes</i>	<p>En el examen directo con KOH se ven hifas hialinas anchas, de 10-30 <math>\mu</math>m de ancho, sin tabiques y con frecuencia distorsionadas. Las hifas pequeñas suelen parecerse a las aspergilaras ya que ocasionalmente se ven tabiques. Se tiñen bien con HE y PAS, en general no se colorean con MNP ni Gram.</p>		Fresco con KOH 400x



Agentes de  
hialohifomicosis  
(*Pseudoallescheria boydii*  
*Fusarium* spp.  
*Penicillium* spp)

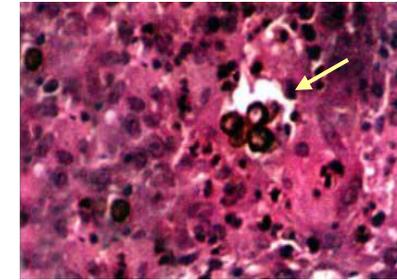
En las preparaciones con KOH se ven hifas hialinas septadas de 2 a 7  $\mu\text{m}$  de diámetro semejantes a las aspergulares.  
Se tiñen con MNP, PAS, HE y Giemsa. No se ven fácilmente con la coloración de Gram.



Fresco con KOH  
400x

Agentes de cromomicosis  
(*Fonsecaea pedrosoi*  
*Cladosporium carrionii*  
*Phialophora verrucosa*)

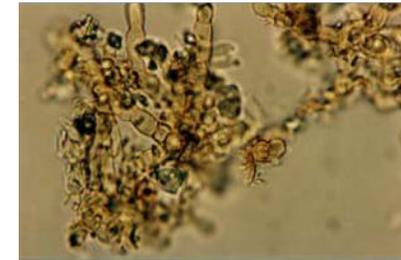
En fresco con KOH y/o con coloraciones como HE y PAS se observan células escleróticas o cuerpos de Medlar, estas estructuras se ven como una o múltiples células redondeadas de color café o amarillo ocre de 4-12  $\mu\text{m}$  de diámetro, de pared gruesa con inclusiones citoplasmáticas y septos. Esto es patognomónico de cromomicosis.



PAS 400x

Agentes de  
feohifomicosis

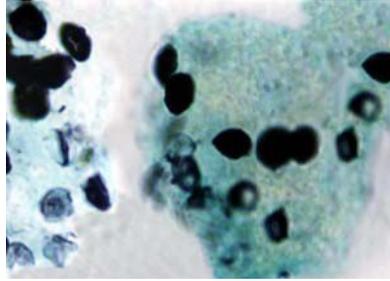
En fresco con KOH y/o con coloraciones como HE y PAS se observan hifas coloreadas tabicadas, vesiculosas, o en cadenas moniliformes, ramificadas, de 1 a 3  $\mu\text{m}$  de diámetro y de longitud variable. A veces se ven elementos levaduriformes.



Fresco con KOH 400x

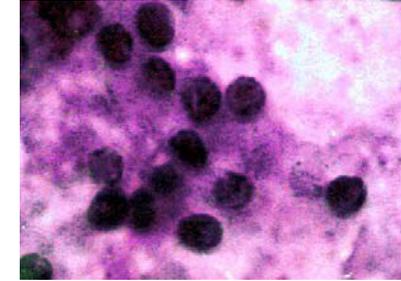


*Pneumocystis jirovecii*



MNP 1000x

Con coloración Gram-Weigert y MNP se observan ascosporas o formas tróficas de 5-10  $\mu\text{m}$  de diámetro con aspecto de copa, agrupado o aislado. Con coloración de Giemsa es muy difícil la observación. La mejor muestra para el diagnóstico es el BAL proveniente de pacientes vírgenes de tratamiento.



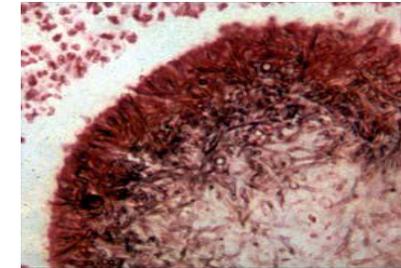
Gram-Weigert 1000x

Eumicetomas  
(*Madurella* spp.  
*Scedosporium*  
*apiospermum*, etc)

Aspecto macroscópico:  
granos o esclerotes  
cuyo tamaño, forma,  
consistencia y color  
varían según el agente.



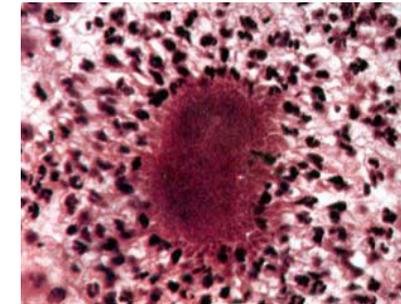
**Aspecto microscópico:** en el interior de los granos se observan hifas de diámetro mayor de 2  $\mu\text{m}$ , ramificadas y a veces tortuosas. Se pueden ver en fresco con KOH, Gram, Kinyoun, HE, MNP y PAS.



Grano MNP 400x

Actinomicetomas (*Nocardia*  
spp. *Actinomadura*, sp.  
*Streptomyces somaliensis*)

**Aspecto microscópico:** en el interior de los granos se observan filamentos de diámetro de 1  $\mu\text{m}$  ramificados y poseen algunas formas cocoides o bacilares. Se tiñen con Gram, Kinyoun y MNP. Algunos son parcialmente ácido alcohol resistentes. NO SON HONGOS.



Grano Gram 400x



## IDENTIFICACIÓN DE CEPAS

Cuando se observa el desarrollo de una colonia sobre cualquiera de los tubos del primocultivo, se procede a determinar a qué grupo de agentes causales pertenece.

A continuación se detallan las principales pruebas diferenciales de cada grupo: **Hongos dimorfos, levaduras, hongos monomorfos filamentosos y actinomicetes aerobios.** Se resaltan aquellas que se consideran posibles de realizar en todo laboratorio de micología médica a fin de identificar en forma presuntiva los principales agentes de micosis sistémicas. Las pruebas sin marcar requieren mayor infraestructura, son onerosas, y se centralizan en laboratorios de referencia.

Los procedimientos a seguir para realizar las preparaciones microscópicas y las pruebas de identificación presuntiva así como las fórmulas de los reactivos, soluciones y medios de cultivo se detallan en **PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO**

Antes de realizar las pruebas diferenciales para cada grupo es necesario purificar la cepa para evitar pérdida de tiempo y dinero o, lo que es más grave, identificaciones erróneas.

Los hongos aislados a partir de secreciones bronquiales y otros que se detallaron en **medidas de bioseguridad** deben procesarse en **CABINA DE SEGURIDAD BIOLÓGICA**, especialmente cuando se trata de cultivos entre 22 – 30 °C (fase saprofítica infectante)

### A-HONGOS DIMORFOS

Todos los hongos filamentosos crecidos sobre medios de cultivo para aislamiento primario a 25° - 28 °C son sospechosos de ser patógenos primarios u oportunistas si provienen de muestras de secreciones, fluidos corporales y tejidos profundos. Las muestras de sitios normalmente contaminados, como por ejemplo esputo, pueden tener flora agregada contaminante exógena o endógena.

Las características macro y microscópicas de los cultivos a 25°-28 °C y a 37 °C se detallan en **DESCRIPCIÓN MACROSCÓPICA Y MICROSCÓPICA DE LOS CULTIVOS DE HONGOS DIMORFOS.**

### PRUEBAS DIFERENCIALES PARA IDENTIFICACIÓN DE HONGOS DIMORFOS

(TRABAJAR EN CABINA DE SEGURIDAD BIOLÓGICA)

Todo estudio realizado para la identificación de hongos debe ser iniciado con la observación microscópica del agente previamente disgregado con azul de lactofenol (LF-AA).

*Coccidioides sp.* es altamente peligroso en su fase filamentosos ya que forma artroconidios infectantes en 7-10 días a temperatura ambiente. Se debe trabajar en CSB II humedeciendo la colonia con agua destilada estéril y una o dos gotas de tween-80 antes de subcultivarlo o disgregarlo para la observación microscópica. Para la observación microscópica es preferible inactivar el cultivo con formalina durante 8 horas antes de la observación.

No es recomendable hacer cultivo en lámina, ni colonia gigante en placa, debido al alto riesgo de infección. Cuando se observan artroconidios en cultivo de 25-28 °C es necesario hacer la conversión "in vitro" (formación de esférulas) ya que es micromorfológicamente similar a otros saprófitos que no producen esférulas. Son macromorfológicamente similares a *Coccidioides sp.*: *Geotrichum sp.*, *Trichosporon sp.*, *Scopulariopsis sp.* y *Chrysosporium sp.*, incluso *Chrysosporium parvum* a altas temperaturas produce adiasporas que se parecen a las esférulas del *Coccidioides sp.*

*Histoplasma capsulatum* hay que ser extremadamente cuidadoso y trabajarlo en CSB II.

*Blastomyces dermatitidis*, *P. brasiliensis*, *H. capsulatum* y *S. schenckii* a 22 – 28 °C crecen en forma filamentosos y a 37 °C como levadura en medios **con sangre desfibrinada**. Para confirmar su identificación es necesario demostrar la conversión de la fase filamentosos a levaduriforme y viceversa, siendo muy difícil a veces lograr revertir la fase micelial a levadura en cuyo caso es necesario revertir mediante inoculación en animales.

	<i>Coccidioides sp.</i>	<i>P. brasiliensis</i>	<i>H. capsulatum</i>	<i>S. schenckii</i>	<i>B. dermatitidis</i>
Tolerancia a la cicloheximida a 28°C	•	•	•	•	•
Tolerancia a la cicloheximida a 37°C	•	•	•	•	•
Crecimiento a 28 °C	•M	•M	•M	•M	•M
Crecimiento a 37 °C	•M	•L	•L	•L	•L
Conversión "in vitro" de artroconidios a esférulas	◦				
Conversión de la fase micelial a levaduriforme		◦	◦	◦	◦
Conversión de la fase levadura a fase micelial	◦	◦	◦	◦	◦
Detección de exoantígenos	◦	◦	◦	◦	◦
Inoculación en animales	◦	◦	◦	◦	◦

• Pruebas que deben realizarse en laboratorios de complejidad intermedia.  
◦ Pruebas que pueden derivarse al laboratorio de referencia.

M: crecimiento en forma de micelio, L: crecimiento en forma de levadura



*Sepedonium* sp. y *Scopulariopsis* sp. pueden ser confundidos con *H. capsulatum* porque forman macroconidios verrugosos pero no son dimorfos.

Los hongos saprófitos en general son inhibidos por la cicloheximida, raramente crecen a 37 °C y no son dimorfos.

Las pruebas de inmunodifusión (ID) para detección de exoantígenos simplifican el problema de la conversión "in vitro" e "in vivo" y disminuyen el riesgo del personal.

## B-LEVADURAS

La identificación de las levaduras puede variar desde unas pocas pruebas simples, para identificación presuntiva de *Candida albicans* y complejo *Cryptococcus neoformans*, a una gran variedad necesarias para identificar todas las levaduras comúnmente aisladas en los laboratorios de micología.

### PRUEBAS DIFERENCIALES PARA IDENTIFICACIÓN DE LEVADURAS

	<i>C. albicans</i>	<i>C. neoformans</i>	Otras levaduras
Prueba de formación de tubo germinativo	•		
Prueba de formación de clamidosporos	•		
Agar semillas de girasol		•	
Prueba de la producción de ureasa		•	•
Crecimiento a 28°C y 37°C	•	•	•
Producción de fenoloxidasas		•	
Pruebas rápidas detección de ureasa		•	
Detección de nitrato reductasas		•	
Crecimiento en ChromAgar	•		•
Métodos comerciales para identificación de levaduras (API C32)			•
Crecimiento en Extracto de malta para estudio micromorfológico			•
Cultivo en lámina en agar morfología (Difco)			◦
Crecimiento en agar morfología (Difco) para macromorfología			◦
Asimilación de fuentes de carbono y de nitrógeno			◦
Fermentación de hidratos de carbono			◦
Crecimiento en medio libre de vitaminas			◦
Producción de ascospores			◦

- Pruebas que deben realizarse en laboratorios de complejidad intermedia.
- Pruebas que pueden derivarse al laboratorio de referencia.

Cada laboratorio debe decidir respecto a la identificación de cepas de levaduras; teniendo en cuenta que las levaduras aisladas de secreciones respiratorias no son significativas, excepto si se trata de complejo *C. neoformans* y que la mayoría de las

levaduras aisladas de lesiones mucocutáneas, orina y sangre son *C. albicans*. Consideramos que es suficiente con llegar a identificar presuntivamente estas dos especies y derivar el resto de las cepas a centros de referencia evitando así costos adicionales innecesarios.

En el Cuadro I del anexo se describen las principales características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas de las levaduras aisladas con mayor frecuencia de muestras clínicas.

## MÉTODOS COMERCIALES

La laboriosidad y el alto costo que representa realizar el método clásico de identificación de levaduras ha llevado a la elaboración de métodos comerciales cada vez más eficaces y rápidos, los cuales permiten identificar un elevado porcentaje de las levaduras de interés en infecciones hospitalarias.

Esta metodología permite que la mayoría de los hospitales puedan tener acceso a la identificación de levaduras a nivel de especie, obteniéndose un resultado altamente confiable en la mayoría de los casos.

Los métodos que existen actualmente en el mercado son los siguientes:

### IDENTIFICACIÓN PRESUNTIVA:

- CHROMagar Candida \*
- CPS ID2 (bioMérieux)

### IDENTIFICACIÓN DEFINITIVA:

- ID 32C (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France)\*
- API 20C Aux-system (BIOMÉRIEUX-VITEK, Hazelwood.)
- VITEK YBC SYSTEM (BIOMÉRIEUX-VITEK)
- VITEK 2 SYSTEM
- Fungichrom ® \*
- Yeast Star
- Auxacolor
- RapID Yeast Plus system
- Api Candida

\* Las descripción de las metodologías se desarrolla en el anexo **PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO.**

## CHROMAGAR CANDIDA

El CHROMagar es un medio de cultivo cromogénico de identificación presuntiva para *C. albicans*. A diferencia de otros agares cromogénicos este puede identificar presuntivamente *C. glabrata*, *C. tropicalis* y *C. krusei* en 72 horas de incubación a 30 °C.

El método posee una sensibilidad y especificidad cercana al 100% para *C. albicans* y es recomendable utilizarlo como medio de aislamiento cuando las levaduras son observadas en el examen directo de materiales de origen clínico, sobre todo aquellos



materiales que pueden poseer mezclas, ya que permite una fácil separación cromogénica de estas.

Posee una sensibilidad de 98.8% y una especificidad de 100% para *C. albicans*; 66.7% y 99.8% para *C. tropicalis*, 100% y 100% para *C. krusei* y 98% y 95.7% para *C. glabrata*. Sin embargo, estos resultados varían según los autores.

Se debe seguir rigurosamente las indicaciones del fabricante para la preparación del medio, ya que esto puede producir errores sobre todo en el tiempo de observación.

### **ID 32C (BIOMÉRIEUX, MARCY L'ÉTOILE, FRANCE)**

El equipo consiste en una tira de plástico descartable con 32 pocillos, los cuales contienen 29 sustratos deshidratados para pruebas de asimilación (carbohidratos, ácidos orgánicos y aminoácidos) una prueba de sensibilidad a cicloheximida y una prueba colorimétrica para determinar hidrólisis de la esculina y un control negativo.

El procedimiento se realiza según indicaciones del fabricante, pudiéndose obtener resultados a las 48 horas de incubación a 30 °C. La lectura se realiza visualmente y el crecimiento se determina por presencia de turbidez en el pocillo correspondiente.

Los resultados se convierten en un biocódigo numérico de 8 dígitos que permite la identificación a través de un manual de códigos (ID 32C índice analítico de perfiles). La identificación requiere de la observación micromorfológica. Este es el más comúnmente utilizado por los países europeos.

Permite identificar el 92% de los aislamientos comunes y el 85 % de los aislamientos más raros. Entre las especies que no pudieron ser identificadas se encuentran: *C. albicans*, *C. guilliermondii*, complejo *C. neoformans*, *Rhodotorula* sp. y *Saccharomyces cerevisiae*. Este sistema permite una mejor identificación de cepas atípicas.

### **API 20C AUX SYSTEM (BIOMÉRIEUX VITEK, INC., HAZELWOOD, MO.)**

El equipo consiste en una tira de plástico descartable con 20 pocillos los cuales contienen 20 sustratos deshidratados para pruebas de asimilación.

El procedimiento se realiza según indicaciones del fabricante pudiéndose obtener resultados a las 72 horas de incubación a 30 °C. La lectura se realiza visualmente y el crecimiento se determina por presencia de turbidez en el pocillo correspondiente.

Los resultados se convierten en un biocódigo numérico de 7 dígitos el cual permite la identificación a través de un manual de códigos (API 20C índice

analítico de perfiles). La identificación requiere la observación micromorfológica y a veces pruebas suplementarias como utilización de KNO<sub>3</sub>, crecimiento a 42 °C y producción de ureasa. Este es el sistema más utilizado en EEUU.

Este sistema permite identificar el 97 % de los aislamientos comunes y un 88% de los menos comunes. Entre las especies que no pudieron ser identificadas se encuentran: *C. albicans*, *C. guilliermondii* y *C. krusei*.

### **VITEK YBC SYSTEM (BIOMÉRIEUX-VITEK)**

El equipo consiste en una tira de plástico descartable con 30 pocillos, los cuales contienen 26 sustratos deshidratados para pruebas de asimilación y 4 controles negativos. El procedimiento se realiza según indicaciones del fabricante, pudiéndose obtener resultados a las 24-48 horas de incubación a 30 °C. La lectura se realiza a través de un sistema computarizado.

La identificación requiere la observación micromorfológica. Este sistema permite identificar alrededor del 89% de los aislamientos, sin embargo, este porcentaje varía según las especies estudiadas. Entre las especies cuya identificación puede ser errónea o pueden no ser identificadas se encuentran: *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. rugosa*, *C. zeylanoides*, complejo *C. neoformans*, entre otras. Este método posee la ventaja de que puede identificar presuntivamente *C. dubliniensis*.

### **VITEK 2 ID-YST SYSTEM (SISTEMA AUTOMATIZADO PARA IDENTIFICACIÓN Y SENSIBILIDAD A ANTIFÚNGICOS)**

Este es el más reciente de los sistemas y todavía está en evaluación. Puede identificar especies de levaduras a las 15 horas a través de una técnica muy sensible basada en la fluorescencia.

El ID YST comprende 47 reacciones bioquímicas e incluye nuevas especies descritas. El método permitió identificar 92 % de las cepas probadas. Un 6,2% fue no identificado (*C. inconspicua*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. norvegensis*, *C. parapsilosis*) y 1,7% erróneamente identificada (*C. kefir*, *C. krusei*, *S. cerevisiae*)

### **FUNGICHROM® I**

Es un equipo que basa la identificación de levaduras en la presencia o ausencia de enzima, que se visualiza mediante reacciones colorimétricas. La actividad enzimática se revela con 3 tipos de reacciones:

- Hidrólisis de sustratos cromogénicos



- Asimilación de sustratos naturales: utilización de GAL, SAC, TRE, MAL, CEL, RAF, LAC; resistencia a la cicloheximida (Actidione e hidrólisis de urea).
- Oxidación de sustratos sintéticos (fenoloxidasas).

El equipo consiste en una tira de plástico descartable con 16 pocillos, los cuales contienen los sustratos. Se prepara un inóculo a partir de un cultivo de 24 horas y se siembran dos gotas en cada una de las celdas, se incuban 24 o 48 horas a 30 °C y, simultáneamente, se debe realizar el examen macro y microscópico de las colonias con lo que la sensibilidad aumenta a 91 %.

### C-HONGOS FILAMENTOSOS MONOMORFOS

Los principales hongos miceliales capaces de causar micosis sistémicas oportunistas son los pertenecientes al género *Aspergillus*, los Mucorales pertenecientes a los géneros *Absidia*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Fusarium*, *Penicillium* y otros como *T. cutaneum* y *P. boydii*, los dematiáceos: *Cl. trichoides*, *Wangiella dermatitidis* y *F. pedrosoi* (estos tres últimos son poco frecuentes).

Sin embargo, en pacientes de alto riesgo, inmunosuprimidos, cualquier hongo saprófito puede causar una infección sistémica.

Muchas veces es difícil identificar los mohos monomorfos, en especial cuando no forman conidios u otras estructuras características en los medios de cultivo de rutina de micología, en estos casos se prueban distintos medios y condiciones hasta obtener estructuras que permitan su identificación.

En general en los medios Agar harina de maíz (HMA), Agar papa dextrosado (PDA), o Agar extracto de malta (EMA) la producción de conidios y otras estructuras es buena. En muchos casos es conveniente realizar cultivos en lámina de la cepa sobre los medios, a fin de poder determinar la disposición de los conidios, su forma de unión a las hifas o a los conidióforos y su conidiogénesis.

En el Anexo se muestran los esquemas para encarar la identificación, separándolos en grandes grupos, donde se consideran los principales patógenos oportunistas y se incluyen los agentes de micosis subcutáneas.

### PRUEBAS DIFERENCIALES PARA IDENTIFICACIÓN DE HONGOS FILAMENTOSOS

**Cultivo en lámina y colonia gigante en EMA, HMA y PDA.**

**Crecimiento a 37 °C.**

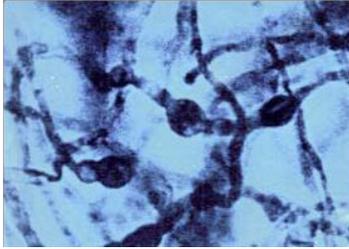
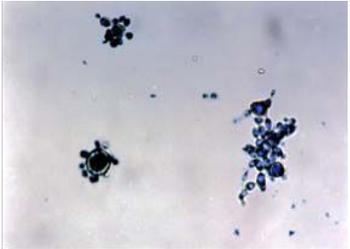
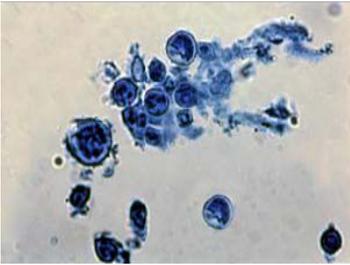
**Disgregados del cultivo en Lactofenol azul de algodón (LF-AA).**

**Actividad proteolítica de la gelatina o del suero coagulado de Löeffler.**

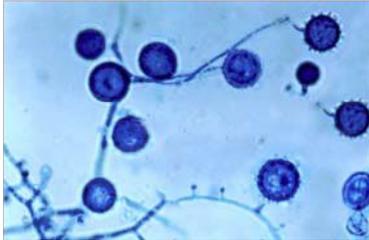
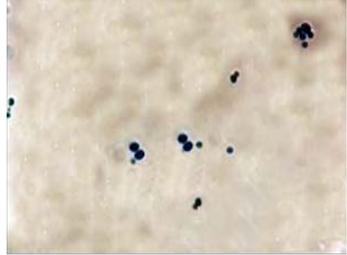
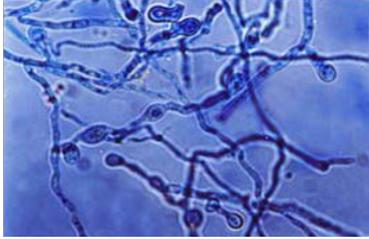
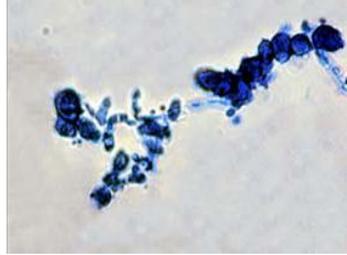
Las características macro y microscópicas de los cultivos a 25°-28 °C se detallan en **DESCRIPCIÓN MACROSCÓPICA Y MICROSCÓPICA DE LOS CULTIVOS DE HONGOS MONOMORFOS.**



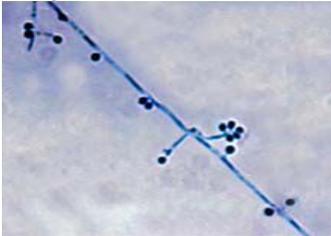
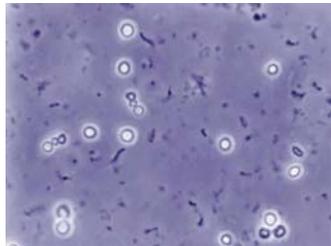
## CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS Y MICROSCÓPICAS DE LOS CULTIVOS DE HONGOS DIMÓRFICOS

	Fase saprofitica (Crecimiento a 25-28 °C)		Fase parasítica o levaduriforme (Crecimiento a 35-37 °C)	
	Aspecto macroscópico	Aspecto microscópico	Aspecto macroscópico	Aspecto microscópico
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	<p>Desarrollo lento (2 a 3 semanas), colonia rugosa o membranosa, cubierta por un micelio aéreo blanco (pardo con la edad) y de vellosidades cortas. El reverso puede ser de tostado a marrón. Algunos primocultivos dan colonias rugosas y cerebriformes. Crece en presencia de cicloheximida.</p>	<p>Hifas hialinas tabicadas y ramificadas con clamidosporas intercalares o terminales y raramente conidios sésiles, redondos u ovals de 3-4 µm, ubicados a los lados de las hifas.</p>  <p>Fresco LF-AA 400x</p>	 <p>Desarrollo lento, colonia cerosa o pastosa, cerebriforme y glabra, de color blanco. Con la edad adquiere color tostado. Puede ser inhibida por cicloheximida</p>	<p>Células levaduriformes semejantes a las descritas en el examen directo.</p>  <p>Fresco LF-AA 400x</p>
<i>Coccidioides</i> sp.	<p>Desarrollo rápido (3 a 10 días) al principio membranosa, húmeda y pegada al agar, rápidamente desarrolla un micelio aéreo blanco algodonoso, que se torna pardo con la edad. Algunas colonias pueden presentar color lavanda, rosado o amarillo. El reverso es incoloro. No es inhibido por la cicloheximida.</p> 	<p>Hifas hialinas, ramificadas y tabicadas que forman cadenas de artrosporas rectangulares, elipsoidales o en forma de barril, de pared gruesa, de 1,5 - 2,3 x 1,5 - 15 µm, separadas entre sí por una célula vacía característica. En los cultivos viejos casi todas las hifas forman artrosporas.</p>  <p>Fresco LF-AA 400x</p>	<p>Posee la misma morfología a las dos temperaturas.</p> 	<p>Sólo se obtiene en medios especiales donde se observan esférulas similares a las descritas en examen directo. En los medios de cultivo común, incubado a 37 °C, se observa lo mismo que a 25 °C. Es resistente a la cicloheximida.</p>  <p>Fresco LF-AA 400x</p>



Fase saprofitica (Crecimiento a 25-28 °C)		Fase parasítica o levaduriforme (Crecimiento a 35-37 °C)	
Aspecto macroscópico	Aspecto microscópico	Aspecto macroscópico	Aspecto microscópico
<p><i>Histoplasma capsulatum</i></p> <p>Colonia de desarrollo lento (dos semanas como mínimo), algodonosa, de micelio fino y denso de color blanco, pardo o amarronado. El reverso es incoloro, amarillo o anaranjado pardusco. No es inhibido por la cicloheximida.</p>	 <p>Hifas ramificadas y tabicadas, numerosas macroconidias esféricas y más raramente piriformes de 8-14 <math>\mu\text{m}</math> de diámetro, de paredes lisas o verrugosas que nacen de conidióforos tubulares dispuestos en ángulo recto con las hifas. Microconidias de 2-3 <math>\mu\text{m}</math>, redondas o piriformes, de paredes lisas o equinuladas, que nacen simples sobre cortos conidióforos o sésiles a los lados de las hifas.</p>  <p>Fresco LF-AA 400x</p>	<p>Colonia de aspecto pastoso o seroso, lisas y de color blanco, crema o rosado. Tienen tendencia a revertir a la fase filamentosa y necesitan medios adicionales con sangre para mantener la forma de levadura.</p> 	<p>Células levaduriformes ovales, de 3-5 x 2-3 <math>\mu\text{m}</math>. Los brotes nacen en el extremo de la célula. Es inhibido por la cicloheximida.</p>  <p>Fresco LF-AA 400x</p>
<p><i>Blastomyces dermatitidis</i></p> <p>Colonias de desarrollo lento (10 a 15 días), vellosas y blanquecinas y con pliegues radiales. Algunas cepas presentan un pigmento pardo difusible. Algunas cepas presentan un crecimiento levaduriforme al principio, tornándose vellosas en toda su superficie.</p>	 <p>Conidias ovales, piriformes o esféricas, de 2-10 <math>\mu\text{m}</math>, de pared lisa, que nacen de conidióforos laterales o en ramificaciones terminales. Los cultivos envejecidos presentan abundantes clamidoconidias de 18 <math>\mu\text{m}</math> de diámetro.</p>  <p>Fresco LF-AA 400x</p>	<p>Colonias cerebriformes, glabras, cerosas, de color amarillento a tostado.</p> 	<p>Levaduras grandes, redondas, de paredes gruesas, unigermantes semejantes a las observadas en el examen directo. Se pueden ver cortos segmentos de micelio.</p>  <p>Fresco LF-AA 400x</p>



Fase saprofitica (Crecimiento a 25-28 °C)		Fase parasítica o levaduriforme (Crecimiento a 35-37 °C)	
Aspecto macroscópico	Aspecto microscópico	Aspecto macroscópico	Aspecto microscópico
<p><i>Sporothrix schenckii</i></p> <p>Colonias de crecimiento rápido (2 a 3 días), pequeñas, cerosas y blancas, carecen de micelio aéreo algodonoso; a medida que crecen adquieren aspecto, húmedo, rugoso o membranoso. El color puede variar de crema a negro (también puede tener dos colores la misma colonia o variar de color por subcultivos). El reverso es claro. No es inhibido por cicloheximida.</p>	 <p>Hifas hialinas, delgadas, de 2 µm de diámetro, ramificadas y tabicadas. Las conidias nacen simpodialmente sobre dentículos formando racimos en los extremos de un conidióforo ("margarita") o a los lados de las hifas. Son piriformes, ovoides o elongadas de 3-6 x 2-3 µm, pero con el tiempo se vuelven esféricas y de paredes gruesas.</p>  <p>Fresco LF-AA 400x</p>	<p>Colonias de desarrollo rápido (2 a 3 días), levaduriformes, de color blanco a gris amarillento, semejante a colonias bacterianas. Las cepas aisladas de lesiones cutáneas pueden no crecer a 37 °C.</p>	 <p>Levaduras esféricas u ovoides, brotantes, semejantes a las descritas en examen directo de 1-3 x 3-10 µm.</p>  <p>Fresco LF-AA 400x</p>



## CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS Y MICROSCÓPICAS DE LOS CULTIVOS HONGOS MONOMÓRFICOS

### Aspecto macroscópico

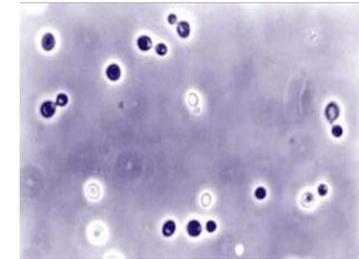
### Aspecto microscópico

Complejo *Cryptococcus neoformans*

Colonias de crecimiento rápido, lisas, húmedas brillantes y mucoides, semejantes a la de *Klebsiella* spp. Son inicialmente blancas y con la edad se tornan amarillas, crema, anaranjadas o tostadas. Es inhibido por la cicloheximida.



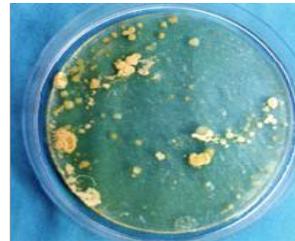
Células esféricas a ovoides, de pared delgada, de 2,5 a 20  $\mu\text{m}$  de diámetro, rodeadas por una cápsula mucosa polisacáridica de espesor variable, menor a la observada en el material clínico. Las células pueden tener brotes simples o múltiples y quedar unidos a la célula madre por un delgado cuello. Desarrolla más lentamente a 28° C que a 37° C.



Fresco LF-AA 400x

*Malassezia furfur*

No crecen en medios de cultivo comunes sólo lo hace en medios adicionados con aceites naturales y a una temperatura entre 35-37°C. Colonias de crecimiento rápido (2 a 7 días), secas, rugosas y de color tostado.



Células esféricas con brotación monopolar con una base ancha o en forma de botella.



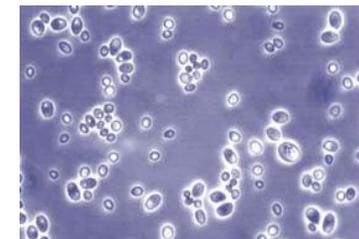
Fresco LF-AA 400x

*Candida albicans* y otras levaduras

Colonias de morfología variable, generalmente blancas a tostadas, lisas o anilladas, húmedas o secas, blandas o consistentes, de crecimiento rápido (2 a 4 días). Algunas colonias producen pseudohifas que la rodean dándole aspecto deshilachado.



La mayoría de las especies producen blastoconidios y pseudohifas pero pueden formar micelio verdadero. *C. albicans* se identifica por su habilidad de formar tubo germinativo y clamidosporas y crecer en ChromAgar virando al color verde. Es importante la identificación a nivel de especie.



Fresco LF-AA 400x

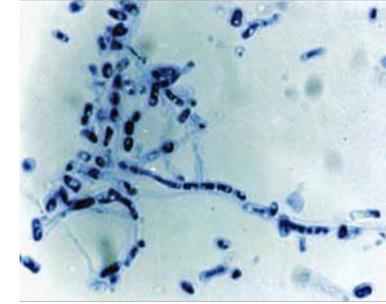


*Trichosporon beigeli*

Colonias de crecimiento rápido (2 a 5 días), lisas, secas, cerosas, membranosas, cerebriformes, anilladas translúcidas o blancas.



Hifas verdaderas que se parten en artrosporas de 2-4 x 3,5-9  $\mu\text{m}$  las que a su vez pueden originar células brotantes. También pueden observarse pseudohifas. No forma esporos sexuales. Es inhibido por la cicloheximida.



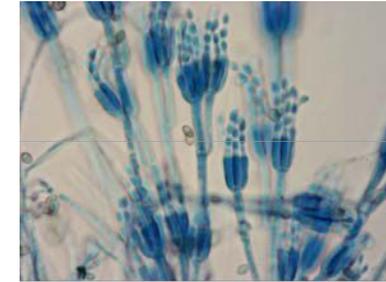
Fresco LF-AA 400x

*Penicillium* sp.

Colonias de crecimiento rápido (2 a 6 días), chatas y aterciopeladas o pulverulentas. La mayoría de las cepas tienen colores que varían del blanco al verde azulado, pueden ser amarillentas rosas o marrones. El reverso es incoloro a rojo oscuro o marrón.



Conidióforos (penicillus) rígidos ramificados o no. Las células conidiógenas son fiálides en forma de botellas agrupadas sobre un conidióforo simple o sobre una ramificación central del mismo llamada métula. Las fialoconidios son generalmente redondas, lisas o rugosas y se producen en cadenas basípetas.



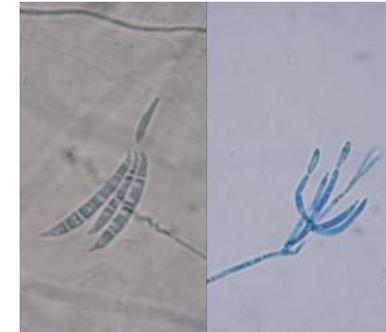
Fresco LF-AA 200x

*Fusarium* sp.

Colonias de crecimiento rápido (2 a 5 días), algodonosas, blancas, cuando son jóvenes se tornan color rosa o lavanda, con la edad ocasionalmente aparecen variantes amarillas.

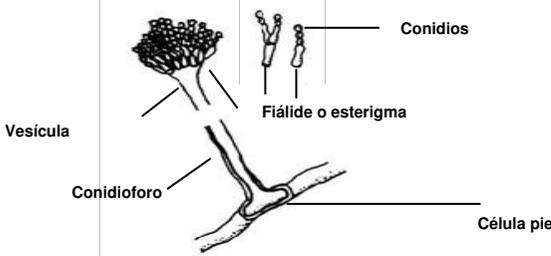
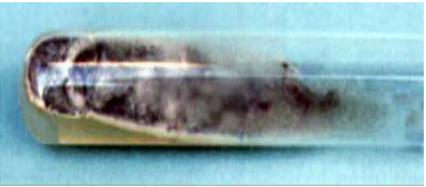
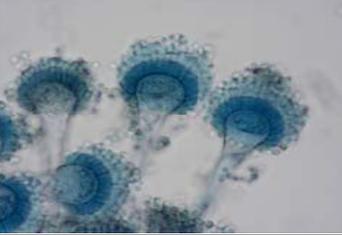
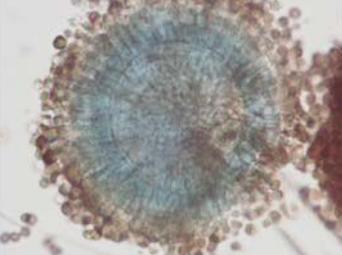


Todos los conidios nacen sobre fiálides. Macroconidios delgadas de 3-8 x 11-100  $\mu\text{m}$ , multicelulares, con 2 a 11septos, en forma de canoa o fusiformes dependiendo de la especie, éstas permiten diferenciar los géneros y las especies incluidas en el, pero desaparecen con él subcultivo. Microconidios pequeñas de 2-4 x 4- 8  $\mu\text{m}$ , uni o bicelulares, semejantes a las del género *Acremonium*.



Fresco LF-AA 400x



Todas las descripciones de este género se realizan sobre agar Czapek				
<p><i>Aspergillus</i> spp. Existen 18 grupos (Rapper y Fennell 1973)</p>	<p>Colonia que desarrolla a temperatura ambiente y sólo algunas especies pueden hacerlo a 37°C. Colonias de crecimiento rápido (3 a 5 días) de textura aterciopelada, rugosa, vellosa o algodonosa. El color varía desde blanco a rosado anaranjado, amarillo, verde a verde azulado, gris negro o marrón. El reverso puede ser rojo oscuro o lavanda.</p>		<p>Conidióforos erectos terminados en una vesícula hinchada sobre la cual asientan las células conidiogénicas (fiálides o esterigmas). Las fiálides pueden nacer directamente sobre la vesícula (cabeza uniseriada) o desde profiálides que asientan sobre éstas (cabeza biseriada).</p>	
<p>Sección FUMIGATI</p>	<p>Colonia inicialmente blanca, luego se torna verde azulado a gris con la edad. En los cultivos viejos el color puede ser marrón oscuro a gris amarronado. La textura es aterciopelada, la colonia es chata o plegada. Crece bien a 37°C e incluso algunas cepas a mayores temperaturas, hasta 65°C.</p>	 <p>Cabezas columnares estrictamente uniseriadas, con vesículas piriformes a subclavadas. Las células conidiógenas (fiálides), se ubican en la mitad o tercio superior de la vesícula. Conidióforo de pared lisa y hialina, los conidios son globosos a levemente elipsoidales y finamente rugosos.</p>	 <p>Fresco LF-AA 400x</p>	
<p>Sección FLAVI</p>	<p>Colonia de superficie color amarillo verdoso a verde amarillento, de textura rugosa o vellosa. Puede producir esclerocios inicialmente blancos, con el tiempo toman un color marrón oscuro a negro. El reverso es desde incoloro a marrón rojizo. Muchas cepas crecen mejor a 37°C que a 28°C.</p>	 <p>Cabezas uni y biseriadas, columnares y radiadas, respectivamente. Vesícula subglobosa, conidióforo rugoso, incoloro a marrón pálido. Conidios globosos a elipsoidales, lisos o finamente rugosos.</p>	 <p>Fresco LF-AA 400x</p>	
<p>Sección NIGRI</p>	<p>Colonia de superficie negra carbón, granular y chata, al principio es blanca. El reverso es incoloro a blanco.</p>	 <p>Cabezas estrictamente biseriadas y radiadas. Vesícula esférica cubierta en su totalidad por las méticas. Conidióforo hialino y liso, conidios globosos, de pared rugosa, ornamentados y de color negro a marrón oscuro</p>	 <p>Fresco LF-AA 400x</p>	



Zygomycetes	<p>Colonias vellosas de crecimiento extremadamente rápido (1 a 3 días), de color blanco al principio que se torna amarillo, gris amarronado o negro grisáceo con el tiempo. El reverso presenta colores claros.</p>		<p>Hifas gruesas con escasos tabiques y esporangios redondos con endosporos. Las partes a identificar se detallan en la figura.</p>		
Rhizopus sp.	<p>Colonia vellosa de crecimiento rápido, firme, pegajosa, de filamentos gruesos, de coloración blanca al principio y con el envejecimiento oscurece en diferentes tonalidades según la especie.</p>		<p>Los esporangióforos están poco ramificados, con frecuencia agrupados en racimos de 2 a 5. Presenta una apófisis pequeña y una columela grande globosa y lisa. Los esporangióforos se forman <b>opuestos</b> a los rizoides.</p>		Fresco LF-AA 200x
Mucor sp.	<p>Colonia vellosa de crecimiento rápido, de color gris o gris amarillento.</p>		<p>Los esporangióforos se originan con mayor frecuencia del sustrato y son más o menos ramificados según la especie. Los esporangios son globosos, sin apófisis y la columela es ovoide. <b>No forma rizoides.</b> Algunas especies forman clamidosporas</p>		Fresco LF-AA 100x
Absidia sp.	<p>Colonia de crecimiento rápido, de filamentos gruesos, blanca grisácea.</p>		<p>Presenta estolones y rizoides. Los esporangióforos <b>no nacen opuestos</b> a los rizoides. Esporangio globoso a piriforme con columela y una marcada apófisis cónica.</p>		Fresco LF-AA 200x



*Pseudoallescheria boydii*

Colonia de crecimiento rápido (2 a 6 días), algodonosa, de superficie blanca o gris y reverso verde grisáceo a negro amarronado. Crece bien a 37°C y es inhibido por la cicloheximida.



Conidios ovalados de 8-10 x 5-7  $\mu\text{m}$  de color marrón claro, nacen solitarios o en falsas cabezas de 3-4 conidios sobre células conidiógenas (anélides) de largo variable. En algunos cultivos pueden verse manojos de conidióforos llamados coremios. En agar papa glucosado forman peritecios de pared delgada de 140 a 200  $\mu\text{m}$  de diámetro que contienen ascosporas de extremos puntiagudos de 4-5 x 7-8  $\mu\text{m}$ .



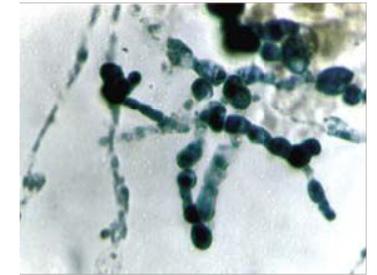
Fresco LF-AA 200x

*Madurella mycetomatis*

Colonia de crecimiento lento, plana en la periferia y centro cerebriforme, superficie aterciopelada, al principio puede presentar color blanco que se torna verde grisáceo. El reverso de la colonia es negro amarronado.



Filamentos septados y ramificados, con vesículas de 20-25  $\mu\text{m}$  de diámetro. Hifas hialinas en cultivos jóvenes y marrones en cultivos viejos. Escasos conidios piriformes y fiálides.



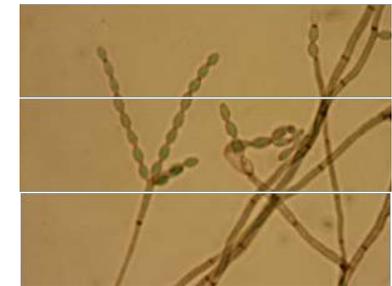
Fresco LF-AA 200x

*Cladophialophora carrioni*

Colonia de crecimiento lento, expandida, pulverulenta a lanosa, de verde grisáceo a oliváceo.



De la hifa conidiógena nace un tallo simple que sirve como conidióforo, ligeramente alargado en el extremo distal en el que se forman dos o más conidios de los que a su vez se forman dos o más conidios secundarios. La conidiación puede seguir hasta formar largas cadenas. La conidiación es acrópeta y al desprenderse presentan una cicatriz



Fresco LF-AA 400x



*Phialophora verrucosa*

Colonia de crecimiento lento color gris olivo oscuro a negro, al principio es elevada y después plana, a veces rugosa con prolongaciones radiales, finalmente un micelio gris cubre la colonia. El reverso es marrón oscuro a negro.



Se observan células conidiógenas (fiálides) en forma de botella, cortas o alargadas, terminales o laterales, con los conidios agrupados en el ápice en forma de falsas cabezas o en cadenas, según la especie.



Fresco LF-AA 1000x

*Fonsecaea* sp.

Colonia de crecimiento lento, color marrón negruzco, verde grisáceo, verde olivo o negro, vellosas, de superficie plana o plegada. El reverso va de marrón oscuro a negro.



Se observan los tres tipos de conidiación: fiálide (a), acroteca (b) y cladospórica (c); a) es similar a la anterior; b) conidióforos con conidios ovales en los extremos y a los lados de las hifas y c) esta última en el género es corta formando bifurcaciones arborescentes de donde se desprenden los conidios sin formar largas cadenas a diferencia del *Cladosporium*



Fresco LF-AA 400x



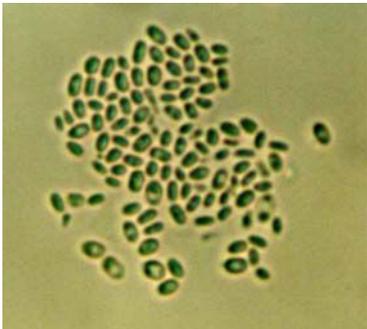
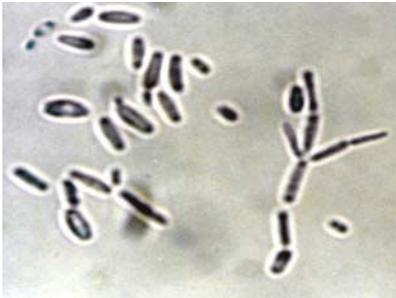
Fresco LF-AA 200x



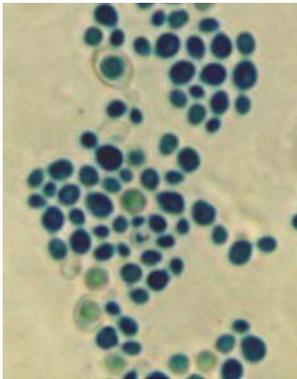
Fresco LF-AA 200x



**CARACTERÍSTICAS DE LEVADURAS AISLADAS FRECUENTEMENTE**

	MICROMORFOLOGIA (caldo extracto de levadura glucosa-peptona 72 hs a 25°C)	PUEDA AISLARSE:	OTRAS CARACTERÍSTICAS DE IMPORTANCIA																		
<i>C. parapsilosis</i>	 <p>Células ovoides de 3.0-4.0 x 5.0-8.0 µm, simples, en pares. Pueden presentarse pseudohifas y células cilíndricas de más de 20 µm de largo.</p>	<p><b>Infección</b> Endocarditis Endoftalmítis Onicomicosis (rara)</p> <p><b>Flora saprófita</b> Piel, esputo</p> <p><b>Hábitat en la naturaleza</b> Suelo, agua, plantas</p>	<p>Después de 7 días a 25 °C, las pseudohifas consisten en cadenas ramificadas de células cilíndricas con clusters o cadenas de blastoconidias. El crecimiento aeróbico es blanco, butiroso, liso y entero.</p>																		
<i>Candida glabrata</i>	 <p>Células subglobosas a ovoides de 2.5-4.0 x 3.0-6.0 µm, simples y en pares.</p>	<p><b>Infección</b> Pielonefritis Osteomielítis Vaginitis (rara)</p> <p><b>Flora saprófita</b> Orina, heces, esputo</p> <p><b>Hábitat en la naturaleza</b> Suelo, agua (raro)</p>	<p>Después de 14 días a 25 °C en <b>agar harina de maíz</b> no se observan pseudohifas. Las células se disponen en cortas cadenas. El crecimiento aeróbico es blanco a crema, suave, butiroso y entero.</p> <p><b>Comentario:</b> Para la identificación de rutina <i>C. glabrata</i> se distingue de <i>C. castellii</i> por sus requerimientos de vitamina. <i>C. glabrata</i> requiere piridoxina para su crecimiento pero no inositol.</p>																		
<i>Candida guilliermondii</i> (var. <i>guilliermondii</i> ) Teleomorfo: <i>Pichia guilliermondii</i> (var. <i>membranifaciens</i> ) Teleomorfo <i>Pichia ohmeri</i>	 <p>Células ovoides de 3.0-4.0 x 5.0-8.0 µm, simples, en pares. Pueden presentarse pseudohifas y células cilíndricas de más de 20 µm de largo.</p>	<p><b>Infección</b> Endocarditis Articulaciones Otitis (rara)</p> <p><b>Flora saprófita</b> Esputo, heces</p> <p><b>Hábitat en la naturaleza</b> Suelo, agua</p>	<p>Después de 7 días a 25 °C en <b>agar harina de maíz</b>, las pseudohifas consisten en cadenas ramificadas de cadenas de células cilíndricas con clusters o cadenas de blastoconidias. El crecimiento aeróbico es blanco, butiroso, suave, y entero.</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Asimilación</th> <th><i>P. guilliermondii</i></th> <th><i>P. ohmeri</i></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Melibiosa</td> <td>+</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>Melezitosa</td> <td>+</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>D-Xylosa</td> <td>+</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>L-Arabinosa</td> <td>+</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>D-Arabinosa</td> <td>+</td> <td>-</td> </tr> </tbody> </table>	Asimilación	<i>P. guilliermondii</i>	<i>P. ohmeri</i>	Melibiosa	+	-	Melezitosa	+	-	D-Xylosa	+	-	L-Arabinosa	+	-	D-Arabinosa	+	-
Asimilación	<i>P. guilliermondii</i>	<i>P. ohmeri</i>																			
Melibiosa	+	-																			
Melezitosa	+	-																			
D-Xylosa	+	-																			
L-Arabinosa	+	-																			
D-Arabinosa	+	-																			
<i>Candida krusei</i> Teleomorfo: <i>Issatchenkia orientalis</i>	 <p>Células ovoides, elongadas y cilíndricas, de 2.2-5.6 x 4.3-15.2 µm, se presentan aisladas, brotando y en cadenas.</p> <p>Se pueden observar células largas, curvadas, y pseudomicelio. Pueden formar película.</p>	<p><b>Infección</b> Diseminada</p> <p><b>Flora saprófita</b> Esputo</p> <p><b>Hábitat en la naturaleza</b> Agua, suelo</p>	<p>Después de 7 días a 25 °C en agar harina de maíz, las pseudohifas son abundantes. El crecimiento aeróbico es blanco tanino, pulverulento, rugoso, butiroso, ligeramente convexo con centro plano, bordes lisos a lobulados, con pseudomicelio. Algunos cultivos tienen olor ácido.</p> <p><b>Formación de ascosporas:</b> Kudryavtsev (1960) informó esporas esferoidales, lisas, una por ascó</p> <p><b>Resistente al Fluconazol</b></p>																		



	MICROMORFOLOGÍA (caldo extracto de levadura glucosa-peptona 3 días a 25 °C)	PUEDA AISLARSE:	OTRAS CARACTERÍSTICAS DE IMPORTANCIA												
<p><i>Candida lusitanae</i> Teleomorfo: <i>Clavispora lusitanae</i></p>	<p>Células subglobosas, ovoides o elongadas, de 2-6 x 3-10 µm, simples, en pares o en cortas cadenas.</p> 	<p><b>Infección</b> Diseminada</p> <p><b>Flora saprófita</b> Espujo, heces</p> <p><b>Hábitat en la naturaleza</b> Estiércol de animales</p>	<p>Después de una semana a 25 °C, se desarrolla abundante pseudomicelio.</p> <p><b>Formación de ascosporas:</b> Los ascos son bilobulados, contienen una o dos (rara vez tres o cuatro) ascosporas clavatas. Las ascosporas se liberan de los ascos inmediatamente después de su formación. La esporulación abundante se produce en dos a cuatro días a 17-25 °C después de mezclar los tipos compatibles en agar extracto de malta al 1%.</p> <p><b>Es resistente a la Anfotericina B.</b></p>												
<p><i>Candida tropicalis</i></p>	<p>Células subglobosas a ovoides de 3.5-7.0 x 5.5-10.0 µm, simples, en pares</p> 	<p><b>Infección</b> Diseminada</p> <p><b>Flora saprófita</b> Heces, esputo</p> <p><b>Hábitat en la naturaleza</b> Agua, frutas, melasa</p>	<p>Después de 7 días a 25 °C, en agar harina de maíz, se ven pseudohifas en cadenas ramificadas, células cilíndricas en cadenas con blastoconidias simples o en verticilo, puede presentar hifas septadas. El crecimiento aeróbico es blanco, butiroso, suave y con bordes rugosos. Fisiológicamente es similar a <i>C. maltosa</i> y <i>C. sake</i> de las que se diferencia</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>Crec. 35 °C</th> <th>Asimilación almidón</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td><i>C. maltosa</i></td> <td>+</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td><i>C. sake</i></td> <td>-</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td><i>C. tropicalis</i></td> <td>+</td> <td>+</td> </tr> </tbody> </table>		Crec. 35 °C	Asimilación almidón	<i>C. maltosa</i>	+	-	<i>C. sake</i>	-	-	<i>C. tropicalis</i>	+	+
	Crec. 35 °C	Asimilación almidón													
<i>C. maltosa</i>	+	-													
<i>C. sake</i>	-	-													
<i>C. tropicalis</i>	+	+													
<p><i>Candida famata</i> Teleomorfo: <i>Debaromyces hansenii</i> var. <i>hansenii</i> <i>Debaromyces hansenii</i> var. <i>fabryi</i></p>	<p>Células esféricas, de 2-7.2 x 2.2-8.6 µm, y simple, en pares o cortas cadenas. Se forma sedimento, anillo y en algunas cepas película suave o rugosa, seca.</p> 	<p><b>Infección</b> Diseminada Onicomycosis</p> <p><b>Flora saprófita</b> Espujo.</p> <p><b>Hábitat en la naturaleza</b> Suelo, alimentos, aire, agua.</p>	<p>Después de 7 días a 25 °C, en agar harina de maíz, no se observa pseudomicelio, aunque algunas cepas pueden presentar uno rudimentario.</p> <p><b>Formación de ascosporas:</b> en medio V8, Gorodkova, acetato, YM después de 1 a 2 semanas a 20 °C; las ascosporas contienen en su interior esporas esféricas.</p> <p><i>D. hansenii</i> var. <i>fabryi</i> crece de 31-39 °C, mientras que la variedad <i>hansenii</i> crece de 31-35 °C. Con esta prueba fisiológicamente se diferencian ambas variedades.</p>												
<p><i>Saccharomyces cerevisiae</i> Anamorfo: <i>Candida robusta</i></p>	<p>Células globosas, ovoides o elongadas, de 3.0-8.0 x 5.0-10.0 µm, aisladas o en pequeños grupos.</p> 	<p><b>Infección</b> Diseminada</p> <p><b>Flora saprófita</b> Espujo</p> <p><b>Hábitat en la naturaleza</b> Alimentos (frutas), suelo</p>	<p><b>Formación de ascosporas:</b> Las células vegetativas se transforman directamente en ascos persistentes y contienen una a cuatro ascosporas globosas. Las ascosporas pueden observarse en agar acetato, 6-10 días a 20 °C.</p>												



## INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

### A) HONGOS DIMÓRFICOS PATÓGENOS PRIMARIOS

La observación microscópica con o sin coloración de las estructuras características de *H. capsulatum*, *Coccidioides* sp., *P. brasiliensis*, *B. dermatitidis* y *Sporothrix schenckii*, o su aislamiento en cultivos a partir de especímenes clínicos es de valor diagnóstico y son considerados siempre agentes causales de enfermedad, provengan o no las muestras de regiones estériles del cuerpo.

### B) LEVADURAS ¿AGENTE CAUSAL O SAPRÓFITO O COMENSAL?

Desde el punto de vista del diagnóstico es importante establecer si la levadura aislada está causando la infección, colonizando, o actúa como contaminante. Es necesario recordar que para definir un diagnóstico es necesario que exista correlación entre el examen directo de la muestra y el aislamiento que se obtuvo en el cultivo de la misma.

*Cryptococcus neoformans* observado en preparados con tinta china o recuperado por cultivo desde el espécimen clínico siempre es significativo y se debe informar a la brevedad, sobre todo en pacientes inmunosuprimidos.

*Candida albicans* aislada de muestra de esputo e incluso de otras muestras recolectadas a través de las fauces rara vez es patógena. Lo mismo ocurre cuando se recupera de "**chorro medio de orina**".

En pacientes inmunosuprimidos la recuperación de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *Torulopsis (Candida) glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. lusitanae*, *C. rugosa*, *C. pseudotropicalis* u otras levaduras provenientes de sitios normalmente estériles o simultáneamente de varios especímenes de diferentes zonas del cuerpo es indicativo de infección diseminada con probable funguemia. El valor diagnóstico se ve reforzado si en los preparados microscópicos con o sin coloración se observan pseudohifas (pseudomicelio) de *C. albicans* y/o elementos levaduriformes brotantes.

Los hemocultivos positivos pueden indicar una candidemia transitoria o benigna debido a la colonización de catéteres, una candidiasis profunda o una candidiasis invasiva. Un hemocultivo negativo no descarta enfermedad activa. El diagnóstico se complica aún más porque los hemocultivos son positivos en solo un 25-50 % de los casos y la concomitancia de bacteriemia con fungemia disminuye la recuperación de levaduras. El hecho de ventilar los hemocultivos y especialmente el método de lisis-centrifugación aumenta la recuperación de *Candida* spp. y otras

levaduras. Este último método además tiene la ventaja de estimar el número UFC/ml de sangre, lo que podría ser de importancia según algunos investigadores.

Estudios recientes indican que pacientes neutropénicos, con un solo hemocultivo positivo para levaduras, tienen una alta tasa de complicaciones como resultado de la diseminación hematógena, especialmente candidiasis localizada en huesos, ojo y riñón, que se manifiestan entre dos semanas y varios meses después de ocurrida la candidemia. Lamentablemente nada es tan categórico en pacientes no neutropénicos, sin embargo, actualmente existen estudios que indican que pacientes con un solo hemocultivo positivo tienen una mortalidad del 38-50 % y la muerte se produce dentro de la primer semana del diagnóstico en el 46% de los casos. Por tal motivo muchos especialistas tienden a pensar que el término candidemia transitoria debería desaparecer.

Las levaduras aisladas desde líquidos articulares tomados por aspiración de artritis sépticas no deben ser consideradas como contaminantes.

Los cultivos de catéteres en pacientes febriles con cuadros clínicos complejos, son importantes para determinar si el catéter es la puerta de entrada del organismo que está infectando. Para ello algunos investigadores consideran necesario realizar cultivos cuantitativos a fin de diferenciar contaminación de colonización del catéter. Un recuento mayor o igual 1.000 UFC/ml indica que la infección está relacionada con el catéter. Este método tiene una sensibilidad del 97,5% y un 88% de especificidad. Según Walsh T. y Pizzo P. se debe realizar simultáneamente el método semicuantitativo de Maki y un cultivo del catéter en un medio líquido. Si bien para las bacterias el valor de corte establecido para el método de Maki es de 15 UFC o más, para el caso de las levaduras no hay un valor definido y se interpreta como positivo el desarrollo de colonias. Estos investigadores consideran que la cuantificación no es necesaria porque el crecimiento en el medio líquido por sí solo indicaría un resultado positivo. Esta interpretación nos parece la más adecuada porque muchos casos de candidiasis asociadas a catéter tienen recuentos <1.000 UFC.

El aislamiento de levaduras desde líquido de drenaje abdominal es difícil de interpretar, ya que no se puede determinar si el organismo está colonizando el sitio de drenaje o está infectando el abdomen, sin embargo el antecedente de cirugía previa lo hace significativo.

La recuperación de levaduras desde muestras de orina recogidas por punción suprapúbica tiene valor diagnóstico, sin embargo no siempre es posible acceder a este tipo de muestras y es necesario recurrir a otras que no tienen el mismo valor, como es el caso de la orina recogida por cateterización o el "chorro medio de



orina". La interpretación del aislamiento de levaduras desde estas muestras es difícil, algunos autores sugieren que un recuento 10.000 a 40.000 UFC/ml en el chorro medio orina o en la orina recogida a través de la sonda, sería representativo de una infección urinaria siempre y cuando tenga correlación con la clínica (tiempo de colocación de sonda, tipo de sonda, internación en terapia intensiva, etc.).

*Candida albicans* aislada de muestras de esputo e incluso de otras muestras recolectadas a través de las fauces rara vez es patógena. La alta colonización de *Candida* en orofaríngea y la bajísima frecuencia de las candidiasis pulmonares, hace que la única forma de diagnosticarla sea la demostración por histopatología y cultivo de biopsia de pulmón, lo que requiere cirugía a cielo abierto. Debido a lo cruento de este método se buscaron soluciones alternativas. A partir del año 1980 las broncoscopías se hicieron más frecuentes, y si bien los lavados bronquiales son inadecuados, se vio que los lavados broncoalveolares (BAL), que llegan dentro del segmento bronquial, garantizan una menor contaminación orofaríngea que, cuando presente, está muy diluida en el volumen final del lavado (50-100 ml). Por ello algunos autores consideran que un recuento mayor a 100.000 UFC/ml de BAL puede ser diagnóstico presuntivo de candidiasis pulmonar.

Sin embargo, el desarrollo de levaduras en muestras de esputo, secreciones bronquiales obtenidas por punción transtraqueal o fibrobroncoscopia con catéter encapuchado, o chorro medio de orina, deben tenerse en cuenta en los pacientes inmunosuprimidos, ya que si bien su crecimiento en los cultivos puede significar sólo una contaminación o una colonización, cuando se aíslan de múltiples focos indica riesgo de candidiasis diseminada. Esto es de importancia para el médico ya que, por ejemplo, en los pacientes con quemaduras extensas, el riesgo aumenta con el número de sitios infectados.

Las candidiasis profundas localizadas tales como infecciones urinarias, peritonitis, artritis, osteítis, y toda otra localización profunda que no involucra la diseminación sanguínea, deben ser diferenciadas de las formas diseminadas crónicas y agudas porque su tratamiento es diferente.

En estos casos la única evidencia diagnóstica concluyente es la demostración de las levaduras en el tejido o en los fluidos corporales de las cavidades cerradas y normalmente estériles del huésped.

En las candidiasis diseminadas el diagnóstico es aún más difícil, y de su exactitud y prontitud depende el éxito del tratamiento, en especial en el manejo de los pacientes trasplantados y con cáncer.

El diagnóstico de estas formas diseminadas es confirmado cuando se producen aislamientos

reiterados y/o simultáneos de la misma levadura desde sangre, abscesos cerrados, biopsias, orina recogida por punción, lesiones macronodulares de piel o de coriorretinitis. Sin embargo no siempre es posible acceder a tomar biopsias o punciones, ya que esto puede implicar un perjuicio para el paciente, entonces se valora el hallazgo de levaduras en muestras tales como orinas recogidas por cateterización y hasta en muchos casos el diagnóstico se basa en el hecho ya aceptado de que el aislamiento simultáneo de la misma levadura desde lesiones cutáneas profundas de dos o más sitios no contiguos del cuerpo implica una diseminación.

Desgraciadamente esto no siempre es posible de lograr, aunque la infección este presente y entonces se hace necesario utilizar todos los datos disponibles a fin de establecer el diagnóstico. Esto incluye: (1) factores predisponentes, (2) hallazgos clínicos y (3) hallazgos de laboratorio.

Los hallazgos clínicos para determinar una candidiasis en pacientes no neutropénicos y neutropénicos son los siguientes:

- Endoftalmitis candidiásica (en 28-30% de los pacientes con candidemia).
- Lesiones macronodulares de piel (10-50% de los pacientes).
- Osteomielitis.
- Candiduria en ausencia de instrumentación de la vejiga. Disfunción renal.
- Fiebre persistente que no responde a tratamiento antibiótico, taquicardia y disnea. (en pacientes neutropénicos).
- Celulitis candidiásica en el sitio de implantación del catéter intravenoso.
- Mialgia.



El valor diagnóstico del hallazgo de levaduras en el examen directo y cultivo de los especímenes clínicos

se muestra en el siguiente cuadro

Método	Materiales en donde el hallazgo es:		
	Patognomónico	Cuestionable	No patognomónico en ausencia de manifestación clínica
<b>Examen directo positivo con presencia de levaduras y pseudomicelio</b>	Lesiones de piel Mucosa oral y vaginal Líquidos de cavidades estériles Biopsias / necropsias		
<b>Cultivo con escaso, regular o abundante desarrollo</b>	Lesiones macronodulillares en piel Sangre y líquidos de punción Biopsias / necropsias Pus de abscesos cerrados. 100 UFC en el lavado bronquial 100 UFC/ml en orina por caterización	Espuito	Cavidad oral Heces

Los métodos inmunodiagnósticos son de ayuda en muchos casos si se saben interpretar correctamente y si los reactivos utilizados están estandarizados. Estos se detallan en **DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO DE LAS MICOSIS SISTÉMICAS.**

Para concluir podemos decir que:

- Las candidiasis diseminadas agudas se deben sospechar cuando hay múltiples lesiones cutáneas de localización profunda desde donde se aíslan levaduras. La recuperación de levaduras desde dos o más sitios no contiguos es indicativo de infección diseminada aun cuando los cultivos de sangre sean negativos. El aislamiento de levaduras desde muestras de sangre de un paciente con neutropenia persistente (<100 neutrófilos/ml por más de 7 días) es generalmente indicativo de infección diseminada.

- La diferenciación entre candidiasis diseminada aguda y candidemia es muy importante pero muy difícil de determinar. Muchos autores consideran que se trata de candidemia cuando hay evidencias clínicas de infección, al menos un hemocultivo positivo para levaduras y no hay evidencias de órganos involucrados luego de un cuidadoso análisis clínico y de laboratorio. La candidemia puede estar asociada al uso de catéteres venosos o a alimentación parenteral y entonces es necesario conocer el estado general del paciente y su grado de inmunosupresión para predecir la candidiasis diseminada crónica.

- Las candidiasis diseminadas crónicas deben sospecharse cuando el paciente se recuperó de una mielosupresión y continúa con fiebre persistente que no responde a antibióticos de amplio espectro, con o sin dolor abdominal y/o náuseas, y valores elevados de la función hepática (especialmente en fosfatasa alcalina). La infección se confirma con el aislamiento de levaduras de biopsias o fluidos provenientes de

sitios normalmente estériles del cuerpo. Las tomografías computadas son el mejor método para observar abscesos de hígado, bazo, riñón y pulmones.

#### C) HONGOS FILAMENTOSOS MONOMÓRFICOS DE PATOGENICIDAD DISCUTIDA

*Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Geotrichum* spp., *Mucor* spp., *Rhizopus* spp., *Trichosporon (beigelii) cutaneum*, *Petriellidium boydii*, *Fusarium* spp. y otros hongos saprófitos que no se encuentran habitualmente en especímenes clínicos deben ser aislados en forma repetida de la muestra clínica en cultivo puro y observados al examen directo del material para ser tenidos en cuenta, pero su significación clínica no es absoluta y se deben confirmar con estudios complementarios a fin de determinar si su presencia indica colonización o es la causa de la micosis.

Cuando las muestras donde se observaron provienen de zonas estériles, sólo se debe descartar una posible contaminación exógena.

Los más frecuentes son hongos del género *Aspergillus*, entre ellos, *A. fumigatus* es el más comúnmente aislado de muestras del tracto respiratorio y el responsable de la mayoría de los casos de aspergilosis. Otras especies, como *A. flavus*, *A. niger* y *A. terreus* se encuentran como agentes causales de infección en pacientes inmunocomprometidos.

Las especies de *Aspergillus* en el huésped inmunocomprometido generalmente producen una neumonía aguda casi siempre fatal; la infección invasiva puede ocurrir en estos pacientes, pero es muy rara en hospederos inmunocompetentes.

El diagnóstico se basa en la observación de hifas dicotómicamente ramificadas en ángulo de 45° en el examen directo y la recuperación reiterada del hongo



de una o de varias muestras provenientes de diferentes localizaciones.

El diagnóstico rápido de aspergilosis es difícil de hacer, sin embargo los métodos serológicos para detección de anticuerpos son eficientes, excepto en pacientes inmunocomprometidos donde la respuesta puede ser variable o estar ausente.

Las zigomicosis son menos frecuentes que las candidiasis y las aspergilosis. Pueden dar infecciones pulmonares, que rápidamente diseminan por invasión vascular en pacientes inmunodeficientes, o infecciones rinocerebrales de pronóstico muy grave. Deben ser tratadas inmediatamente por lo que es necesario informarlas ni bien se detectan ya sea por cultivo o examen directo.

Los géneros más encontrados como agentes causales de estas patologías son *Mucor* y *Rhizopus* pero otros

tales como *Absidia*, *Cunninghamella*, *Basidiobolus* y *Conidiobolus* también pueden producir infecciones fatales en pacientes inmunocomprometidos.

En estas infecciones, donde es imprescindible el diagnóstico rápido, el método más eficiente es el examen directo del material, que permite detectar hifas anchas de Zygomycetes en menos de diez minutos. Se tiñen bien con HE en los cortes histopatológicos y no con MNP, lo que ayuda a diferenciarlos de otros hongos filamentosos.

El desarrollo de los Zygomycetes en cultivos de muestras clínicas sólo es importante si el cuadro clínico del paciente es compatible, ya que las secreciones del tracto respiratorio comúnmente contienen estos hongos.



## INMUNODIAGNÓSTICO DE LAS MICOSIS SISTÉMICAS

Dentro del inmunodiagnóstico existen tres tipos de reacciones:

- Intradermorreacciones o pruebas cutáneas
- Búsqueda de anticuerpos circulantes
- Búsqueda de antígenos

Las pruebas inmunológicas sirven para apoyar el diagnóstico, establecer pronóstico y valorar la evolución de los tratamientos.

## CONTRAINMUNOELECTROFORESIS (CIE)

### I-MATERIALES NECESARIOS

#### A-Reactivos

- 1-Agarosa media Tipo II EEO Sigma A 6877
- 2-Veronal sódico (Barbital sódico) (5-5 dietil barbiturato de sodio) Sigma B 0500
- 3-Ácido clorhídrico p.a.
- 4-Polietilenglicol 6000 (Carbowax 6000)
- 5-Azida sódica
- 6-Antígeno
- 7-Sueros controles positivos y negativos
- 8-Muestra a testar

#### B-EQUIPO

- 1-Portaobjetos
- 2-Pipeta automática P20
- 3-Perforadores de metal de 1 mm y de 3 mm de diámetro
- 4-Pipetas de 5ml graduadas 1/10
- 5-Cámara de electroforesis y fuente de corriente continua
- 6-Cámara húmeda
- 7-Lente de aumento
- 8-Papel de filtro Whatman N° 1 o similar cortado en tiras del tamaño del portaobjeto.
- 9-Bomba o trampa de vacío
- 10-Heladera

### II-PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

#### A-BUFFER VERONAL PH=8,2 u=0.1

Veronal Sódico	16.00g
HCL 1N(7.56ml c.s.p. 100 ml de H <sub>2</sub> O)	22.00ml
Agua destilada c.s.p.	1000 ml

Disolver el veronal en 200 ml de agua destilada. Diluir el HCL en 100ml de agua destilada. Mezclar ambas soluciones, y llevar a 1 litro con agua destilada en matraz aforado. Agitar en campo magnético. Controlar el pH con pHmetro (ajustar con HCL 1N o NaOH 1N). Conservar a 4 °C.

#### B-AGAROSA 1% EN BUFFER VERONAL

Buffer Veronal pH=8,2	100ml
Polietilenglicol 6000	1,0g
Agarosa media electroendosmosis (EEO)	1,0g

Mezclar los componentes, calentar a baño maría hasta fusión agitando periódicamente y sin recalentar. Distribuir en tubos estériles a razón de 10ml por tubo. Almacenar a 4 °C.

### III-PREPARACIÓN DE LAS LÁMINAS

#### A-PRECUBIERTA DE AGAROSA AL 1% EN AGUA DESTILADA

Disolver 250 mg de agarosa en 25 ml de agua destilada calentando a baño maría hasta fusión completa sin recalentar. Con un pincel distribuir uniformemente la agarosa aún fundida sobre una de las caras de las láminas portaobjetos previamente lavadas y desengrasadas en alcohol-acetona. Colocar las láminas con la precubierta hacia arriba sobre una bandeja y dejar a 37°C durante 24 horas (también pueden dejarse a temperatura ambiente protegidas del polvo y la humedad).

Guardar las láminas en una caja con la superficie tratada hacia el mismo lado (a fin de evitar confusiones) y almacenar en lugar seco hasta su uso.

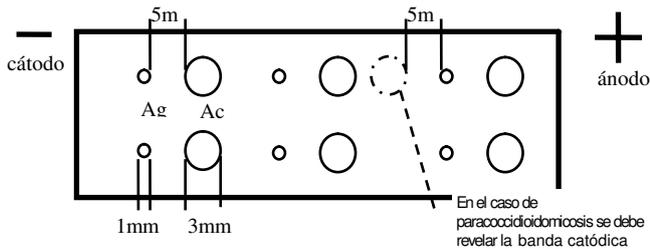
#### B-CUBIERTA DE AGAROSA 1% EN BUFFER VERONAL PH= 8,2 u=0.1

Fundir la agarosa 1% en Buffer Veronal a B.M., colocar las láminas con la precubierta hacia arriba sobre una superficie plana. Con una pipeta de 5ml tomar 3ml de agarosa y distribuir 2,8ml sobre la lámina comenzando del centro hacia los bordes y cubriendo toda la superficie, esperar que gelifique. Colocar en cámara húmeda y almacenar en heladera por lo menos 2 h. Las láminas pueden almacenarse a 4 °C en cámara húmeda hasta 48 h.



#### IV-EJECUCIÓN DE LA PRUEBA

- 1-Sacar las láminas de la heladera.
- 2-Adicionar a razón de 170ml de buffer Veronal a cada lado de la cuba.
- 3-Hacer los orificios en el gel de agarosa, según el esquema, con los perforadores metálicos conectados a una trampa de vacío.



- 4-Anotar la posición de los sueros y de los antígenos en la lámina.
  - 5-Colocar los antígenos y los sueros en los hoyos con los tubos capilares.
  - 6-Colocar las láminas en la cuba de electroforesis con los orificios del suero hacia el ánodo (+). Hacer los puentes salinos con tiras de papel de filtro (las tiras deben ser previamente embebidas en buffer).
- NOTA: CUIDAR QUE LA FUENTE DE PODER ESTE APAGADA CUANDO SE HACEN LOS PUENTES SALINOS.**
- 7-Tapar la cámara, encender la fuente de poder y ajustar a 6 mA por lámina ó 100 V total y correr durante 90 minutos.
  - 8-Desconectar la fuente de poder y retirar las láminas de la cámara de electroforesis.
  - 9-Examinar las láminas con luz transmitida. Anotar los resultados preliminares de las bandas anódicas de precipitación formadas entre el hoyo del suero y del antígeno.
  - 10-Si se realiza serología para *P. brasiliensis* es necesario revelar las bandas catódicas, ya que éstas son las más importantes desde el punto de vista diagnóstico. Para ello se procede de la siguiente manera: con un sacabocado de 3mm hacer un hoyo en la zona catódica a 5 mm del hoyo del antígeno llenando con el suero correspondiente y dejarlo difundir en cámara húmeda 72 h a 25 - 28 °C. Continuar como se indica en 11.
  - 11-Si no es necesario observar bandas catódicas las láminas se cubren con solución de citrato de sodio al 5% en solución fisiológica (SF) durante 90 minutos para disolver las bandas inespecíficas. Se leen y anotan los resultados.

12-En caso de no observarse líneas de precipitación es conveniente recurrir a la coloración de Azul de Coomassie previo lavado y deshidratación del gel.

#### V-LAVADO Y COLORACIÓN DE LAS LÁMINAS

##### 1-SOLUCIÓN COLORANTE DE COOMASSIE BLUE R-250

Coomassie blue R-250	0,30 g
Solución decolorante	100 ml

##### 2-SOLUCIÓN DECOLORANTE

Metanol	500 ml
Acido acético	200 ml
Agua destilada csp	1000 ml

##### 3-TÉCNICA

- A- Lavar las láminas con Solución Fisiológica pH=7.2 durante 36 horas, cambiando por lo menos 5 veces la solución.
- B- Sumergir las láminas en agua destilada durante 10 minutos, cubrirlas con papel de filtro humedecido en agua destilada de manera que los hoyos queden cubiertos de agua destilada.
- C- Secar en estufa de 37°-50 °C durante una noche.
- D- Humedecer el papel de filtro en agua destilada y retirarlo cuidadosamente.
- E- Sumergir en solución colorante durante 5 min.
- F- Lavar con agua destilada.
- G- Sumergir en solución decolorante hasta buena resolución (las bandas deben aparecer en azul)

#### PRUEBA DE INMUNODIFUSIÓN DOBLE (ID)

SE UTILIZA PARA REACCIÓN DE IDENTIDAD FRENTE A SUEROS CONTROLES DE REFERENCIA DE *HISTOPLASMA CAPSULATUM*, *COCCIDIOIDES SP.*, *PARACOCIDIOIDES BRASILIENSIS*, *CANDIDA ALBICANS*, *ASPERGILLUS FUMIGATUS*, *A. NIGER* Y *A. FLAVUS*.

##### I-MATERIALES NECESARIOS

###### A-REACTIVOS

- 1-Agar purificado (DIFCO)
- 2-Cloruro de sodio (ClNa)
- 3-Citrato de sodio ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )
- 4-Fenol acuoso (90% W/W)
- 5-Glicina
- 6-Suero del paciente y suero control de referencia.
- 7-Antígenos estandarizados
- 8-Agua destilada.



## B-EQUIPO

- 1-Portaobjeto de 25 x 76 mm o placa de petri de 15 x 100 mm de plástico o de 50 x 12 mm según conveniencia.
- 2-Cortador de gel de agar con esquema de siete hoyos o perforador metálico de 4 mm de diámetro.
- 3-Pipetas de 10ml y 5 ml.
- 4-Pipeta automática P20
- 5-Lupa
- 6-Cámara húmeda
- 7-Heladera.

## II-PREPARACIÓN DE REACTIVOS

### A-Agar fenolizado 1% pH= 6,3-6,4

Cloruro de sodio	0,9 g
Citrato de sodio	0,5 g
Fenol 3%	0,25 ml
Glicina	7,5 g
Agar purificado	1,0 g
Agua destilada (AD) csp	100 ml

- 1-Colocar 50 ml de AD en un Erlenmeyer con tapa.
- 2-Agregar 0,9 g de ClNa y 0,5 g de citrato de sodio. Disolver completamente ambas sales.
- 3-Agregar 0,25 ml de fenol y 7,5 g de glicina. Mezclar bien.
- 4-Agregar 1,0 g de agar purificado (DIFCO) y llevar a 100ml con AD.
- 5-Calentar a BM hasta que se funda el agar. NO SOBRECALENTAR. NO AUTOCLAVAR. El pH final del agar-fenolizado debe ser 6,3-6,4.
- 6-Fraccionar en tubos de tapa a rosca (cierre hermético, limpios y estériles), a razón de 10 ml por tubo. Almacenar a 4 °C.

## III-PREPARACIÓN DE LAS LÁMINAS O PLACAS PARA LA ID (MACROMÉTODO)

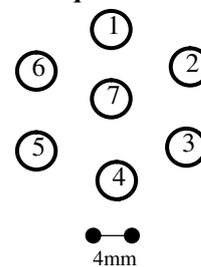
- 1-Fundir el agar fenolizado a BM sin recalentar, dejar enfriar a 60°C-65°C.
- 2-Colocar con una pipeta el agar fundido sobre la placa de petri o el portaobjetos (según la conveniencia del laboratorio) en las siguientes cantidades:
  - Portaobjetos de 76 x 25 mm = 2,8 ml de agar.
  - Placas de plástico de 50 x 12 mm = 3,0 ml de agar.
  - Placas de plástico de 100 x 15 mm = 10 ml de agar.NOTA: Estas cantidades fueron calculadas para que el espesor de la capa de agar oscile entre 1,2 a 1,6 mm. Si el gel es demasiado delgado las líneas son tenues y confusas y si es muy grueso (2 mm o más) el número de bandas inespecíficas o dudosas aumenta porque no se puede lavar bien.
- Las placas deben apoyarse sobre una superficie plana para que el espesor sea uniforme.
- 3-Dejar solidificar sin mover la lámina o placa y colocar a 4 °C por lo menos una hora antes de hacer

los hoyos o si es posible prepararlas el día anterior. Estas placas se pueden conservar hasta 48 h en la heladera 4 °C en cámara húmeda.

## IV-EJECUCIÓN DE LA PRUEBA.

- 1-Sacar las placas o láminas de la heladera.
- 2-Cortar el gel con la matriz de 7 hoyos o con los perforadores de metal de 4 mm de diámetro según esquema I.
- 3-Retirar los siete cilindros de gel con una aguja o una pipeta Pasteur conectada a una trampa de vacío. No dañar las paredes porque provoca una difusión desigual y las bandas adquieren formas caprichosas y difíciles de interpretar.

Esquema 1



- 4-Enumerar los hoyos con marcador indeleble de 1 - 6 sobre la cara externa superior de la placa, como indica el esquema.
- 5-Con los tubos capilares (o pipeta Pasteur) llenar los hoyos 1 y 4 con suero control positivo de referencia, NO SOBRELLENAR los hoyos. Los antígenos y sueros no deben emerger de la cima del hoyo, si se desea se puede pipetear un volumen fijo preestablecido.
- 6-Llenar los hoyos 2, 3, 5 y 6 con los sueros que requieran identidad.
- 7-Revisar que no queden burbujas de aire, si las hay deben eliminarse con un palillo de madera cuidando de usar uno diferente para cada suero.
- 8-Con un capilar o una pipeta Pasteur colocar el antígeno específico en el hoyo central.
- 9-Colocar la placa en cámara húmeda a temperatura ambiente, siempre que no exceda los 25 °C o bien colocar en estufa a dicha temperatura.
- 10-Leer diariamente durante tres días quitando la tapa de las placas de petri para poder visualizar las bandas de precipitación antígeno-anticuerpo.
- 11-Luego de transcurridas 72 horas a 25 °C se destapa la placa y se cubre el gel con citrato de sodio al 5 % en SF durante 90 min para disolver bandas inespecíficas. Leer y anotar los resultados definitivos entre los sueros del paciente y los de referencia como:

### Reacción de identidad / Reacción de no identidad / Identidad parcial

- 12-En caso de no observar líneas de precipitación se colorea el gel con Azul de Coomassie R-250 al 0,3 % previo lavado y deshidratación del mismo. (Como se

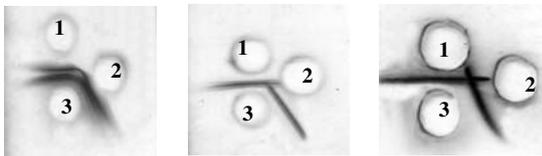


describe en CIE). Si se desea conservar la lámina debe realizarse en portaobjetos.

### V-INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Las reacciones de precipitación en gel de agar pueden ser de tres tipos: **IDENTIDAD, IDENTIDAD PARCIAL Y NO IDENTIDAD.**

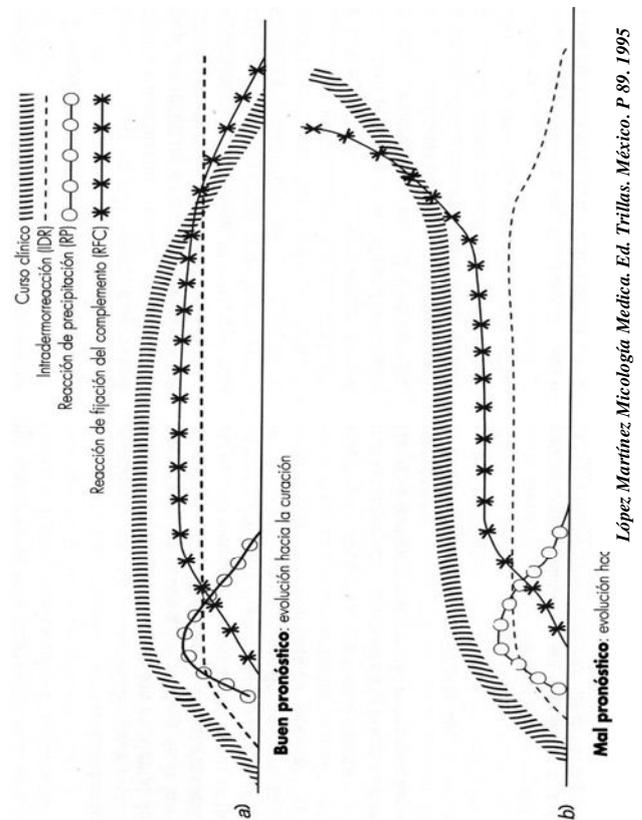
Las líneas de precipitación específica (antígeno-suero control), se utilizan como patrones de referencia en cada prueba. La aparición de una o más bandas de identidad por la interacción del suero del paciente con el antígeno constituye una **REACCIÓN POSITIVA.**



Pocillo 1: suero control positivo, Pocillo 2: suero de pacientes, Pocillo 3: antígeno.

Los sueros que dan bandas de precipitación, pero no dan identidad con el suero control (línea específica de referencia) deben considerarse sospechosos y requieren nuevos estudios.

La prueba de ID es positiva durante todo el proceso patológico y de una de las pruebas más recomendables para el diagnóstico en caso de **NO** poder realizar cultivo. La limitante es que los pacientes deben ser inmunocompetentes. El siguiente esquema resume como pueden variar los títulos de anticuerpos y las pruebas intradérmicas durante el curso de la histoplasmosis y la coccidioidomicosis.

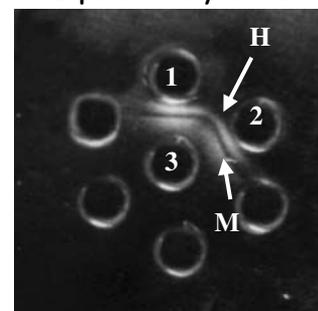


López Martínez. Micología Médica. Ed. Trillas. México. P 89. 1995

La negativización de la prueba intradérmica, conjuntamente con el aumento de los niveles de anticuerpos indica un **pronóstico grave** para el paciente. Por su parte pruebas intradérmicas positivas con disminución de los títulos de anticuerpos durante el curso de una micosis producida por agentes dimórficos indican **buen pronóstico.**

#### a) HISTOPLASMOSIS (*Histoplasma capsulatum*)

##### ID para *H. capsulatum*



Pocillo 1: suero control positivo, Pocillo 2: suero de paciente, Pocillo 3: antígeno

Se consideran pacientes con histoplasmosis activa los que dan reacciones de identidad para las bandas M y H



con los sueros controles positivos. La banda M se encuentra cerca del hoyo del antígeno y la banda H cerca del hoyo del suero. Esta última es menos frecuente y rara vez se presenta sola. Ambas bandas tienen valor semiológico. La banda H se encuentra con mayor frecuencia en pacientes con histoplasmosis activa y progresiva, pero puede ser detectada uno o más años después de la aparente recuperación clínica del paciente. Rara vez se la encuentra en el suero de pacientes normales luego de una prueba cutánea reciente con histoplasmina.

La banda M puede ser indicio de una histoplasmosis aguda o crónica, de una infección pasada o de una prueba cutánea reciente.

Puede aparecer en individuos luego de una prueba cutánea con histoplasmina.

Si sólo aparece la banda M y no se realizó una prueba cutánea reciente se interpreta como indicativo de una infección precoz, ya que este anticuerpo aparece antes que la precipitina H y desaparece más lentamente.

La aparición de la banda H indica una histoplasmosis activa o muy recientemente curada, rara vez se encuentra en ausencia de la banda M y en general no es influenciada por la intradermoreacción con histoplasmina.

Aproximadamente el 70% de los pacientes con histoplasmosis comprobada tienen la banda M y sólo el 10% las bandas M y H.

Si se ven bandas de no identidad con el suero control, éstas se deben a reacciones inespecíficas.

Si no hay bandas M y/o H el resultado es negativo.

Las pruebas pueden aplicarse a muestras tales como: suero, plasma, líquido peritoneal o LCR de pacientes con enfermedad respiratoria, hepatoesplenomegalia, signos de infección sistémica extrapulmonar o con compromiso meníngeo, en pacientes que vivieron o trabajaron en zonas endémicas de *H. capsulatum*. En las formas meníngeas la detección de precipitinas en LCR es más rápido que la detección de *H. capsulatum* por cultivos y aún cuando los intentos de cultivo son negativos.

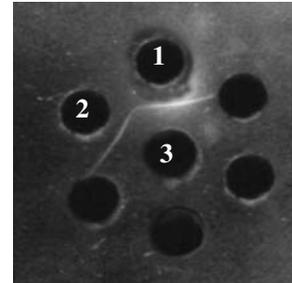
#### b) PARACOCCIDIOIDOMICOSIS (*Paracoccidioides brasiliensis*)

Los sueros de pacientes con paracoccidioidomycosis pueden dar de una a tres bandas de precipitación frente al antígeno específico. En la ID, la banda 1 se ubica cerca del hoyo del antígeno y la banda 3 cerca del hoyo del suero.

La banda 1 es el anticuerpo precipitante que se encuentra en el 95% al 98% de los casos y que se

corresponde con la banda E de movilidad electroforética catiónica que se detecta por CIE en todos los sueros de pacientes que poseen esta enfermedad.

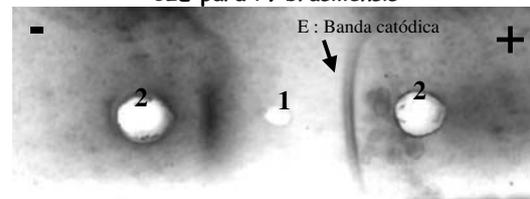
#### ID para *P. brasiliensis*



Pocillo 1: suero control positivo, Pocillo 2: suero de paciente, Pocillo 3: antígeno

Los sueros de pacientes que dan una a tres líneas de identidad con el suero control son considerados positivos. Un mayor número de bandas de precipitación se encuentra en sueros de pacientes con compromiso pulmonar o enfermedad diseminada. Los anticuerpos precipitantes tienen larga persistencia, aunque algunos de ellos pueden desaparecer luego de un tratamiento exitoso disminuyendo el número de bandas detectadas por ID y CIE. Los sueros que no dan bandas de identidad con el suero control por ID, no se consideran positivos, pero se los somete a otros estudios como sueros sospechosos.

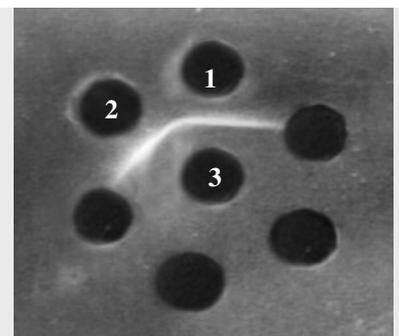
#### CIE para *P. brasiliensis*



Pocillo 1: antígeno, Pocillo 2: suero paciente

#### c) COCCIDIOIDOMICOSIS. (*Coccidioides* sp.)

##### ID para *Coccidioides*



Pocillo 1: suero control positivo, Pocillo 2: suero de paciente, Pocillo 3: antígeno



Se considera reacción positiva cuando el suero del paciente da identidad para la banda F con los sueros controles positivos. Esta banda se forma cuando el suero del paciente con coccidioidomicosis se enfrenta al antígeno específico.

La banda F indica una infección por *Coccidioides* sp. pero esto no significa una forma activa de la enfermedad, ya que algunas personas continúan produciendo anticuerpos detectables por ID aún después de estar clínicamente recuperados.

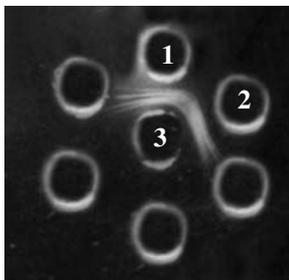
Las pruebas deben realizarse siempre que los pacientes presenten sintomatología pulmonar o meníngea y hayan vivido o trabajado en área endémica para este hongo.

Los anticuerpos específicos pueden detectarse tanto por ID como por CIE, 1 a 3 semanas después de la primoinfección. Tienen valor diagnóstico; raramente se detectan 6 meses después de la infección, pero reaparecen si esta se reactiva. Es raro que aparezcan en LCR de pacientes con meningitis coccidioidal.

Las pruebas cutáneas con coccidioidina no provocan respuesta humoral específica. La ID detecta en general coccidioidomicosis incipiente o precoz.

#### d) ASPERGILOSIS

##### ID para *A. fumigatus*



Pocillo 1: suero control positivo, Pocillo 2: suero de paciente, Pocillo 3: antígeno

Sólo se consideran positivos los sueros que dan una o más líneas de identidad con el suero control, (siendo la especificidad de la ID de 100% si se usan sueros controles). Cuando no existen reacciones de identidad, pero sí bandas de precipitación, éstas son consideradas sospechosas y se continúa investigando. Una de las causas de reacciones no específicas que dan no identidad por ID, es la presencia de Proteína C reactiva (PCR) en el suero de los pacientes. La PCR aparece en enfermedades inflamatorias, es capaz de reaccionar con un glucopéptido que suele estar presente en algunos antígenos aspergilaes y se denomina sustancia C, que se disuelve en citrato de sodio al 5%.

Esta banda inespecífica desaparece cuando se lavan las placas de ID y CIE en citrato de sodio al 5 % en SF durante 90 minutos.

Las bandas que persisten luego de los lavados y no dan reacción de identidad con el suero control, justifican nuevos estudios ya que ocasionalmente se encuentran bandas de no identidad asociadas a Aspergilosis.

La presencia de una o más bandas de precipitación puede indicar aspergiloma (bola fúngica), aspergilosis broncopulmonar alérgica o aspergilosis invasiva. La presencia de una o dos bandas puede indicar cualquier forma clínica de la enfermedad sin embargo, la presencia de tres a cuatro bandas está invariablemente asociada con bola fúngica o Aspergilosis invasiva.

Los sueros de pacientes con aspergiloma y los de aspergilosis alérgica no requieren ser concentrados para dar bandas de precipitación sin embargo, algunos sueros de pacientes con aspergilosis invasiva requieren ser concentrados 4 veces para dar reacción de precipitación. Por ello cuando se sospecha esta forma clínica, en particular en pacientes inmunocomprometidos, se debe probar con el suero concentrado 4 veces antes de darlo como negativo.

Los sueros de pacientes con enfermedad broncopulmonar alérgica, aspergiloma pulmonar (bola fúngica), pacientes inmunocompetentes con infecciones pulmonares o meníngeas de origen desconocido, los que reciben terapia inmunosupresora con fiebre inexplicable o tienen una enfermedad de curso insólito; deben probarse frente a los antígenos específicos de *A. fumigatus*, *A. niger* y *A. flavus* por ID.

La aspergilosis broncopulmonar alérgica debe considerarse en pacientes con asma, infiltrados pulmonares transitorios y eosinofilia periférica. Esta enfermedad presenta un estado de hipersensibilidad caracterizado por reacciones cutáneas en el sitio de inyección de aspergilina y por la formación de precipitinas.

El aspergiloma pulmonar o bola fúngica se forma cuando *A. fumigatus* u otra especie de este género coloniza cavidades abiertas curadas de tuberculosis, sarcoidosis o carcinomas. La aspergilosis invasiva incluye aquellos casos en los que se demostró al hongo penetrando al tejido del huésped.

Las reacciones de ID son positivas en el 90% de los casos de aspergilomas y en el 70% de los casos de aspergilosis broncopulmonar alérgica.

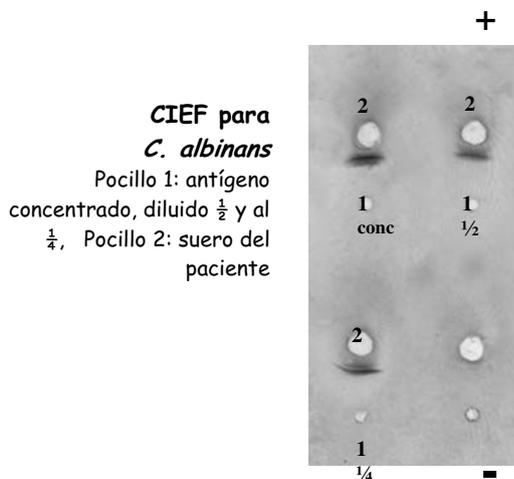
#### e) Candidiasis

Aunque el serodiagnóstico de candidiasis sistémica es muy cuestionado, se puede decir que ID, CIE y la



aglutinación en látex (LA) son valiosos para su diagnóstico; no así la aglutinación y la FC porque sueros normales dan reacciones positivas al igual que las candidiasis superficiales, sin compromiso sistémico.

Las pruebas ID y CIE se deben aplicar a pacientes con candidemias persistentes, neumonitis, endocarditis, abscesos por heridas intra-abdominales, pacientes con catéteres urinarios o intravenosos, pacientes debilitados, los que reciben tratamiento inmunosupresor antibiótico o anticanceroso prolongado, que presentan fiebre inexplicable o cuya enfermedad siga un curso no habitual.



Las pruebas serológicas se usan para determinar la significación clínica de los aislamientos de *C. albicans* y otras especies del género a partir de muestras no estériles. La detección de anticuerpos precipitantes se considera presuntiva candidiasis sistémica, pero también puede indicar candidemia transitoria o colonización.

La prueba de ID y CIE posee una sensibilidad de 90% para casos comprobados de candidiasis sistémica, son específicas para todo el género (incluso *C. glabrata*).

Cuando se sospecha candidiasis y las reacciones de ID son negativas con el antígeno de *C. albicans* la prueba debe repetirse con el antígeno de *C. krusei* ya que se debe descartar infección por esta especie.

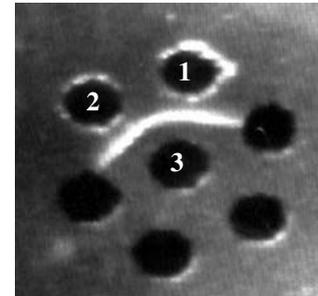
La decisión de tratar al paciente no debe basarse únicamente en los datos serológicos, sino en las consideraciones de todos los datos clínicos y de laboratorio disponibles.

En las pruebas de CIE se debe probar el suero del paciente frente a diluciones del antígeno al 1/2 y al 1/4 para determinar la concentración óptima de éste.

Un aumento cuádruple del título o uno mayor de 1/8 se consideran sugerentes de candidiasis invasiva. El

antígeno de *Candida* puede da 3 bandas frente al suero control. Los sueros de pacientes que forman de una a tres bandas de identidad con el suero control se consideran positivos.

#### ID para *C. albicans*



Pocillo 1: suero control positivo, Pocillo 2: suero de paciente, Pocillo 3: antígeno

Debe sospecharse candidiasis sistémica cuando el estudio de muestras seriadas de suero muestre conversión de la reacción de negativa a positiva o aumento del número de líneas de precipitación.

Descensos del número de bandas o disminución en el título puede indicar éxito de la terapia antifúngica o eliminación de la colonización por remoción de catéteres, sondas o válvulas contaminadas.

#### OBSERVACIONES

La presencia de bandas inespecíficas en las reacciones de precipitación en gel de agar pueden deberse a:

- 1- Cuando se llenan los orificios se derrama parte del espécimen fuera del agujero y sobre el agar. En este caso se observa una línea fina que rodea completamente al hoyo o formando un arco en la zona de reacción de antígeno-anticuerpo provocando confusión.
- 2- Repetir el llenado de los hoyos con suero del paciente para aumentar la sensibilidad, provoca artefactos o múltiples bandas de precipitación. Hay que concentrar el suero antes de colocarlo en la celda si se requiere mayor sensibilidad.
- 3- Las lipoproteínas del suero pueden provocar una zona densa que rodea al hoyo del suero, pero ocasionalmente esas áreas pueden quedar situadas sólo en zonas de reacción antígeno-anticuerpo y parecer una banda específica.
- 4- Cuando los sueros están contaminados, en general precipitan dando un área borrosa que rodea a la celda.
- 5- La deshidratación del agar antes o durante la ejecución de la prueba impide la difusión variando los resultados.
- 6- La temperatura no debe ser menor de 15 °C para evitar precipitaciones inespecíficas; ni tampoco muy alta para que no se deshidrate el agar.
- 7- El exceso de antígeno o de anticuerpo provoca ausencia completa de líneas de precipitación por el llamado "fenómeno de zona" (re-disolución de las bandas por exceso de antígeno o anticuerpo).



## BÚSQUEDA DE ANTÍGENOS CIRCULANTES

La detección de antígenos circulantes de *Candida*, ya sean mananos de pared celular (52,6% de sensibilidad diagnóstica), citoplasmáticos como la enolasa (75% de sensibilidad diagnóstica) o de producción extracelular como la aspartil-proteinasa (en fase experimental), mediante métodos tales como látex, ELISA Sandwich, RIA o immunoblotting, han creado muchas expectativas respecto a sus posibilidades diagnósticas; sin embargo en muchos casos no hay equipos comerciales disponibles o están todavía en evaluación.

El método más usado es el látex. Son anticuerpos monoclonales antimanano unidos a partículas de látex. Este antígeno es un homopolímero de la D-manosa que contiene 3-5% de proteína covalentemente unida (uniones  $\alpha$  o  $\beta$  que permiten diferenciar los serotipos A y B de *C. albicans*) y contiene cuatro epitopes, dos serotipo-específicos para A y B y dos comunes. En el suero se encuentra formando inmunocomplejos cuando el paciente tiene respuesta humoral (por esto se lo separa por hidrólisis y calor), su concentración es baja (menor o igual a 100 ng/ml) y desaparece rápidamente por secuestro hepatoesplénico y eliminación urinaria.

El reactivo del látex detecta hasta 2,5 ng/ml. La sensibilidad diagnóstica del test aumenta con el número de muestras, cuando el estudio se realiza sobre 1 o 2 muestras la sensibilidad es de 52,6%. Puede adelantar el diagnóstico 48 horas respecto del hemocultivo.

Sin embargo este antígeno es muy sensible frente a anticuerpos específicos, por lo que los pacientes con capacidad para formar anticuerpos **limpian** de manano la sangre con eficacia. Esto limita su utilización a pacientes inmunológicamente no respondedores.

Este método no sustituye a ningún otro método diagnóstico y su valor continúa siendo muy controvertido.

El látex para detección de antígenos galactomananos circulantes de *Aspergillus*, se puede realizar por dos técnicas, la aglutinación en partículas de látex (Pastorex *Aspergillus* Sanofi Pasteur, Marnes-la Coquette, France) con el límite de detección de 15 ng /ml, con una sensibilidad de 28-100% y una especificidad de 16-100%, y el doble sandwich ELISA (Pastorex PLATELIA *Aspergillus* Sanofi Diagnostics Pasteur), con un límite de detección de 1 ng /ml y una sensibilidad de 83-100% y una especificidad de 71-89%.

Esta variabilidad en los valores de sensibilidad y especificidad es dependiente de la población examinada, de las condiciones en que se realiza la prueba y el régimen de inmunosupresión que tiene el paciente.

Ambas técnicas quedan limitadas a ser utilizadas en fases agudas de la infección o en pacientes inmunosuprimidos ya que la presencia de anticuerpos produce un clearance de antígenos de sangre. Al igual que para *Candida* el número de muestras aumenta la sensibilidad, sin embargo un resultado negativo no descarta infección.

Actualmente se están desarrollando técnicas de ELISA por inhibición competitiva con resultados promisorios.

Estas pruebas sólo se deben realizar en centros de referencia y en hospitales donde el tipo y número de pacientes internados graves (hospitales oncológicos, de niños o de infecciosas), justifican la compra del equipo, de alto costo, corto vencimiento, respecto al número de determinaciones probables.

Actualmente se están evaluando otras técnicas, además de las inmunoenzimáticas; estas están basadas en métodos moleculares (PCR) para detectar antígenos en las aspergilosis invasivas, candidosis sistémicas, neumocistosis y otras micosis del hospedador inmunocomprometido, algunas de ellas con resultados promisorios. La mayoría de estas técnicas poseen una alta sensibilidad pero la especificidad es baja.

Los reactivos de látex para detección de antígenos de *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* y *Aspergillus* ssp. se usan de acuerdo a las especificaciones del equipo comercial.

A continuación detallamos la búsqueda de antígenos del complejo *C. neoformans*.

## DETECCIÓN DE ANTÍGENOS DE *Cryptococcus neoformans*

La técnica de aglutinación en partículas de látex permite una detección semicuantitativa del antígeno polisacárido capsular del complejo *C. neoformans* presente en el LCR y/o suero de pacientes con criptococosis meníngea, suero de pacientes con criptococosis pulmonar y o lesiones con diferentes localizaciones producidas por este agente.

### FUNDAMENTO

Consiste en la precipitación de partículas de látex sensibilizadas con anticuerpos anti-polisacárido capsular del complejo *C. neoformans*, estos reconocen el antígeno circulante en muestras de suero y LCR.

Esta prueba posee una sensibilidad del 99% para LCR de pacientes con criptococosis meníngea. El límite de detección de antígeno es de 3,2 ng/ml a 12,5 ng/ml dependiendo del serotipo. Una reacción negativa no descarta la infección.

La prueba tiene valor diagnóstico y pronóstico, un aumento progresivo de los títulos es de mal pronóstico.



Cuando la terapia es inadecuada se observa aumento o mantenimiento de los títulos sobre muestras consecutivas.

Para evitar falsos negativos, los sueros se tratan con pronasa (DE) previa a la prueba, esta enzima cuya función es separar los complejos inmunes circulantes y destruir el factor reumatoideo, elimina los falsos positivos y aumentar la sensibilidad de la prueba.

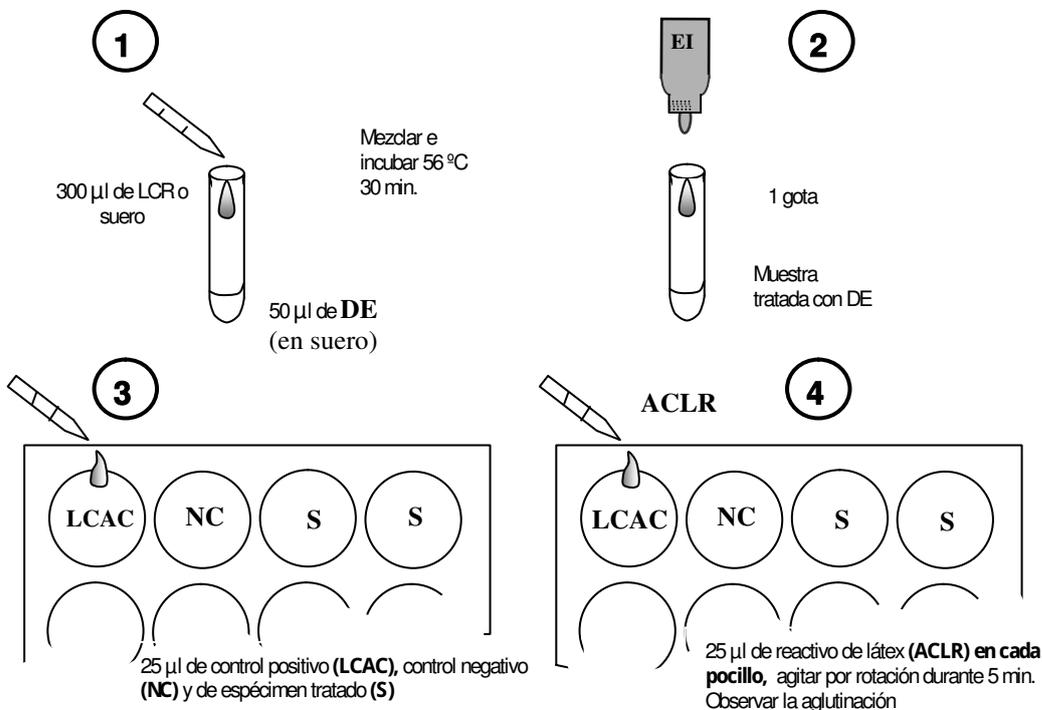
El equipo provee los siguientes reactivos:

1. Látex anti-criptococo (ACLR) **NUNCA FRIZAR**
2. Control positivo (LCAC): antígeno capsular de *C. neoformans* 15 ng/ml.

3. Control negativo (NC): suero de cabra negativo
4. Pronasa: (enzima lítica) (DE) **UNA VEZ RECONSTITUIDA DEBE SER FRIZADA A  $-20^{\circ}\text{C}$  EN ALICUOTAS DE 50  $\mu\text{L}$ . NO USAR TUBOS SILICONADOS PARA GUARDAR LA ENZIMA.**
5. Control anti-globulina (AGC): globulina anti-conejo hecho en cabra y simulante de factor reumatoideo.
6. Buffer glicina con albúmina (GBDA) para titulación. Se usa diluido 1:10 con agua destilada.
7. Inhibidor enzimático (EI) específico de pronasa.

### EJECUCIÓN DE LA PRUEBA

La prueba posee cuatro etapas que se esquematizan a continuación.



### CONTROLES:

**Control de DE:** (mensual) se utiliza AGC como si fuera una muestra, tomar 2 alícuotas de 300  $\mu\text{L}$  de este control, uno con DE y otro sin la enzima. Luego procesar como si fuese un espécimen clínico. El **AGC no tratado** debe ser **positivo ++ o más** y el **AGC tratado** debe dar una aglutinación **+ o negativa**. En caso de que la reacción del AGC tratado no del resultado esperado la enzima debe ser descartada y se debe reemplazar por una nueva partida.

Juntamente con esta prueba se debe realizar el control positivo, **LCAC**, que debe dar una aglutinación de **++ o mayor** con el ACLR y un

control negativo **NC** debe dar una aglutinación **menor de +** con el ACLR

### TITULACIÓN:

Cuando la prueba es positiva **+ o más**, se deben realizar titulaciones para el seguimiento de tratamientos.

Respecto a resultados falsos negativo por efecto de prozona solo hay descrito un caso en la literatura donde el espécimen fue positivo a diluciones mayores de 1:100

Las diluciones del espécimen se realizan con el GDBA previamente diluido 1:10 con agua destilada o desionizada.

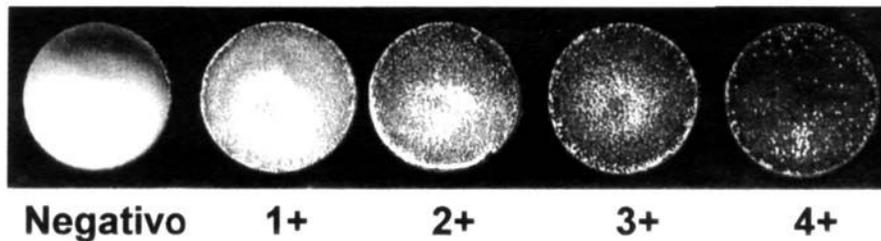


Las diluciones recomendadas son si un positivo ++ se recomienda comenzar al 1:2; si el positivo es +++ o ++++ se sugiere comenzar en 1:100 y realizar diluciones en factor 2 o en factor 10. Posteriormente para muestras seriadas del mismo paciente se debe utilizar el mismo esquema de

dilución. El seguimiento se debe realizar hasta negativización de la aglutinación.

Cuando se realizan titulaciones para seguimiento de tratamientos es conveniente realizarlas con el mismo equipo para evitar variaciones.

#### LECTURA DE RESULTADOS



La lectura es visual y se debe realizar de la siguiente manera:

- Negativo :** suspensión granular muy fina con ausencia de aglutinación.  
**Positivo + :** suspensión con escasos grumos contra un fondo homogéneo lechoso.  
**Positivo ++ :** suspensión con escasos a moderados grumos contra un fondo moderadamente homogéneo.  
**Positivo +++ :** suspensión con moderados a abundantes grumos contra un fondo claro.  
**Positivo ++++ :** suspensión con abundantes grumos contra un fondo totalmente claro.

#### OBSERVACIONES

1. Pueden dar falsos positivos LCR, sobre los que previamente se realizan estudios microbiológicos, contaminados accidentalmente con agar de los medios de cultivo a través del ansa de cultivo introducida en el tubo con el espécimen.
2. Especímenes contaminados con talco de los guantes pueden dar un resultado falso positivo.
3. Infecciones por *Trichosporum cutaneum* en pacientes inmunocomprometidos pueden dar resultados falsos positivos.
4. El uso de tubos y tapones siliconados (ej: Vacutainers® Becton-Dickinson) para almacenar el espécimen pueden dar aglutinación positiva.



## PRUEBAS DE SENSIBILIDAD A LOS ANTIFÚNGICOS

Es evidente que el nacimiento de las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos está unido al descubrimiento de los mismos.

Hasta no hace mucho tiempo las pruebas de susceptibilidad *in vitro* para los agentes antifúngicos prácticamente no se usaban porque no estaban estandarizadas y existía una pobre correlación con la respuesta clínica del paciente. Esta escasa correlación podía deberse a la falta de estandarización o a las fallas propias de los tratamientos con antimicrobianos debidas al estado del hospedador, la escasa penetración de la droga en las cavidades cerradas, la inaccesibilidad del foco de infección y la formación de bolas fúngicas sobre prótesis valvulares que impiden el contacto droga-hongo, como el caso de endocarditis por *Candida* y *Aspergillus*.

Se sabe que la frecuencia de infecciones fúngicas oportunistas fue aumentando a causa de factores tales como el uso de drogas citotóxicas inmunosupresoras, la aparición del virus VIH y el amplio uso de nuevos y cada vez más efectivos antibióticos. En respuesta a esta situación, se inició el desarrollo de nuevos agentes antifúngicos menos tóxicos y sistémicamente activos que aumentan las posibilidades terapéuticas permitiendo al médico clínico optar entre ellas. No obstante, la aparición de cepas resistentes a una o más drogas azólicas hizo cada vez más difícil instaurar la terapia adecuada. Por todas estas razones, en 1986 se creó el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) y el Subcommittee en pruebas de sensibilidad a antifúngicos y se comenzó a estandarizar un método, mediante el desarrollo de estudios colaborativos. Finalmente, en diciembre de 1992, se publicó un macrométodo de referencia en medio líquido para pruebas de sensibilidad en levaduras. A partir de ese momento, al menos para este grupo de hongos, los laboratorios de referencia en micología comenzaron a realizar estas pruebas de sensibilidad con el fin de conocer el perfil de resistencia de las cepas autóctonas en las diferentes patologías y grupos etarios, como así también estudiar aislamientos que no responden a la terapéutica convencional con el objetivo de seleccionar un tratamiento efectivo.

En la actualidad, muchos países tienen sus propios comités de estandarización. Uno de los más activos es el norteamericano que se conoce con el nombre de Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) antes llamado "National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)". En Europa, cada país tiene el suyo propio. El comité europeo equivalente al CLSI se denomina "European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)". Existen a la fecha los documentos del CLSI M27-A2 y

M44-A, para dilución en caldo y difusión en agar para levaduras respectivamente, y el EUCAST Discussion Document E. Dis 7.1 para levaduras fermentadoras.

La disponibilidad de drogas antifúngicas de uso clínico es escasa debido a su gran toxicidad para los animales (incluido el hombre) ya que atacan las células eucariotas.

Actualmente existen pocas drogas aceptadas para uso humano que hayan demostrado ser efectivas para el tratamiento de las infecciones fúngicas, entre las que encontramos la **griseofulvina**, utilizada para tratar dermatofitosis; la **nistatina**, para infecciones cutáneas y mucocutáneas causadas por levaduras y, la más tóxica, **anfotericina B**, de elección para todas las infecciones sistémicas. Con respecto a la 5-fluorocitosina, su uso está indicado principalmente, para el tratamiento inicial de la criptococosis meníngea en combinación con otros antifúngicos.

Otras drogas antifúngicas son efectivas sólo para algunas micosis, es el caso p. ej. de **miconazol**, **ketoconazol**, **pimaricina**, **candidina** y **tolnaftato** que parecen tener efectividad en el tratamiento de micosis cutáneas, e **hidroxistalbinida** para blastomycosis. El **yoduro de potasio** se usa para el tratamiento de esporotricosis.

Las nocardiosis y los micetomas actinomicóticos son tratadas con sulfonamidas o, más recientemente, con una combinación de trimetoprima sulfametoxazol (TMS). Estas enfermedades producidas por bacterias no responden a la terapia con antifúngicos.

En los últimos años se trató de suplantar la anfotericina B en altas dosis por tratamientos combinados de anfotericina B, en bajas dosis (no letales para el hongo ni tóxicas para el paciente), con otras drogas. Este tratamiento se basa en la débil pero selectiva unión de la anfotericina B al ergosterol de las membranas celulares fúngicas a bajas concentraciones y la subsecuente permeabilización que permitiría la introducción de otras drogas y macromoléculas, disminuyendo la acción tóxica y potenciando el efecto antifúngico.

Se encontró que con concentraciones de anfotericina B muy por debajo de la CIM, flucitocina y tetraciclinas potenciaron su efecto antifúngico contra *C. neoformans* y algunas especies de *Candida*; rifampicina incrementó su efecto contra *C. albicans*, *H. capsulatum* y *B. dermatitidis*. Así, anfotericina B y flucitocina es el tratamiento de elección para meningitis criptocócica; sin embargo, no todas las combinaciones son efectivas y algunas presentan antagonismos. Tal el caso del miconazol que, al disminuir la síntesis de ergosterol, disminuye la unión a la anfotericina B, bajando su efectividad.

Finalmente conviene recordar que, antes de instaurar una terapia antifúngica, es necesario determinar si



realmente se justifica, con lo que se hace imprescindible considerar el tipo de hongo infectante, el órgano infectado, el estado clínico del paciente y el carácter autolimitado o progresivo de la afección.

En general en pacientes sin alteraciones en su "status inmune" las infecciones pulmonares leves o asintomáticas debidas a *H. capsulatum* y *C. immitis* resuelven espontáneamente y lo mismo ocurre con infecciones pulmonares por *C. neoformans* e infecciones aspergilaes endobronquiales. En cambio, siempre requieren terapia antifúngica: la blastomicosis, la criptococosis del SNC, la coccidioidomicosis e histoplasmosis sistémicas con invasión del SNC, ojos, huesos o espacios reticulares, la invasión del parénquima pulmonar u otros órganos por *Aspergillus* y otros hongos y todas las enfermedades oportunistas invasoras en hospedadores inmunocomprometidos.

Es conveniente recordar que para decidir cual será el tratamiento más adecuado, además del conocimiento de su agente causal, localización y el estado general del paciente hay que tener en cuenta no sólo el poder fungicida del agente elegido, sino también, su toxicidad, disponibilidad en el mercado, costo y la posibilidad de administrarse sin que afecte de forma importante alguna función vital del paciente.

#### PRUEBAS DE SENSIBILIDAD PARA LEVADURAS

Hasta hace dos décadas las pruebas de sensibilidad para levaduras no eran consideradas necesarias ya que la mayoría de las levaduras de importancia clínica eran sensibles a la anfotericina, el antifúngico de elección para el tratamiento de las micosis invasoras. Con el advenimiento de agentes alternativos, más eficaces y menos tóxicos, el aumento registrado en el número de infecciones fúngicas debido al incremento de la población infectada por el HIV, el número de pacientes hospitalizados y de otro tipo de pacientes inmunocomprometidos, la detección de la resistencia de los hongos a los antifúngicos se convirtió en un tema prioritario.

Uno de los métodos que permiten diferenciar entre microorganismos sensibles y resistentes, es la determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) que no es más que aquella concentración del antifúngico capaz de inhibir visiblemente el crecimiento del hongo que se está testando. Si bien existen otros métodos para conocer si un microorganismo es sensible o resistente a un antimicrobiano, la determinación de la CIM es uno de los más sencillos y asequibles técnicamente y por esta razón se implantó fácilmente.

El objetivo principal de estos métodos es poder ser utilizados como una guía en la selección del tratamiento adecuado. Sin embargo, es apropiado considerar que la infección clínica es un sistema

complejo y dinámico y que los resultados obtenidos *in vitro*, en forma relativamente simple, a veces tienen poca correlación. Décadas de experiencia en la estandarización de las pruebas de sensibilidad a antibacterianos confirman la limitada correlación entre resultados *in vivo-in vitro*.

#### Proceso de estandarización

La estandarización de las pruebas para antifúngicos lleva décadas de atraso con respecto a los antibacterianos. En 1981, la Sociedad Francesa de Micología Médica publica un artículo con recomendaciones para estandarizar la sensibilidad *in vitro* a los antifúngicos. En 1982, el Comité de Microbiología del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) antes llamado "National Committee for Clinical Laboratory Standards" (NCCLS) constituye el Subcomité de Sensibilidad a los antifúngicos. Recién en 1983, el CLSI fundó un Subcomité que se encargó de desarrollar un procedimiento estandarizado para analizar la sensibilidad de los hongos a los antifúngicos. En 1985, este Subcomité publica su primer informe que recoge los resultados de una encuesta y un pequeño estudio cooperativo cuyos resultados son los siguientes:

Aproximadamente, el 20% de los hospitales que son miembros del CLSI con más de 200 camas realizaban pruebas de sensibilidad a los antifúngicos.

1. La mayoría utilizaban dilución en caldo.
2. La mayoría de las cepas ensayadas eran *C. albicans* u otras especies de levaduras.
3. La mayoría de los centros analizaban pocos aislamientos por año.
4. La concordancia entre los resultados entre los laboratorios que participaron en el estudio cooperativo fue inaceptablemente baja.

Tras estos hallazgos, el Subcomité decidió que era necesario desarrollar un procedimiento de referencia más reproducible. Se decidió comenzar con los siguientes aspectos básicos.

1. Metodología en macrodilución con caldo.
2. Medio completamente sintético para evitar antagonismos del mismo frente a algún antifúngico.
3. Se adoptaron con muy pocas variaciones los procedimientos acordados para los antibacterianos relativos a la preparación, almacenamiento y dilución de los antifúngicos.

A pesar de estos acuerdos, se necesitaban más datos de otros factores que influyen en la obtención de resultados. Estas variables son las siguientes:

1. Preparación del inóculo.
2. Tamaño del inóculo.
3. Elección del medio sintético.
4. Temperatura de incubación.
5. Duración de la incubación.



## 6. Método de lectura y definición de la CIM.

Para lograr el acuerdo entre estas variables se realizaron una serie de estudios cooperativos que se publicaron y cuyas conclusiones fueron recogidas en 1992 en el primer estándar del CLSI, "Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts" documento M27-P ("proposed"). Para las levaduras, este proceso terminó en 2002 con la publicación del Documento M27-A2 "Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts" que incluye además, a nuevos antifúngicos.

Actualmente, la reproducibilidad interlaboratorios de este método es comparable a la que se obtiene con el método diseñado para los antibacterianos. Paralelamente al desarrollo de este estándar de referencia se desarrollaron técnicas de referencia como el EUCAST Discusión Document E. Dis. 7.1 para levaduras fermentadoras.

### **METODOLOGÍA DE REFERENCIA PARA DETERMINAR LA SENSIBILIDAD DE LAS LEVADURAS A LOS ANTIFÚNGICOS. DOCUMENTO M27-A2. ESTÁNDAR APROBADO.**

El método que describe este estándar está pensado para evaluar levaduras que causan infecciones invasoras. Estas levaduras abarcan todas las especies de *Candida* y *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans*. Este método no se aplica para evaluar la fase levaduriforme de los hongos dimórficos como *Blastomyces dermatitidis*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Coccidioides* sp. o *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*. Asimismo, el análisis de los hongos filamentosos añade diversos problemas que han sido evaluados en otro documento.

El documento M27-A2 es un "ESTÁNDAR DE REFERENCIA". Se desarrolló a través de un proceso de consenso con la intención de facilitar un acuerdo entre laboratorios sobre la forma de evaluar la sensibilidad de las levaduras a los antifúngicos. Un objetivo primordial de un estándar de referencia es sentar las bases para que se puedan desarrollar otras metodologías más accesibles pero que obtengan resultados similares al estándar.

Las condiciones más adecuadas para establecer finalmente este estándar quedan resumidas en la tabla 1

#### **Impacto del tiempo de lectura: 24 versus 48 horas**

La metodología del M27-A2 recomienda para *Candida* spp. la lectura a 48 h. Para la mayoría de los aislamientos, las diferencias entre la lectura a 24 y 48 h es mínima y no altera la interpretación de la categoría (p. ej. no cambia si el aislamiento debe ser categorizado "sensible" o "resistente"). Sin embargo,

en estudios recientes se incluyó la lectura a 24 h debido a:

1. A menudo la CIM puede leerse a las 24 h y
2. Las lecturas hechas a las 24 h pueden ser clínicamente más relevantes para algunos aislamientos.

Algunas cepas pueden mostrar un incremento marcado entre las 24 y 48 h debido a un significativo trailing (inhibición parcial del crecimiento que abarca un amplio rango de concentraciones del antifúngico). Esta situación se estima en un 5% de los aislamientos y el trailing puede ser tan grande que un aislamiento sensible a las 24 h puede aparecer como resistente a las 48 h. En trabajos con modelos murinos de candidiasis diseminada se mostró que estos aislamientos deben considerarse sensibles y no resistentes.

Este concepto fue corroborado por Marr eliminando el efecto trailing mediante la disminución del pH al medio de cultivo utilizado en la prueba hasta 5 o menos y por la demostración clínica que la candidiasis orofaríngea debida a esos aislamientos responde a las bajas dosis de fluconazol utilizadas en el tratamiento convencional.

**Tabla 1. Principales condiciones del estándar aprobado por el CLSI**

Variable	Estándar
Medio de Cultivo	RPMI 1640
PH	7,0
Tampón	ácido morfolinopropanosulfónico (MOPS)
Tamaño del inóculo	0,5-2,5 x 10 <sup>3</sup> cel/ml
Preparación del inóculo	espectrofotométricamente al estándar 0,5 McFarland.
Temperatura de incubación	35 °C
Tiempo de incubación	46-50 h para la mayoría de las levaduras 70-74 h para <i>C. neoformans</i>
CIM	Anfotericina B: Ausencia de turbidez Flucitosina / Azoles: 80% de inhibición

#### **Inconvenientes del método de referencia**

A pesar de la importancia que significa contar con un método estandarizado, existen una serie de inconvenientes. En primer lugar, la concentración de glucosa en el RPMI 1640 es tan sólo del 0,2%, lo que da lugar a un escaso crecimiento de las levaduras, incluidas las especies menos exigentes como *C. albicans*. En segundo lugar, y en consecuencia de lo anterior, la lectura se realiza a las 48 horas. En tercer lugar, y quizás este sea el punto más conflictivo, la determinación de la CIM queda librada a la subjetividad de la lectura visual. Para la anfotericina B la elección de la CIM no ofrece ningún problema, ya que al ser fungicida, *in vitro* produce inhibición completa del crecimiento. Sin embargo, con los azoles esto no ocurre y en ocasiones tampoco con la flucitosina. Con estos compuestos, por sus características fungistáticas, se observa inhibición parcial del crecimiento y como consecuencia la aparición de cierta turbidez en todas las concentraciones del antifúngico. Debido a este hecho,



la elección de la CIM es un ejercicio absolutamente subjetivo y ha sido la causa principal de la poca reproducibilidad intra e interlaboratorios de estas técnicas. Espinel Ingroff *et al.* resolvieron parcialmente este problema de una forma más objetiva, que consistió en diluir el tubo control de crecimiento 1:5, lo que equivale al 80% de inhibición. De esta forma comparaban la turbidez resultante de las diluciones con toda la batería de tubos y elegían visualmente el primer tubo que tuviera una turbidez similar o menor a la del tubo diluido. Sin embargo, la utilización de la lectura espectrofotométrica de los tubos eliminaría la subjetividad y haría posible la elección del porcentaje de inhibición más adecuado. Por otro lado, varios estudios corroboran que la lectura automatizada elimina el efecto del tamaño inóculo, probablemente mayor que la frecuencia de aparición de clones resistentes.

#### Métodos alternativos

A partir del método de macrodilución propuesto por el CLSI (M27-P) en 1992, se desarrolló un micrométodo equivalente. Anaissie *et al.* introdujeron al método de microdilución la agitación de las placas antes de la lectura espectrofotométrica y visual, demostrando que esto produce una mejor elección de la CIM y que los resultados son independientes del inóculo empleado, la temperatura y el tiempo de incubación. Además, afirmaron que la lectura visual y espectrofotométrica son equivalentes.

En cuanto a la elección del punto final en la determinación de la CIM, también se realizaron varios estudios modificando el medio de RPMI propuesto por el CLSI. En el Documento E Dis 7.1 EUCAST, estándar aprobado, para levaduras fermentadoras, entre otras modificaciones al M27-A2 del CLSI, se propone el uso de RPMI suplementado hasta una concentración de 20 g/l, propuesto por Rodríguez Tudela *et al.*, puede simplificar la determinación de la CIM. Debido a que las levaduras asimilan la glucosa como fuente de carbono, parece razonable que la adición de glucosa al medio permita un mejor desarrollo de estos microorganismos. La excepción a este punto la forman la mayoría de las levaduras que no fermentan la glucosa (*Cryptococcus neoformans*, *Trichosporon beigelii*, etc), en las que la adición de este compuesto no produce mejoría significativa del crecimiento.

Existen otras modificaciones, como las propuestas por Ghannoum, que tienen que ver con el tamaño del inóculo. La elección de un inóculo bajo ( $0,5-2,5 \times 10^3$  UFC/ml) fue para maximizar la reproducibilidad interlaboratorios. Sin embargo, Ghannoum recomiendan proponen el uso de un inóculo  $\geq 10^4$  UFC/ml. La utilización de este inóculo permite un crecimiento a las 24 horas más homogéneo entre especies y aumenta las posibilidades de detectar clones

resistentes dentro de una población heterogénea. Además, cuando se determinaron las CIMs de las cepas control, el aumento del inóculo no mostró diferencias significativas entre los resultados.

La elección de qué coeficiente de inhibición elegir para los azoles y la flucitosina es un tema también controvertido. En dos trabajos publicados respectivamente por Odds *et al* y Rex *et al.* se llega a la misma conclusión que parecería más adecuado considerar la CIM como la inhibición del 50% del crecimiento para estos antifúngicos. Hay que tener en cuenta que estas observaciones están determinadas *in vitro* y en un modelo experimental y que la extrapolación al humano debe ser cautelosa.

Otra modificación al método de microdilución fue el desarrollo de un micrométodo colorimétrico utilizando indicadores de pH o de óxido-reducción pero el que ha sido más ampliamente estudiado y desarrollado es el azul de Alamar (un colorante indicador de óxido-reducción, Alamar Biosciences, Inc., Sacramento, CA, USA). Este método permite una mejor diferenciación del punto final para la determinación de la CIM y además es equivalente al método de microdilución de referencia. También fue evaluado un método comercial en microplaca conteniendo este colorante deshidratado (Sensititre), el cual presentó una concordancia ( $\pm 2$  diluciones) del 83 al 92% con el macrométodo de referencia.

Entre las alternativas propuestas se incluyeron varios medios de cultivo diferentes: el medio mínimo esencial de Eagle, el de alta resolución y el medio indefinido de base nitrogenada para levaduras (YNB). Los resultados con el medio de alta resolución son similares al macrométodo de referencia, sin embargo el medio de YNB presenta variaciones entre lotes por lo cual sólo es utilizable en laboratorios individuales o en circunstancias específicas.

En síntesis, tanto el micro como el macrométodo de referencia son los recomendados como métodos estandarizados, aunque todavía existen algunas limitaciones como la detección de resistencia a la anfotericina B y para *Cryptococcus neoformans*.

#### Limitaciones del método de referencia

Uno de los mayores problemas que aún no está resuelto son las levaduras que no fermentan la glucosa. El *Cryptococcus neoformans*, por ejemplo, debido a su crecimiento lento y escaso, dificulta la determinación de su sensibilidad. El CLSI incluye en su documento M27-A2 a este microorganismo recomendándose que la elección de la CIM se haga a las 72 horas. Otra alternativa que recomienda el CLSI es la utilización de Base de nitrógeno para levaduras (Yeast Nitrogen Base) como medio de cultivo. Sin embargo, el análisis cuidadoso del artículo de Ghannoum *et al.* permite realizar las siguientes consideraciones. La tabla 2, es



una transcripción de la tabla original publicada en dicho artículo en el que se recoge el crecimiento de 21 *Cryptococcus neoformans* a las 48 horas con un inóculo inicial de  $10^4$  UFC/ml.

Tabla 2. Comparación del crecimiento de *Cryptococcus neoformans* en varios medios de cultivo

Medio de cultivo	DO <sub>420</sub> ± σ	Coefficiente de variación (%)	Nº de cepas con DO <sub>420</sub> ≤ 0,01
BYNB 7	0,062 ± 0,03	42	1
YNB 5,4	0,072 ± 0,04	55	2
SAAMF	0,031 ± 0,01	39	0
RPMI	0,045 ± 0,02	49	3

Como se puede observar el crecimiento es muy escaso en todos los medios de cultivo ensayados y no parece justificado recomendar ninguno de ellos. Se puede asumir que una cepa crece de forma adecuada cuando la DO alcanza el 0,5. En un trabajo posterior Odds *et al* demuestran que el factor limitativo del crecimiento de *Cryptococcus neoformans* es la disponibilidad de oxígeno. En la siguiente tabla se puede ver como la adición de glucosa mejora el crecimiento de *C. albicans* y la agitación el de *Cryptococcus neoformans*. Es decir que la disponibilidad de oxígeno consigue que, con independencia de la concentración de glucosa, se alcance un crecimiento adecuado. Sin embargo, en otro trabajo realizado en tubos con 5 ml de medio, también se observa cómo la glucosa incrementa el crecimiento de la mayoría de los *Cryptococcus neoformans* utilizados. En la tabla 3 se puede observar la comparación del crecimiento de *Cryptococcus neoformans* y *C. albicans* con RPMI, RPMI-2% glucosa, con y sin agitación.

Tabla-3. Comparación del crecimiento de *Cryptococcus neoformans* y *C. albicans* con RPMI, RPMI-2% glucosa, con y sin agitación

		Media ± SD / OD 405 (48 h a 37 °C)		
		0,2 glucosa	%	2% glucosa
<i>C. neoformans</i> (n=15)	Sin agitación	0,17 ± 0,10		0,18 ± 0,05
	A 20 r.p.m.	0,31 ± 0,16		0,39 ± 0,17
<i>C. albicans</i> (n=12)	Sin agitación	0,37 ± 0,06		0,8 ± 0,17
	A 20 r.p.m	0,48 ± 0,14		0,97 ± 0,14

En resumen, parece conveniente realizar los estudios necesarios para disponer de un nuevo método de determinación de la sensibilidad de *Cryptococcus neoformans* y de otras levaduras no fermentadoras, frente a los antifúngicos..

## PRUEBAS DE SENSIBILIDAD PARA HONGOS FILAMENTOSOS

El subcomité del CLSI publicó en 1998 su propuesta de estándar: el documento M38-P, y en 2002 el documento aprobado M38-A .

Todos los estudios realizados previamente al documento fueron diseñados de forma similar a los que se utilizaron para estandarizar las pruebas de sensibilidad de levaduras. En el primer estudio se sentaron las bases de la técnica en macrodilución y al mismo tiempo se comparó con una adaptación a microdilución. Tanto el estándar propuesto como el aprobado se centran sólo en la microdilución.

## METODOLOGÍA DE REFERENCIA PARA DETERMINAR LA SENSIBILIDAD DE LOS HONGOS FILAMENTOSOS A LOS ANTIFÚNGICOS. ESTÁNDAR APROBADO. DOCUMENTO M38-A

### Antifúngicos

Para estas pruebas se recomienda ensayar únicamente anfotericina B e itraconazol debido a que son los antifúngicos que tienen una actividad *in vitro* e *in vivo* frente a la mayoría de los hongos miceliales.

### Aislamientos

Se utilizaron 30 aislamientos de hongos filamentosos pertenecientes a las siguientes especies: *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*, *Pseudallescheria boydii* y *Rhizopus oryzae*.

Como controles del procedimiento se incluyeron *Candida parapsilosis* ATCC 22019 *Aspergillus flavus* ATCC 204304, y *Aspergillus fumigatus* ATCC 204305

### Medio de cultivo

El medio de cultivo recomendado es RPMI 1640 con 0,3 g/litro de L-glutamina y 0,165 M de tampón MOPS (34,54 g/litro) sin bicarbonato sódico. El pH debe ser de  $7 \pm 0,1$ .

### Diluciones de los antifúngicos

El intervalo de concentraciones elegido para la anfotericina B es entre  $32 \pm 0,03$  µg/ml y para el itraconazol entre  $16 \pm 0,015$  µg/ml.

Se recomienda la utilización de placas de microdilución de 96 pocillos con el fondo redondo.

### Inóculo

El inóculo final debe ser de aproximadamente  $0,4 \times 10^4 - 5 \times 10^4$  UFC/ml. Los hongos problema y los controles se cultivan durante 7 días a 35 °C en tubos de agar papa dextrosa para inducir la esporulación excepto *Fusarium* spp. que se incubaba a 35 °C durante 48-72 horas y luego a 28 °C hasta completar la semana.

### Incubación

Las placas inoculadas se incuban a 35 °C durante 3



días dentro de una caja de plástico con papel de filtro humedecido para prevenir la evaporación del medio, pero sin impedir la entrada de aire.

#### Lectura de las CIM

La lectura se realiza a las 72 horas de forma visual.

### METODOLOGIA DE DIFUSIÓN CON DISCO EN MEDIO SÓLIDO

En las dos últimas décadas, se desarrollaron y realizaron numerosos trabajos con el fin de mejorar las pruebas de sensibilidad de los antifúngicos *in vitro*. En la actualidad existen técnicas de referencia disponibles para levaduras y hongos filamentosos.

No obstante, distintos grupos de trabajo en todo el mundo comenzaron a desarrollar pruebas de sensibilidad en medio sólido, en la intención de obtener técnicas que pudieran llevarse a cabo en el laboratorio clínico de rutina. Como resultado de estos trabajos, en el 2004 el CLSI publicó su documento M44-A que sienta las bases para realizar las pruebas de sensibilidad de los antifúngicos en medio sólido con discos de papel.

Además de la difusión en agar con discos de papel, las tiras de Etest son una herramienta potencial al momento de realizar pruebas de sensibilidad en los laboratorios de rutina. Existen numerosos trabajos que avalan el uso con Etest como una alternativa a la CIM por microdilución.

Sin embargo, hay que advertir que el Etest nunca formará parte de un estándar ya que su origen es comercial.

Es imprescindible que los estándares incluyan metodología asequible para cualquier laboratorio y alejada de cualquier interés comercial.

#### Tabletas

El antifúngico, en forma cristalina, se mezcla con una sustancia inerte sin actividad antimicrobiana que tampoco interfiere con ningún aspecto del proceso. La principal ventaja de este procedimiento es la estabilidad de las tabletas, ya que duran 4 años a 37 °C. Se garantiza que la concentración del antimicrobiano en la tableta es del 90 al 110%. El fabricante es Neo Sensitab Rosco.

#### Etest (AB Biodisk)

Es una técnica cuantitativa. Consiste en la utilización de una tira de plástico que, en una de sus caras, lleva un gradiente de concentración del antimicrobiano. Tras la incubación, la intersección entre el crecimiento del microorganismo y la zona de inhibición en forma de elipse indican la CIM.

Para los antifúngicos, el Etest es el método de difusión que más se compara con el método de referencia y que presenta resultados coincidentes con el estándar; sin embargo, la metodología aún no está

completamente estandarizada ya que todavía no se han definido los medios de cultivo a utilizar.

### DETERMINACIÓN DE LA RESISTENCIA A ANTIFÚNGICOS

#### Puntos de corte

Este es un aspecto muy controvertido debido a que existen una multitud de factores que influyen en la evolución clínica del paciente y la CIM no es más que uno de ellos. Sin embargo, es muy útil disponer de un valor de CIM que identifique aquellos pacientes que tienen pocas posibilidades de evolucionar adecuadamente si se trata la infección con dicho antimicrobiano y viceversa.

Rex *et al.*, han propuesto puntos de corte tentativos para fluconazol e itraconazol frente a especies pertenecientes al género *Candida*. La metodología empleada siguió el documento M27 del CLSI. En la tabla 4 se muestran los puntos de corte propuestos por el CLSI para fluconazol, itraconazol y flucitosina.

Tabla 4. Puntos de corte (µg/ml) recomendados por el CLSI. Documento M27-A2

Antifúngico	S	SDD	I	R
Fluconazol	8	16-32	-----	64
Itraconazol	0,125	0,25-0,5	-----	1
5-fluorocitosina	4	-----	8-16	32

S: sensible, SDD: sensible dependiente de la dosis, I: intermedia, R: resistente

En conclusión, desde la aparición en 1992 de las primeras pruebas estandarizadas de sensibilidad a los antifúngicos para levaduras, el avance ha sido considerable. Actualmente disponemos de varias herramientas equivalentes para determinar la CIM de diversos antifúngicos. En el contexto de la candidiasis orofaríngea en el paciente infectado por el HIV se alcanzó un grado aceptable de correlación entre los resultados obtenidos *in vitro* y la evolución clínica del paciente con *C. albicans* y fluconazol. Actualmente, el resto de las situaciones ofrece demasiados interrogantes como para establecer conclusiones. Es posible que, en un futuro no muy lejano, aparezcan nuevos estándares para la anfotericina B y para *Cryptococcus neoformans*. Por el momento, la realización rutinaria de la sensibilidad a todos los aislamientos no parece indicada. Por el contrario, sí que es tremendamente importante que todos los laboratorios de Microbiología identifiquen las levaduras y la mayoría de los hongos miceliales involucrados en infecciones graves a nivel de especie, ya que para muchas de ellas ya se conocen los patrones habituales de sensibilidad y resistencia frente a varios



antifúngicos y para el resto es necesario ir conociéndolos. Por el momento, es aconsejable determinar la CIM de anfotericina B, 5 fluorocitosina, fluconazol, itraconazol y ketoconazol de todos los hongos que se aíslen de hemocultivos, LCR, biopsias y otras muestras que denoten que el paciente puede tener o tiene una infección fúngica grave. Asimismo, en aquellas situaciones en las que el cuadro clínico no responda a un tratamiento correcto, es necesario, además de descartar otras causas, conocer la sensibilidad del hongo causante del proceso. Si estas determinaciones no se pudieran llevar a cabo en el propio laboratorio, es conveniente e importante que se contacte con un Centro de Referencia que pueda realizarlas.

## ANTIFÚNGICOS

### Antifúngicos empleados en micosis sistémicas

1. Polienos  
Anfotericina B  
Presentaciones lipídicas  
Anfotericina B liposomal  
Anfotericina B en complejo lipídico  
Anfotericina B en dispersión coloidal  
Nistatina liposomal
2. Fluorocitosina
3. Azoles  
Imidazoles  
Ketoconazol  
Miconazol  
Triazoles  
Fluconazol  
Itraconazol

### Nuevos antifúngicos

1. Caspofungina
2. Nuevos triazoles de uso sistémico  
Voriconazol  
Posaconazol  
Ravuconazol

### Moléculas en fases experimentales de desarrollo

- ◆ Derivados lipopeptídicos
  - ◆ Sordarinas
  - ◆ Pradimicinas
- Otras moléculas antifúngicas

## POLIENOS

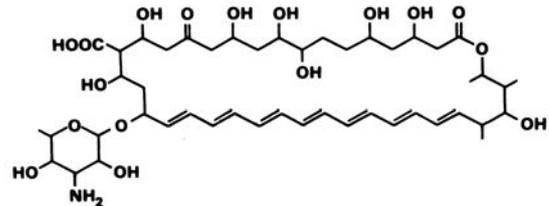
Los compuestos se caracterizan por poseer un anillo macrólido cerrado por la formación de un éster y que contiene al menos tres uniones dobles conjugadas. Son productos naturales obtenidos de especies de *Streptomyces*. Actúan produciendo daño en la membrana y alteran la permeabilidad de las células eucarióticas. Se produce una importante pérdida de potasio y luego un daño en funciones metabólicas.

Todos estos efectos están asociados a su acción fungicida más que a la fungistática.

Su mecanismo de acción es la afección de los polienos a unirse a los esteroides, principalmente al ergosterol.

### ANFOTERICINA B (AMB)

En forma tópica puede ser usada con éxito en el tratamiento oral, genital o cutáneo. También es utilizada en la profilaxis contra la candidiasis en pacientes neutropénicos.



No se absorbe bien en el intestino por lo que sólo se administra por vía oral en casos de candidiasis gastrointestinal. Para su efecto sistémico debe administrarse por vía endovenosa o intratecal. Lamentablemente esta droga posee efectos colaterales altamente tóxicos. Su efecto nefrotóxico produce aumento de la uremia e hipopotasemia y, durante su administración, puede observarse fiebre, transpiración, anorexia, dolor de cabeza, escalofríos, náuseas, vómitos, dispepsia y dolor en el lugar de la infección. La concentración que alcanza en suero está en el orden de 2 a 3 µg/ml luego de la administración y queda en 0,5 µg/ml durante 24 hs. Penetra escasamente en líquido cefalorraquídeo (LCR), orina y en el interior del ojo.

En el caso de meningitis por *Cryptococcus* la terapia recomendada es la asociación con flucitosina. Una alternativa para disminuir los efectos nefrotóxicos es encapsular la droga en liposomas (anfotericina B liposomal) (LAMB); es tan efectiva como la droga libre, se usa desde hace muy poco tiempo y es muy costosa.

La anfotericina B ha sido el principal agente utilizado en el tratamiento de las infecciones fúngicas graves durante los últimos 30 años. La aparición de nuevos antifúngicos no ha conseguido desplazar a este antimicrobiano de su posición dominante. Las nuevas formulaciones de anfotericina B probablemente mantendrán a este fármaco como tratamiento de referencia durante bastante tiempo.

### Mecanismo de resistencia (probado *in vitro*)

Hay una disminución en la producción de ergosterol reemplazado por los precursores lanosterol, fecosterol, lichesterol y episterol; esto está acompañado por cambios en la cantidad de esterol y en los fosfolípidos. En algunas cepas no hay cambios en los contenidos o



en la concentración de esteroides o lípidos sino en la permeabilidad.

La resistencia a la anfotericina B no es un fenómeno muy común entre las levaduras. La mayoría de las levaduras son inhibidas *in vitro* por concentraciones iguales o menores a 1 µg/ml. Las concentraciones séricas de anfotericina B, tras dosis entre 0,5 y 1 mg/kg, son entre 1,2-2,4 µg/l. Por lo tanto estas cepas deberían ser consideradas sensibles.

El consenso general es que la resistencia primaria no existe para el género *Candida*.

La resistencia secundaria es también muy poco frecuente. La mayoría de los casos con resistencia indudable se deben a especies distintas de *C. albicans*. En los casos descritos la mayoría de enfermos estaban inmunodeprimidos y habían recibido anfotericina B durante mucho tiempo.

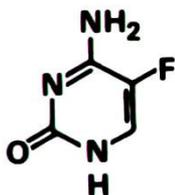
Otras especies de *Candida* parecen tener una mayor tasa de resistencia a la anfotericina B, como es el caso de *C. lusitanae*.

A pesar de que la mayoría de estos estudios están realizados con métodos no estandarizados, informan de la existencia de casos esporádicos de resistencia a la anfotericina B. Es evidente que la tasa de resistencia a este compuesto es baja y se puede asumir que la inmensa mayoría de las levaduras son sensibles. Sin embargo, parece obligada la realización de sensibilidad a los antifúngicos de todas las cepas provenientes de infecciones potencialmente graves y que vayan a ser tratadas con este antifúngico, máxime si el aislamiento corresponde a una especie distinta de *C. albicans*.

#### FLUCITOSINA O 5-FLUOROCITOSINA (5-FC)

Es una pirimidina fluorilada, se desarrolló como una droga anticancerígena pero su acción es dudosa para el tratamiento del cáncer.

Es hidrosoluble, se absorbe bien en el intestino y por lo tanto se la administra por vía oral



#### Mecanismo de acción:

La droga es transportada en las células fúngicas por una citosina permeasa, dentro de la célula la enzima citosina deaminasa convierte a la flucitosina en 5-fluorouracilo, este es transformado en 5-fluorouridina monofosfato por la UMP-pirofosforilasa, que continúa

fosforilando y entra en la cadena del RNA, con consecuencias en la síntesis de proteínas. También se convierte en 5-fluorodeoxiuridina monofosfato que inhibe la síntesis de la timidina sintetasa, inhibiendo la síntesis de ADN.

#### Mecanismo de resistencia:

La prevalencia de resistencia primaria a la 5-FC varía de país en país y está relacionada con la incidencia de la aparición de *Candida albicans* serotipo B, debido a que la mayoría de estas cepas son resistentes a la droga. Se observó que la resistencia *in vitro* aparecía en dos formas: algunas cepas desarrollaban más lentamente la resistencia a una concentración mayor o igual a 200 mg/ml, mientras otras eran en cambio totalmente resistentes y correspondían al serotipo B de *Candida albicans*.

Los tres "loci" donde se desarrolla la resistencia son:

1. Citosina permeasa
2. Citosina deaminasa
3. UMP fosforilasa.

La aparición de aislamientos con resistencia secundaria al utilizar este fármaco, así como la detección de la existencia de sinergismo con anfotericina B, han conducido a su utilización combinada, principalmente en el tratamiento de infecciones por *Candida* y *Cryptococcus*. También se demostró *in vitro* y en modelos experimentales de candidiasis sistémica y criptococosis que la administración de ketoconazol y fluconazol con 5-fluorocitosina es sinérgica.

#### AGENTES AZÓLICOS

Comienzan a desarrollarse en los años '60 y los primeros fueron Clotrimazol y Miconazol. La introducción de estos antifúngicos supuso un avance en el tratamiento de las infecciones fúngicas. Tienen un amplio espectro de actividad, su administración puede ser por vía oral y no tienen la toxicidad de la anfotericina B. Todas estas ventajas llevaron a una amplia utilización de estos compuestos, en especial del fluconazol, lo que dió lugar a la aparición de resistencias.

#### Mecanismo de acción:

Bloquea la síntesis del ergosterol uniéndose al grupo Hemo del citocromo P-450 y ocupa el sitio donde originalmente se ubica el oxígeno. El citocromo actúa en la 14 demetilación del ergosterol que es un componente de la membrana, esto hace que se acumulen productos 14 metil esteroides en la célula. La diferencia en la selectividad de los azoles por el citocromo P-450 de células animales o fúngicas hace que sean más o menos tóxicos.



Se vio que los triazoles (que tienen N) poseen mayor potencia contra *Candida* que los imidazoles, esto se debe a la afinidad en la unión al grupo Hemo del citocromo P-450.

En el caso del Fluconazol y del Itraconazol, este último es más efectivo in vitro debido a que su carácter hidrofóbico hace la unión más estable.

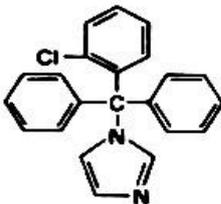
#### Mecanismo de resistencia:

En 1986 Kerridge y Nicholas estudiaron las levaduras y observaron que las especies haploides (*C. glabrata* y *C. guilliermondii*) desarrollaban resistencia más frecuentemente que las diploides (*C. albicans*); pero las diploides heterocigotas podrían expresar niveles intermedios de resistencia. Esto sucede en *C. albicans* con respecto a la Flucitocina, teóricamente esta especie podría mostrar también resistencia a los azoles con la mitad de su genoma expresando mayor cantidad de citocromo P-450.

Los mecanismos serían:

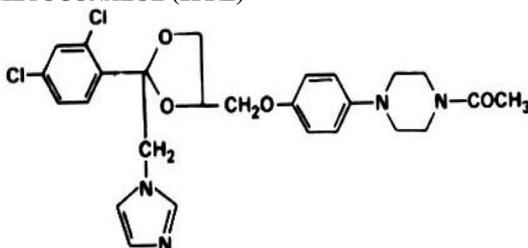
1. Disminución en la afinidad de P-450 por los azoles, lo que sugeriría un cambio en su estructura.
2. Aumento en la producción del citocromo P-450.
3. Cambios a nivel de la permeabilidad de la membrana que impedirían el paso de los azoles.
4. Sobreexpresión de los genes que codifican para las bombas de eflujo (MDR y CDR).

#### CLOTRIMAZOL



Fue el primer azólico usado en la clínica, casi no se absorbe a nivel intestinal, por lo cual generalmente se lo utiliza en las candidiasis superficiales. Es muy efectivo en candidiasis oral y vaginal aun en pacientes inmunocomprometidos. A nivel sistémico posee efecto inductivo sobre enzimas hepáticas que degradan esta droga.

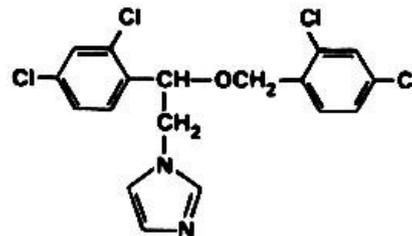
#### KETOCONAZOL (KTZ)



Fue el primer azólico activo de administración oral utilizado en la clínica. Es ampliamente usado, principalmente en candidiasis mucocutáneas y en onicomicosis candidiásicas. Las formulaciones farmacéuticas de acción local como las cremas y los óvulos vaginales presentan, aparentemente, un efecto terapéutico menor que otros azoles. La forma oral debe darse junto a comidas, jugos o gaseosas, ya que se requiere de la acidez gástrica para poder disolverla, siendo las concentraciones plasmáticas alcanzables de 4-8 mg/L, y en tejidos y LCR de 1 mg/kg y 1 mg/L respectivamente.

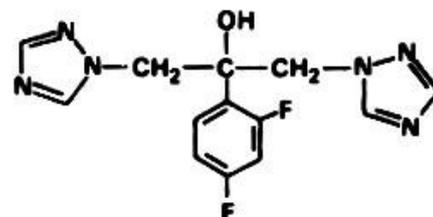
Efectos colaterales: es teratogénica (no se debe administrar durante el embarazo) puede producir náuseas y rash cutáneo; al interactuar con el sistema del citocromo P-45 adrenal, es un inhibidor de la producción de testosterona. Debido a que puede resultar hepatotóxica, cuando se la utiliza de rutina en la clínica se recomienda el seguimiento de las transaminasas para monitorear la función hepática.

#### MICONAZOL (MCZ)



Apareció luego del Clotrimazol, presentando como ventaja su administración parenteral, también puede ser utilizado en forma tópica; no se lo utiliza en forma oral ya que presenta un bajo nivel de absorción. Se lo utiliza en candidiasis superficiales y en candidemias; su nivel máximo alcanzable en suero es de 2-3 mg/L mientras que es muy bajo en orina y LCR. Su uso puede presentar disturbios hematológicos y prurito.

#### FLUCONAZOL (FCZ)



Es un triazol que se presenta en cápsulas y en solución; muy activo en administración oral, también se utiliza en forma parenteral. Sus resultados terapéuticos son muy efectivos y además tiene la ventaja de poseer una excelente propiedad

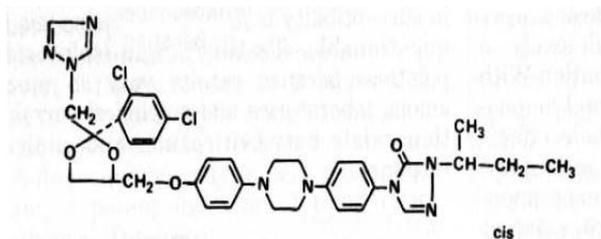


farmacocinética y mínima unión de proteínas. No tiene efectos colaterales adversos importantes. Al excretarse por orina se lo utiliza fundamentalmente en infecciones del tracto urinario.

Su uso se extiende a infecciones superficiales, mucocutáneas, sistémicas y en profilaxis en pacientes inmunosuprimidos.

El uso excesivo en pacientes inmunocomprometidos puede ocasionar selección de cepas como *C. krusei* o *C. glabrata* (resistentes a esta droga) como así también la aparición de resistencia en *C. albicans* en pacientes tratados previamente.

### ITRACONAZOL (ITZ)



Es un triazol también activo por vía oral. Tiene gran afinidad por los tejidos. No posee efectos colaterales adversos de importancia.

Su uso es posterior al del fluconazol y se lo utiliza en el tratamiento de las candidiasis sistémicas, superficiales y mucocutáneas. La acción de esta droga se comienza a analizar ahora ya que su aparición en el mercado es reciente.

### NUEVOS TRIAZOLES

Muchos compuestos de este grupo se encuentran en fase de desarrollo aunque tres de ellos son los que más avanzaron de cara a su comercialización: (i) voriconazol (Pfizer, UK-109,496); (ii) posaconazol (Schering-Plough, SCH-56592) y (iii) ravuconazol (Bristol-Myers Squibb, BMS-207147). Estos tres triazoles son más liposolubles que el fluconazol y muestran actividad frente a cepas de levaduras resistentes al fluconazol. No obstante, las CIMs de voriconazol, posaconazol y ravuconazol en las cepas resistentes al fluconazol son más altas que en las cepas sensibles al fluconazol, lo que hace suponer que es posible el desarrollo de resistencia cruzada. Respecto a los hongos filamentosos, los nuevos triazoles muestran un espectro de actividad similar al de itraconazol, por lo que se han puesto esperanzas en su utilización en el tratamiento de la aspergilosis invasora. El voriconazol se licenció en 2002. Existe una presentación oral y otra parenteral. Se administra a dosis de 200-400 mg/12 horas, se une a proteínas plasmáticas en un 60%, se metaboliza en el hígado y se elimina por orina. Ha demostrado eficacia en el tratamiento de la candidosis oral y en la aspergilosis invasora. Se han descrito algunos efectos adversos como visión borrosa,

fotosensibilidad y alteraciones hepáticas, además de interacciones medicamentosas parecidas a las de itraconazol. Respecto al posaconazol y el ravuconazol existen menos datos clínicos, aunque parece que pueden tener la misma eficacia que el voriconazol.

### IMPORTANCIA DE LA RESISTENCIA A LAS DROGAS AZÓLICAS

Es muy difícil comprobar que un hongo posea resistencia primaria a cualquier antifúngico. Por motivos obvios, es importante diferenciar la resistencia intrínseca de la resistencia primaria o secundaria, ya que en este último caso si que es muy importante la realización de las pruebas de sensibilidad a los antifúngicos para determinar si se puede utilizar dicho fármaco en el tratamiento. La resistencia secundaria era un hecho muy poco frecuente hasta el comienzo de los años 90. El primer caso de infección resistente causado por *C. albicans* descrito fue en el año 1978.

Posteriormente se describieron algunos pacientes con candidiasis mucocutánea crónica, refractarios al tratamiento con ketoconazol. Estos pacientes habían recibido durante mucho tiempo este antifúngico y se comprobó que los aislamientos eran resistentes. Años más tarde, en pacientes infectados por el VIH, comenzaron a aparecer casos de candidiasis orofaríngea clínicamente resistente a los azoles y en los que se detectaba que los aislamientos de *C. albicans* causantes del cuadro tenían CIMs más elevadas que aquellos aislamientos que respondían al tratamiento.

Los fallos terapéuticos comienzan a aparecer cuando las CIMs de fluconazol frente a *C. albicans* alcanzan los 8 µg/ml, siendo un hecho cuando llegan a los 16 µg/ml.

La mayoría de los aislamientos resistentes al fluconazol y otros azoles proceden mayoritariamente de cuadros de candidiasis orofaríngea. Sin embargo, aunque raros, existen aislamientos procedentes de hemocultivos, LCR y exudados vaginales que tienen CIMs elevadas al fluconazol. Este hecho, unido a la circunstancia de que la resistencia cruzada de *C. albicans* a los azoles no es universal, hace aún más necesaria la determinación de la sensibilidad a los antifúngicos especialmente en aquellos casos en los que no se obtenga respuesta a un tratamiento correcto.

*Candida krusei* es una especie insensible al fluconazol. Sin embargo es sensible al itraconazol ya que las CIMs son, en general, similares a las de otras especies sensibles y además se han descrito casos de respuesta clínica al tratamiento con este fármaco.

*Candida glabrata* posee resistencia primaria o secundaria a los azoles. Al ser una especie haploide, las mutaciones que pueden conferir resistencia a los azoles se pueden expresar más fácilmente. Este hecho puede ocurrir también con *C. guilliermondii*. Aunque raros, se



pueden encontrar aislamientos con CIMs a azoles bajas.

En relación con *C. neoformans*, hay que señalar que tanto con el método recomendado por el CLSI como con el propuesto por Rodríguez Tudela *et al.*, el crecimiento de esta especie es muy escaso. Con el documento M27-T ya se demostró la ausencia de correlación entre los resultados de laboratorio y la evolución clínica de los pacientes.

En relación con los hongos miceliales, el fluconazol no es activo sobre *Aspergillus*, *Sporothrix*, *Rhizopus* y otros hongos filamentosos. Está comprobado que el itraconazol es activo frente a *Aspergillus* y es una opción de tratamiento.

### CASPOFUNGINA

La caspofungina (Merk & Co, MK-0991) es el primer fármaco que se comercializa de una nueva clase de antifúngicos, las equinocandinas. La principal novedad de estos antifúngicos es su mecanismo de acción, ya que actúan sobre la 1,3-beta-glucano sintetasa, enzima necesaria para la formación de 1,3-beta-glucano, uno de los principales componentes de la pared fúngica. La caspofungina se licenció a finales de 2001 para uso en enfermos con aspergilosis, en los EE.UU. y otros países, por lo que se convirtió en el primer antifúngico comercial cuya diana se encuentra en la pared fúngica.

Este mecanismo de acción le confiere ciertas ventajas, ya que no muestra resistencia cruzada con los antifúngicos que actúan sobre la membrana y como demuestran algunos datos *in vitro*, podría ser un magnífico candidato para la terapia combinada con azoles o anfotericina B. Su espectro de acción incluye *Candida* spp., *Aspergillus* spp., *Pneumocystis jirovecii* y los hongos dimórficos, pero no es activa frente a aquellas especies que tienen 1,6-beta glucano en su pared como *Cryptococcus* spp. y *Fusarium* spp. No se absorbe por vía oral por lo que sólo existe una formulación parenteral. Se administra en dosis de 50-70 mg/d, se une en un 97% a proteínas plasmáticas, se metaboliza en el hígado y se excreta en heces y orina. Según varios estudios preliminares, demostró eficacia en el tratamiento de la candidosis orofaríngea y sobre todo en el tratamiento de rescate de la aspergilosis invasora. No parece tener efectos adversos graves, aunque su infusión puede producir fiebre. Muestra interacciones medicamentosas con las ciclosporinas y la rifampicina.



## PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO

### PREPARACIONES MICROSCÓPICAS PARA LA DETECCIÓN DE ELEMENTOS FÚNGICOS EN ESPECÍMENES CLÍNICOS

#### EXAMEN DIRECTO

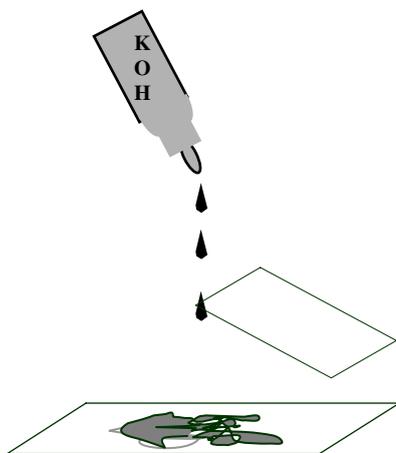
##### 1-Examen directo en fresco:

Se utiliza para observar fluidos corporales tales como LCR, pus y sangre. El material se coloca directamente entre porta y cubreobjetos y se observa al microscopio óptico (MO) con objetivos de mediano aumento.

##### 2-Examen directo por aclaramiento con KOH al 10%-20%:

Se utiliza para examinar las estructuras córneas y otras muestras espesas, viscosas u opacas, tales como esputo, pus y exudados que necesitan ser ablandados y/o aclarados con el KOH antes de su observación microscópica.

El material a observar se coloca en el centro de una lámina portaobjetos limpia y se cubre con un cubreobjetos sobre el cual se colocó una gota de KOH al 10%, de tal forma que el hidróxido actúe directamente sobre la muestra; se presiona con la uña, se calienta suavemente a la llama (sin dejar hervir) varias veces para acelerar la acción del KOH, se deja descansar 20 minutos en cámara húmeda y se examina al microscopio con luz reducida y objetivos de mediano aumento (20x y 40x). Si no se observan estructuras fúngicas, se agrega una gota de agua glicerizada (1:1) en el borde del cubreobjetos para que penetre por capilaridad; esto evita la deshidratación de la muestra y permite repetir el examen a las 48-72 h.



##### 3-Examen directo por aclaramiento y tinción:

Se utiliza para facilitar la observación de los hongos en muestras espesas. Se procede de la misma manera que en 2, solo que luego que se aclaró la muestra con el KOH, se coloca una gota de tinta Parker azul-negro

permanente super quink en el borde del cubreobjetos, para que penetre por capilaridad. Los hongos se tiñen de azul. Para evitar la deshidratación del preparado se puede agregar agua glicerizada como se indicó en 2.

##### 4-Improntas de tejido:

Se utilizan para estudiar materiales obtenidos por biopsia o necropsia. El tejido se seca con una gasa y se aplica por su superficie cuenta sobre el portaobjetos, haciendo presión para dejar una huella. Se marcan dos o tres improntas sobre el portaobjetos, se dejan secar a temperatura ambiente dentro de una placa de Petri, se fijan con metanol y luego se tiñen con el colorante que se desee.

##### 5-Frotis para examen directo con coloración:

Se utilizan para estudiar esputo, lavados bronquiales, pus, etc.; para ello se coloca una gota del material a examinar en el centro de un portaobjetos limpio, se extiende con otro portaobjetos que se apoya sobre la muestra depositada en el primero y se desliza hacia fuera. Se dejan secar dentro de una caja de Petri y una vez secos se colorean.

##### 6-Cortes histológicos:

El material se fija con formol neutralizado al 10%, se hacen los cortes de 5-8 micrones de espesor y se tiñen con PAS, MNP, MM u otra coloración específica para hongos.

##### 7-Biopsia enriquecida:

La muestra se coloca en un tubo de centrifuga estéril y se le agrega igual volumen de KOH al 10%, se deja un día en heladera y luego se centrifuga. Se observa el sedimento entre porta y cubreobjetos al MO con objetivos de bajo y mediano aumento y luz reducida, en busca de estructuras fúngicas.

## COLORACIONES

### COLORACIÓN CON TINTA CHINA

Se realiza para detectar complejo *C. neoformans* en las muestras de LCR y fluidos corporales. También es útil para estudiar cepas recuperadas de muestras clínicas cuando se sospecha complejo *C. neoformans*.

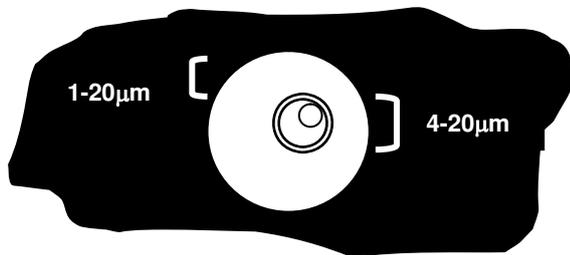
#### Método:

- Colocar una gota del LCR u otro fluido corporal sobre un portaobjetos limpio
- Agregar sobre la muestra una gota de tinta china diluida con agua destilada estéril 1:1, homogeneizar (si es necesario), y colocar un cubreobjetos.
- Observar rápidamente al MO con objetivos de bajo y mediano aumento.

#### Interpretación:



El ensayo es positivo si se observan levaduras de 4-20 micrones, rodeadas por una cápsula de 1-20 micrones de espesor, que refringe contra el fondo negro del preparado.



### COLORACIÓN DE GIEMSA PROLONGADO

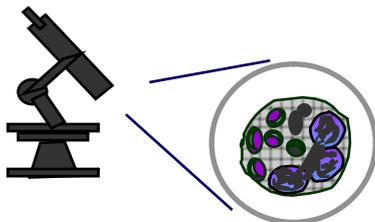
Se utiliza para detectar hongos en los tejidos por ser la más rápida de todas. De rutina se realiza para detectar levaduras intracelulares de *H. capsulatum*.

#### Método:

- Fijar el preparado con metanol durante 5 minutos, escurrir y dejar secar.
- Cubrir con solución de Giemsa diluida 1:10, recién preparada y dejar coloreando durante 30 - 40 minutos.
- Enjuagar con agua y dejar secar.

#### Interpretación:

Los hongos dimorfos tienen una morfología microscópica característica que nos puede llevar al diagnóstico. *H. capsulatum* se ve dentro de los macrófagos en frotis como una levadura pequeña, con o sin brote coloreado de azul violáceo en forma de casquete ya que su pared no se colorea.



### COLORACIÓN DE GRAM:

Esta coloración se usa para detectar bacterias filamentosas aeróbicas. No es recomendable para observar hongos.

#### Método:

Es el mismo que se utiliza en los laboratorios de bacteriología.

#### Interpretación:

Los actinomicetes aeróbicos se tiñen de color violeta a rosa fuerte, presentan formas filamentosas, cocoides y bacilares.

Los elementos fúngicos son tanto Gram positivos como Gram variables y se reconocen con dificultad, excepto las levaduras.

### COLORACIÓN DE GRAM WEIGERT

- |  |        |
|--|--------|
| a) <b>Eosina Y</b>                                   | 1,0 g  |
| Agua destilada                                       | 100 ml |
| b) <b>Solución 1</b>                                 |        |
| Aceite de anilina (anilina oil)                      | 2 ml   |
| Agua destilada                                       | 88 ml  |
| Agitar y filtrar.                                    |        |
| c) <b>Solución 2</b>                                 |        |
| Cristal violeta (violeta de genciana)                | 5,0 g  |
| Alcohol etílico 95%                                  | 10 ml  |
| Combinar sol. 1 + sol. 2 filtrar estable tres meses. |        |

#### Método:

- Eosina Y (eosina amarillenta) 1 gr. eosina en 100 ml. de agua destilada 5 minutos.
- Lavar con agua.
- Colorear con cristal violeta 5 minutos.
- Lavar con Iodo de Gram.
- Dejar 5 minutos con Iodo de Gram (2 gr IK + 1 gr I2 en 300 ml. H2O).
- Lavar con agua.
- Secar cuidadosamente.
- Enjuagar el reverso del cubre.
- Secar al aire.
- Decolorar con anilina, xileno (1:1) hasta que no salga el color púrpura.
- Lavar con xileno.

#### Interpretación:

Esta coloración es específica para el diagnóstico de *P. jirovecii*, aunque la mayoría de las levaduras se colorean pero son fácilmente diferenciables. Las ascosporas de *P. jirovecii* se ven de color azul oscuro

### COLORACION DE KINYOUN

- |  |        |
|--|--------|
| a) Fucsina carbónica de Kinyoun  |        |
| Fucsina básica   | 4 g    |
| Cristales de fenol   | 20 g   |
| Alcohol 95°  | 20 ml  |
| AD   | 100 ml |
| Filtrar antes de usar y guardar a temperatura ambiente en frasco color caramelo.   |        |
| b) Alcohol etílico 50%   |        |
| c) Solución acuosa de ácido sulfúrico al 1% (v:v)  |        |
| d) Solución acuosa de Azul de Metileno 1%  |        |
| <i>Nocardia asteroides</i> , <i>N. brasiliensis</i> y <i>N. caviae</i> retienen la carbolfucsina cuando se decolora con ácido sulfúrico al 1%. |        |

#### Método:



- Fijar los frotis del material clínico o el disgregado del cultivo con calor.
- Cubrir con fucsina carbólica durante 5 minutos.
- Lavar con agua.
- Lavar con alcohol etílico 50% hasta quitar el exceso de colorante.
- Lavar con agua.
- Lavar con solución acuosa de Acido Sulfúrico 1%.
- Cubrir con Azul de Metileno 1% durante un minuto.
- Lavar con agua y dejar secar.

\*Es necesario colorear un control positivo y otro negativo para detectar fallas en la coloración.

#### Interpretación:

Las *Nocardia* spp. se observan como hifas muy finas, de menos de 2 micras de ancho, que se tiñen de color rojo, pueden verse también como filamentos parcialmente ácido-resistentes. Frecuentemente la tinción es irregular. Suelen observarse formas ramificadas.

#### COLORACIÓN DE ZIEHL-NEELSEN:

Esta coloración se usa para detectar bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR) pero tiñe las *Nocardia* spp. parcialmente. No se utiliza para observar hongos.

#### Método:

Es el mismo que se utiliza en los laboratorios de bacteriología de la tuberculosis.

#### Interpretación:

Se utiliza para descartar tuberculosis asociada a micosis. Las *Nocardia* spp. se observan como bacterias filamentosas ramificadas que se tiñen de fucsia total o parcialmente; suelen observarse filamentos en cuentas de rosario, con puntos rojos alineados dentro de filamentos azules. La presencia de filamentos sospechosos de *Nocardia* spp. debe confirmarse con la coloración de Kinyoun.

#### COLORACIÓN DE METENAMINA DE PLATA

##### Solución de ácido crómico al 5%:

Ácido crómico (CrO <sub>3</sub> )	5 g
Agua destilada	100 ml

##### Solución de metanamina al 3%:

Hexametilentetramina USP-(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> N <sub>4</sub>	3 g
Agua destilada	100 ml

##### Solución madre de metanamina-nitrato de plata:

Nitrato de plata al 5%	5 ml
Metanamina al 3%	100 ml

Se forma un precipitado blanco que se disuelve inmediatamente al agitar. La solución se puede usar durante meses si se conserva en la heladera.

##### Solución de bisulfito sódico al 1%:

Bisulfito sódico (NaHSO <sub>3</sub> )	1 g
Agua destilada	100 ml

##### Solución de tiosulfato sódico al 1%:

Tiosulfato sódico (Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 5H <sub>2</sub> O)	2 g
Agua destilada	100 ml

##### Solución de trabajo de verde luz:

Solución madre de verde luz	10 ml
Agua destilada	100 ml

Esta solución se mantiene estable durante un mes.

##### Nitrato de plata al 5%:

Nitrato de plata (AgNO <sub>3</sub> )	5 g
Agua destilada	100 ml

##### Solución de trabajo de metanamina-nitrato plata:

Solución de borax al 5%	2 ml
Agua destilada	25 ml
Mezclar y añadir:	
Solución madre de metanamina nitrato de plata	25 ml

**ATENCIÓN:** Esta solución de trabajo (de metanamina-nitrato de plata) debe prepararse de nuevo cada tinción. No intente reutilizarla ni en una tinción que se haga inmediatamente después de la primera.

##### Solución de cloruro de oro al 0.2 %:

Cloruro de oro 1% (AuCl <sub>3</sub> HCl 3H <sub>2</sub> O)	10 ml
Agua destilada	40 ml

Esta solución puede reutilizarse muchas veces. Sin embargo, debe cambiarse cuando se oscurece y los organismos teñidos se ven demasiado oscuros.

**NOTA:** La solución de cloruro de oro al 1% viene en ampollas y se diluye siguiendo las instrucciones que se adjuntan.

##### Solución madre de verde luz:

Verde luz S.F. (amarillo)	0.2 g
Agua destilada	100 ml
Acido acético glacial (CH <sub>3</sub> -COOH)	0.2 ml

#### Método:

- El material a teñir se extiende en un portaobjetos y se deja secar al aire. Los tejidos deben ser triturados y después extendidos en un portaobjetos; o bien preparar improntas de los cortes de tejidos.
- Las extensiones secas se llevan a alcohol absoluto durante cinco minutos. Fíjese a la vez una extensión de control (levaduras o *Pneumocystis*).
- Mientras las preparaciones se están fijando, llenar un frasco Coplin (con tapón) de ácido crómico al 5%. Preparar la metanamina de plata en un frasco Coplin de tapón a rosca.



- Introducir las preparaciones ya fijadas en el ácido crómico y poner ambos frascos Coplin en un "baño María" a 40°C. Dos minutos después, pasar el frasco del ácido crómico a otro baño que esté a 56°C durante 10 minutos.
- Enjuagar brevemente las preparaciones.
- Sumergir la preparación durante treinta segundos en el bisulfito sódico al 1%.
- Enjuagar al chorro del grifo durante quince segundos.
- Enjuagar cuatro veces en agua destilada.
- Sumergir las preparaciones en la metenamina de plata que estaba a 40 °C durante dos minutos. Pasar el frasco al baño de 56°C durante veinticinco minutos o algo menos.
- Revisar a los veinte minutos la preparación control para ver si se han teñido los organismos. Para revisar la preparación control, lleve ésta y las preparaciones del paciente a un frasco Coplin lleno de agua y deje el frasco con la solución de tinción en el baño a 56°C. Ponga un cubre en la preparación control y verifique con rapidez si los organismos se han teñido bien: los hongos se tiñen de color marrón negruzco, el *P. jirovecii* se observa marrón claro con una forma de paréntesis de color marrón oscuro en el centro. Si es así continúe la coloración, si no lleve las preparaciones a la solución de tinción hasta que estén teñidas.
- Enjuagar cuatro veces las preparaciones en agua destilada.
- Contrastar con cloruro de oro al 0.2% durante un minuto.
- Enjuagar dos veces en agua destilada.
- Sumergir las preparaciones durante un minuto en tiosulfato sódico al 2%.
- Lavar las preparaciones al chorro del grifo durante quince segundos.
- Contrastar con solución verde luz durante treinta segundos.
- Enjuagar una vez en agua destilada.
- Deshidratar y aclarar con dos cambios de un minuto cada uno en etanol al 95%, etanol 100% y xileno.
- Montar las preparaciones con Permout (para su mejor conservación).

#### Interpretación:

Los hongos levaduriformes se ven de color marrón oscuro a negro con los bordes bien definidos. Las hifas se ven de color marrón más claro (depende del tiempo de contacto con la metenamina de plata) sobre un fondo verde pálido.

El *Pneumocystis jirovecii* se ve con la pared ligeramente teñida, normalmente de color parduzco o grisáceo. A menudo se observan las estructuras descriptas como "paréntesis" teñidas de negro. El mucus se ve de color pardo grisáceo a gris oscuro.

#### **COLORACION DE PAS (ÁCIDO PERYÓDICO DE SCHIFF) MODIFICADO PARA FROTIS**

##### **Solución A:**

Ácido peryódico	5.0 g
Agua destilada	100 ml

Guardar en recipiente color caramelo.

##### **Solución B:**

Fucsina básica	0.1 g
Agua destilada	95 ml
Alcohol etílico	5 ml

(Primero agregar el alcohol al agua y luego a la fucsina, esta se disuelve con dificultad).

##### **Solución C:**

Bisulfito de sodio (S <sub>2</sub> O <sub>5</sub> Na)	1.0 g
(Metasulfito de sodio)	
Acido clorhídrico 1 M	10 ml
Agua destilada	190 ml

##### **Solución D:**

Cristales de verde brillante	0.2 g
Acido acético glacial	2 ml
Agua destilada	100 ml

#### Método:

- Sumergir el frotis en alcohol absoluto 1 minuto.
- Sacar el alcohol y colocar en Sol. A, 5 minutos.
- Lavar en agua corriente 2 minutos.
- Colocar en Sol. B, 2 minutos.
- Lavar con agua corriente 2 minutos.
- Colocar en Sol. C, de 3 a 5 minutos.
- Lavar durante 5 minutos.
- Colocar en Sol. D, 5 minutos.
- Lavar con agua corriente durante algunos segundos.
- Deshidratar y montar con Permout, si es necesario.

#### Interpretación:

En esta coloración los hongos se ven de color rojizo sobre un fondo verde brillante, esto depende del contracolorante usado.

#### **MEDIOS DE CULTIVO**

##### **AGAR CASEINA**

##### **Solución A**

Leche descremada	5 g
AD csp	50 ml

Esterilizar a 118°C 20 minutos

##### **Solución B**

Agar	1 g
AD csp	50 ml

- Esterilizar a 121°C durante 15 minutos.
- Mezclar las soluciones A y B antes de que solidifique el agar (a 45°C) y fraccionar a razón de 20 ml por placa de Petri.



#### AGAR CZAPEK

Sacarosa	30 g
Nitrato de sodio	3 g
Fosfato dibásico de potasio	1 g
Sulfato de magnesio x 7 H <sub>2</sub> O	0,5 g
Cloruro de potasio	0,5 g
Sulfato de hierro x 7 H <sub>2</sub> O	10 mg
Agar	15 g
AD csp	1000 ml

- Disolver el agar en agua destilada a BM y una vez fundida agregar las sales, mezclar y adicionar la sacarosa agitando hasta disolución completa.
- Distribuir en tubos de ensayo a razón de 7 ml y esterilizar a 121°C 15 minutos.

#### AGAR EXTRACTO DE MALTA (MEA) 2%

Extracto de Malta	20 g
Agar	15 g
AD csp	1000 ml

- Disolver calentando a BM.
- Ajustar el pH a 5,5.
- Distribuir en tubos. Autoclavar a 121° 15 min.
- Dejar enfriar en bisel.

#### CZAPECK CONCENTRADO

NaNO <sub>3</sub>	30 g
KCl	5 g
MgSO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O	5 g
FeSO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O	0,1 g
ZnSO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O	0,1 g
CuSO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O	0,05 g
Agua Destilada	100 ml

Normalmente esta solución precipita y debe agitarse antes de su uso.

#### CZAPECK EXTRACTO DE LEVADURA (CYA)

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 g
Czapeck Concentrado	10 ml
Extracto de Levadura	5 g
Sacarosa	30 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 ml

- Esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

#### AGAR INFUSIÓN CEREBRO CORAZÓN (BHI)

Utilizar el medio comercial de DIFCO u otra marca de calidad. Esterilizar y fraccionar a razón de 7 ml por tubo y dejar solidificar en bisel. Controlar la esterilidad.

#### AGAR INFUSIÓN CEREBRO CORAZÓN CON SANGRE DE OVEJA AL 5%

Utilizar el medio comercial DIFCO u otra marca conocida. Esterilizar, dejar enfriar hasta 48 °C, agregarle la sangre, homogeneizar y distribuir estérilmente a razón de 8 ml por tubo y dejar solidificar en bisel. Controlar la esterilidad.

#### AGAR SABOURAUD - CLORANFENICOL

Al agar Sabouraud glucosado se le agregan 250 mg de cloranfenicol (Deltamicetina) disuelto en 10 ml de alcohol etílico 95°. Esterilizar a 121 °C, 15 minutos.

#### AGAR SABOURAUD - CLORANFENICOL - CICLOHEXIMIDA

Al agar Sabouraud glucosado se le agregan 250 mg de cloranfenicol (deltamicetina) disuelto en 10 ml de alcohol etílico 95° y 400 mg de cicloheximida (Actidione) disuelta en 10 ml de acetona. Esterilizar a 121 °C durante 15 minutos.

#### AGAR SABOURAUD DE EMMONS

Glucosa	20 g
Bacto Peptona o Polipeptona	10 g
Agar	17 g
AD csp	1000 ml

- Fundir el agar en el agua en BM.
- Agregar la glucosa y la peptona y homogeneizar.
- Ajustar el pH a 6,9.
- Fraccionar a razón de 7 ml por tubo y esterilizar a 121°C durante 15 minutos.
- Dejar enfriar en bisel.

#### AGAR PAPA GLUCOSADO (PDA)

Papas peladas, lavadas y cortadas	75 g
Glucosa	20 g
Agar	15 g
Agua destilada csp	1000 ml

- Pelar papa y cortar en daditos
- Agregarle 800 ml de agua destilada y hervir hasta que la papa se deshaga.
- Filtrar la pasta a través de gasa (dos o tres capas).
- Llevar el líquido hasta 1000 ml.
- Agregar 15 g de agar, 20 g de glucosa y fundir a BM.
- Fraccionar y esterilizar en autoclave 15 min a 121 °C.

#### AGAR SABOURAUD GLUCOSADO

Glucosa	40 g
Peptona	10 g
Agar	15 g
AD csp	1000 ml

- Fundir el agar en el agua en BM.
- Agregar la glucosa y la peptona y homogeneizar.



- Ajustar el pH a 5,5-5,6.
- Fraccionar a razón de 7 ml por tubo y esterilizar a 121 °C durante 15 minutos.
- Dejar enfriar en bisel.

#### MEDIO BIFASICO PARA CULTIVO DE SANGRE

##### a) Agar

Disolver el agar Agar Infusión Cerebro Corazón (BHI) y una vez fundido fraccionarlo a razón de 20 ml en botellas de 100 ml con tapa.

Autoclavar a 121°C durante 15 minutos y dejar enfriar en posición inclinada.

##### b) Caldo

Al día siguiente de la preparación del agar, preparar el caldo BHI, esterilizarlo y agregar a razón de 25 ml al frasco con agar. Colocar estérilmente la tapa de goma y la virola de aluminio. El pH final del medio de cultivo es de 7,4.

#### PREPARACIONES MICROSCÓPICAS PARA EL EXAMEN DE CEPAS

#### DISGREGADO DE CULTIVOS CON LACTOFENOL AZUL DE ALGODÓN O AZUL DE ANILINA (LF-AA)

Cristales de fenol	20	g
Acido láctico	20	ml
Glicerina	40	ml
Agua destilada (AD)	20	ml
Azul de algodón (solución acuosa 1%)	2	ml

- Agregar el ácido láctico y la glicerina al agua destilada y mezclar.
- Agregar los cristales de fenol y mezclar. Calentar suavemente en baño maría (BM) con frecuente agitación hasta disolución completa de los cristales de fenol.
- Agregar 2ml de una solución acuosa al 1% de azul de algodón (azul de Poirrier) y homogeneizar.

Es un método rápido para observación de la micromorfología de los aislamientos fúngicos. El reactivo contiene Lactofenol para matar la cepa, glicerina para evitar la desecación, colorante para teñir la pared de los hongos y ácido Láctico para clarificar el preparado.

##### Procedimiento:

- Colocar una gota de LF-AA sobre un portaobjetos limpio.
- Colocar un trozo de colonia, preferentemente del área granular, sobre la gota de colorante.
- Disgregar el material con dos agujas de disección.
- Cubrir con un cubreobjetos presionando suavemente y evitando la formación de burbujas de aire.

- Si quedó agar en el preparado se puede calentar suavemente, esto también ayuda a eliminar las burbujas de aire.
- Examinar al MO con luz reducida y objetivos de bajo y mediano aumento.

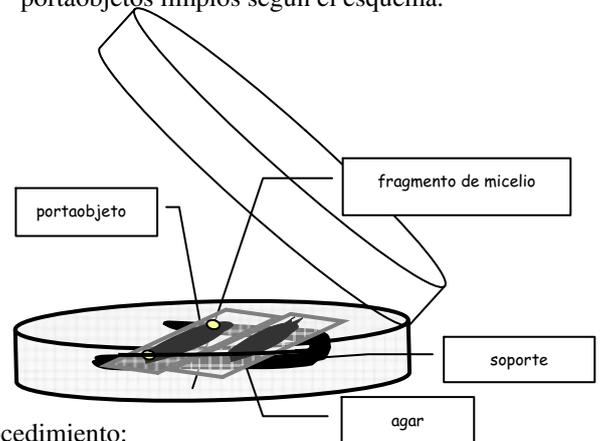
\*Si se desean conservar los preparados, se limpia el borde del cubreobjetos con un hisopo humedecido con alcohol 70%, se deja secar y se sella con esmalte de uñas o líquido de montaje para preparaciones permanentes (PERMOUNT, etc.).

#### CULTIVO EN LÁMINA O MICROCULTIVO PARA EL ESTUDIO MICROSCÓPICO DE CEPAS

Este método permite observar las características micromorfológicas de los hongos sin alterarlas, haciendo posible visualizar exactamente la disposición de sus estructuras, en particular aquellas que se destruyen fácilmente con la manipulación del cultivo, como ser la disposición de los conidios y los conidióforos dentro del micelio de reproducción.

##### Preparación de las placas para microcultivo:

- Forrar el fondo de las placas con un papel de filtro.
- Colocar sobre el papel una varilla de vidrio doblada en U y depositar sobre ella dos portaobjetos limpios según el esquema.



##### Procedimiento:

- Fundir el agar Sabouraud u otro que se considere adecuado.
- Con un ansa que termine en un anillo de aproximadamente 7 mm de diámetro, sacar estérilmente una gota del medio de cultivo y distribuirla formando un círculo en el centro del portaobjetos de la placa de microcultivo; repetir el procedimiento con el otro portaobjetos.
- Con un ansa en forma de espátula doblada en ángulo recto, transferir fragmentos de cultivo de uno a dos mm al medio de cultivo del portaobjetos, colocando un fragmento de micelio en cada borde.



- Con una pinza estéril invertir los portaobjetos teniendo cuidado de no tocar el borde de la U con el inóculo.
- Agregar agua destilada estéril en el fondo de la placa de Petri (controlar que no se seque durante la incubación).
- Incubar a 25 -28 °C durante 15 a 20 días. Controlar el desarrollo y la producción de las estructuras características (conidióforos, conidios, etc.) mediante examen microscópico.
- Una vez desarrolladas las estructuras características, o a los 30 días, matar el cultivo agregando dos o tres gotas de formol a la placa. Dejar actuar 24-48 hs a temperatura ambiente.
- Volcar el líquido y dejar secar durante 24 hs. a 37 °C.
- Pasar el preparado por Colodión, limpiar los bordes y el reverso del portaobjetos y dejar secar dentro de la placa 24 hs (el Colodión se utiliza para fijar las estructuras cuando se desea hacer preparados permanentes, pero puede obviarse).
- Colocar una gota de LF-AA sobre un cubreobjetos y cubrir el cultivo.
- Observar al microscopio.

**SI SE DESEAN PREPARADOS PERMANENTES, LIMPIAR LOS BORDES DEL CUBREOBJETOS CON UN HISOPO CON ALCOHOL Y LUEGO SELLAR CON ESMALTE DE UÑAS.**

#### PRUEBAS PARA IDENTIFICACIÓN PRESUNTIVA DE LEVADURAS

##### CRECIMIENTO A 37°C

Algunos hongos y levaduras pueden crecer bien a 25°C y a 37°C lo que permite identificarlos. Generalmente un hongo que no crece a 37°C es un contaminante, en cambio si puede hacerlo es probable que actúe como oportunista invasor.

##### Procedimiento:

- Sembrar la cepa en dos tubos de Agar Sabouraud e incubar una a 25 °C y otra a 37 °C.
- Observar el tubo a 37°C a los cuatro días y luego semanalmente hasta que se observe crecimiento en el tubo control a 25 °C.
- El resultado es positivo cuando se observa igual o mayor desarrollo en el tubo a 25°C que en el de 37°C.

#### PRUEBAS PARA IDENTIFICACIÓN PRESUNTIVA DE *CANDIDA ALBICANS*

##### PRODUCCIÓN DE TUBO GERMINATIVO

Esta prueba es considerada hasta el presente como una de las más confiables para identificar presuntivamente *C. albicans*, tiene una sensibilidad entre 95 – 100 % cuando se compara con la identificación convencional.

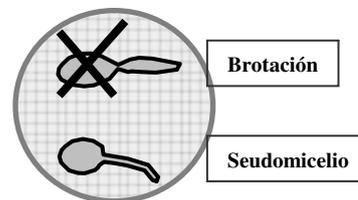
##### Procedimiento:

Hacer una suspensión ligera (100.000 a 1.000.000 de células/ml) de un cultivo de 24 h de la cepa en estudio en 0,5 ml de suero bovino. La suspensión puede hacerse tocando la superficie de una colonia con la punta de una pipeta Pasteur estéril y luego emulsionando suavemente las células adheridas a la pipeta en el suero.

Incubar a 37°C y observar microscópicamente cada media hora, hasta las tres horas. Es necesario inocular simultáneamente un testigo positivo (*C. albicans*) y uno negativo (*C. guilliermondii* u otra).

##### Interpretación:

El tubo germinativo se ve como una proyección miceliales delgada, que no presenta constricción en el punto de origen.



37 °C  
NO más  
de 3 horas

##### PRODUCCIÓN DE CLAMIDOSPORAS

La formación de clamidosporas en "cultivo naciente" es característica de *C. albicans*. Son esporas de resistencia, redondas, refringentes, de pared engrosada y ricas en lípidos.

##### Medio de bilis de Feo

Bilis (Bacto Oxgall)	20	g
Agar	1	g
Cloranfenicol	250	mg
AD c.s.p.	1000	ml

- Disolver los 250 mg de cloranfenicol en 10 ml de alcohol etílico 96°.
- Mezclar los componentes y fundir en BM.
- Ajustar el pH a 6-7.
- Fraccionar a razón de 3 ml por tubo de 13 x 100 mm.
- Esterilizar a 121° 15 minutos.

##### Agar harina de maíz (Para observación de clamidosporas)

Harina de maíz amarillo	12,5	g
Agar	3,8	g
AD csp	300	ml

- Disolver la harina en 300 ml de agua destilada calentando en BM a 60°C durante 1 hora.
- Filtrar a través de papel y llevar a volumen con agua destilada.
- Agregar el agar y autoclavar a 121 °C 5 minutos.
- Sin dejar enfriar volver a filtrar a través de algodón y fraccionar.



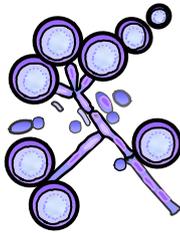
- Esterilizar 15 minutos a 121 °C.

Procedimiento:

- Inocular con un cultivo en crecimiento activo un tubo de medio semisólido de Bilis de Feo o el agar harina de maíz.
- Incubar a 25°C-28°C durante 48 hs. y observar; si es negativo dejar hasta 5 días. Pasado este lapso de tiempo el ensayo no es apto para identificar presuntivamente a *C. albicans* ya que en cultivos viejos otras levaduras pueden formar clamidosporas (por ejemplo *T. cutaneum*).

Interpretación:

Esta prueba es positiva en el 68% de las cepas de *C. albicans* y sólo tiene un error del 3% respecto a la incorrecta identificación de otra levadura no *C. albicans*.

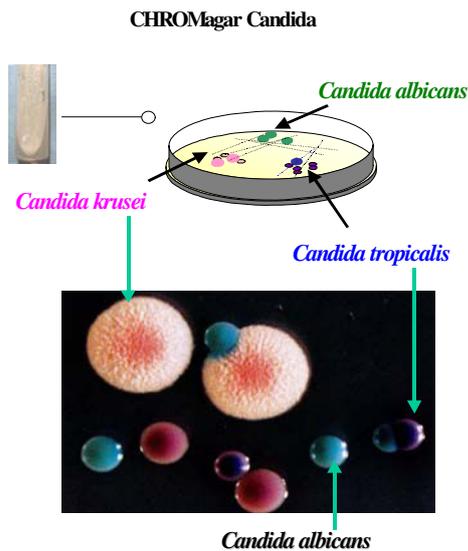


---

MÉTODOS COMERCIALES PARA IDENTIFICACIÓN DE LEVADURAS

---

**IDENTIFICACIÓN PRESUNTIVA**



---

**PRUEBAS PARA IDENTIFICACIÓN PRESUNTIVA DE CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS**

---

**AGAR SEMILLA DE GIRASOL (para identificación del complejo *C. neoformans*)**

Este medio es equivalente al de ácido caféico o al de semillas de Niger (Staib).

Glucosa	10	g
Creatinina	780	mg
Cloranfenicol	50	mg
Difenilo	100	mg
Extracto de semillas de Girasol	200	ml
Agar	20	g
AD c.s.p.	1000	ml

- Disolver el agar en 800 ml de agua destilada en BM, una vez fundido agregar el resto de los componentes y homogeneizar.
- Autoclavar a 121°C 15 minutos y distribuir en placas de Petri a razón de 20 ml.

**Extracto de semillas de Girasol**

Pulverizar 140 gramos de semillas de Girasol en mortero y agregar 350 ml de AD, autoclavar 10 minutos a 121°C y filtrar a través de gasas.

Las levaduras del complejo *C. neoformans* produce un pigmento marrón en el agar semillas de girasol a temperatura ambiente. Este efecto también se observa en el medio de ácido caféico debido a la actividad fenoloxidasas localizada en la pared celular de este hongo. Ninguna otra especie de este Género, ni otras levaduras poseen esta propiedad y por lo tanto no producen color marrón en estos medios.

Procedimiento:

- Dividir la placa del medio de cultivo en dos sectores, sobre uno de ellos estriar la cepa incógnita y sobre el otro la cepa control positivo.
- Incubar la placa a 25°C-28°C durante tres días o hasta que el testigo adquiera color marrón.

Interpretación:

El ensayo se considera positivo cuando la cepa en estudio adquiere color marrón y es más oscuro que el del que desarrolló sobre el agar Sabouraud.

**Agar urea de Christensen**

Peptona	1	g
Cloruro de sodio	5	g
Glucosa	5	g
Fosfato ácido de potasio	2	g
Urea	20	g
Rojo de fenol	12	mg
AD c.s.p.	100	ml



- Disolver todos los componentes en los 100 ml de agua destilada y esterilizar por filtración.
- Disolver 20 gramos de agar en 900 ml de agua destilada y esterilizar a 121°C 15 minutos.
- Enfriar a 55- 60°C el agar y agregarle la primera solución.
- Mezclar y distribuir estérilmente a razón de tres ml por tubo de 13x100 mm con tapa a rosca.

#### PRODUCCIÓN DE UREASA POR LEVADURAS DEL COMPLEJO *C. NEOFORMANS*

Las levaduras del complejo *C. neoformans* y otras especies de *Cryptococcus* e incluso otras levaduras producen ureasa, sin embargo, *C. albicans* y especies del género *Candida* no la producen.

Esta característica permite detectar fácilmente las cepas sospechosas.

El medio de urea que se usa contiene rojo de fenol, que vira al color rojo cuando se hidroliza la urea y se libera amonio alcalinizando el medio de cultivo.

#### Procedimiento:

- Estriar la cepa incógnita en el medio de cultivo y simultáneamente sembrar una cepa testigo.
- Incubar a 25°C-28°C durante tres días y observar el cambio de color del indicador.

#### Interpretación:

Se interpreta como positiva la aparición de color rojo magenta en el medio de cultivo donde se inoculó la cepa. Si el color original no se modifica o se torna amarillo la prueba es negativa.

Es necesario asegurar la pureza de la cepa en estudio ya que las bacterias pueden producir ureasa.

### IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE *MALASSEZIA*

#### MEDIO DE DIXON

Extracto de malta	3,6 g
Peptona	0,6 g
Bacto Oxgall	2 g
Tween 40	1 g
Glicerol	0,5 g
Agar	1,5 g
Agua c.s.p.	100 ml

- Fundir el agar en el agua en BM.
- Agregar la glucosa, la peptona, el Bacto Oxgall el tween y el glicerol. Homogeneizar.
- Fraccionar a razón de 7 ml por tubo y esterilizar a 121°C durante 20 minutos.
- Dejar enfriar en bisel.

#### AGAR SABOURAUD ADICIONADO CON BILIS DE BUEY (PARA *MALASSEZIA FURFUR*)

Glucosa	20 g
Peptona	10 g
Agar	15 g
Cicloheximida	400 mg
Cloranfenicol	250 mg
Bilis de buey (Bacto oxgall)	20 g
AD c.s.p.	1000 ml

- Fundir el agar en el agua en BM.
- Agregar la glucosa, la peptona y la bilis de buey. Homogeneizar.
- Fraccionar a razón de 7 ml por tubo y esterilizar a 121 °C durante 20 minutos.
- Dejar enfriar en bisel.

#### SABOURAUD GLUCOSADO ADICIONADO CON ACEITE DE OLIVA EN LA SUPERFICIE

Este medio, solo debe utilizarse excepcionalmente, y cuando no haya posibilidad de utilizar ninguno de los anteriores descritos para las especies lipofílicas. No permite recuperar eficientemente todas las especies de *Malassezia*.

Las características morfológicas, y la necesidad de ácidos grasos para su crecimiento en 6 de las 7 especies, son las características fundamentales del género.

La nueva clasificación de *Malassezia* plantea la necesidad de conocer el rol que jugaría cada una de las diferentes especies del género en relación a su capacidad de producir desde infecciones superficiales hasta sistémicas. Lo importante es sospechar su presencia como agente emergente en infecciones intrahospitalarias y utilizar medios adecuados de cultivo para su recuperación y posterior identificación.



Resumen de las principales pruebas bioquímicas utilizadas para la identificación de *Malassezia*.

	Crecimiento en SDA 32 °C		Crecimiento en Dixon				Utilización del Tween:			
	Catalasa	Esculina	32 °C	37 °C	40 °C	20 (10%)	40 (0,5%)	60 (0,5%)	80 (0,1%)	
<i>M. dermatis</i>	+	-	+	+	+	+	+	+	+	
<i>M. furfur</i>	+	-	+	+	+	+	+	+	+	
<i>M. globosa</i>	+	-	+	+/- o -	-	-	-	-	-	
<i>M. japonica</i>	+	-	+	+	-	+/-	+	+	-	
<i>M. nana</i>	+	-	+	+	+/-	+/-	+	+	+/-	
<i>M. obtusa</i>	+	-	+	+	-	-	-	-	-	
<i>M. pachydermatis</i>	+/- o +	+	+	+	+	+	+	+	+	
<i>M. restricta</i>	-	-	+	+	-	-	-	-	-	
<i>M. slooffitiae</i>	+	-	+	+	+	+/- o +	+	+	-	
<i>M. sympoditais</i>	+	-	+	+	+	-	+	+	+	
<i>M. yamatoensis</i>	+	-	+	+	-	+	+	+	+	

+, positivo, -, negativo, +/-, positivo débil

## PRUEBAS PARA IDENTIFICACIÓN DE HONGOS DIMORFOS Y MICELIALES

### CULTIVO EN LÁMINA PARA HONGOS MICELIALES (MICROCULTIVO)

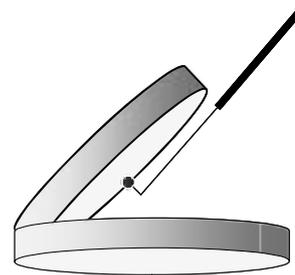
Si bien este método permite una buena visualización de las características micromorfológicas de los hongos, es utilizada frecuentemente para identificación de hongos miceliales y poco utilizada para hongos dimorfos por razones de bioseguridad.

### COLONIA GIGANTE

Esta técnica junto con el microcultivo es lo que nos permite ingresar en claves de identificación de hongos miceliales. Es poco utilizada para hongos dimorfos por razones de bioseguridad.

### Procedimiento:

- Utilizar una placa de Petri con agar Sabouraud o el medio de cultivo que considere adecuado. Dejar secar la superficie del agar.



- Inocular estérilmente, con un pequeño fragmento de la cepa en estudio, el centro de la superficie del agar, tratando que quede bien adherida.
- Sellar los bordes de la placa con cinta adhesiva para evitar la entrada de esporas del aire.
- Incubar la placa en posición invertida durante 4 a 7 días para Zygomycetes y 7 a 14 días para el resto, o hasta que la colonia cubra las 2/3 partes de la placa.
- Observar con lupa o directamente sin destapar la placa. Si es necesario destapar la placa, mate el cultivo agregando una o dos gotas de formol en la tapa de la placa invertida, sin que éste caiga sobre la colonia y déjelo actuar durante 24-48 h.

Es necesario recalcar que se ha establecido que los agentes antes conocidos como *Pityrosporum* han sido ubicadas en el Género *Malassezia*, por lo tanto en los informes debe adoptarse el nombre *Malassezia*, se vea o no micelio en el examen directo.

Actualmente, el género continúa en revisión y se están describiendo nuevas especies asociadas a patologías humanas y de animales.

Es necesario mantener las placas en la misma posición mientras desarrolla la colonia para evitar que las esporas se diseminen y al germinar formen colonias satélites que puedan perjudicar el desarrollo pleno de la colonia central.

No usar nunca para hongos dimórficos.



### Interpretación:

La colonia gigante o macrocolonia permite determinar la velocidad de crecimiento del hongo, el diámetro alcanzado, el perfil y los bordes, la textura, el color de la superficie y del reverso, la formación del pigmento difusible, etc.

La observación y medición de la colonia, puede complementarse con el estudio de la cepa bajo la lupa para observar con mas precisión la textura de la colonia, la presencia de exudado, etc.

El estudio de las características macromorfológicas de la colonia gigante juntamente con las características microscópicas del cultivo permiten diferenciar e identificar los diferentes géneros y especies de hongos miceliales; en algunos casos estas características no son suficientes y es necesario recurrir a pruebas tales como hidrólisis de la gelatina, crecimiento a diferentes temperaturas y/o requerimientos nutricionales.

Las posibilidades para las características que puede presentar la colonia se muestran en la **página 102**.

### **TOLERANCIA A LA CICLOHEXIMIDA (ACTIDIONE).**

Esta prueba se realiza para identificar presuntamente los hongos patógenos primarios.

### Procedimiento:

- Inocular la cepa en estudio sobre el medio de cicloheximida y SGAE (control).
- Incubar a temperatura ambiente hasta que se observe desarrollo en el tubo SGAE por un período máximo de cuatro semanas.
- Observar el cultivo y comparar con el control.
- Se considera tolerante a la cicloheximida la cepa que crece en su presencia, tal como el *H.capsulatum*, *Coccidioides* sp., *B. dermatitidis*, *P. brasiliensis*, *C. albicans* y *Sporothrix schenckii* que crecen a 28°C en presencia de ésta. *P. boydii*, *Aspergillus* sp., *C. neoformans*, *T. glabrata* y los actinomicetes aeróbicos son inhibidos.

### **GELATINA AL 12% PARA DEMOSTRAR ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA (HIDRÓLISIS DE LA GELATINA).**

Extracto de carne	3	g
Peptona	5	g
Gelatina	120	g
AD c.s.p.	1000	ml

- Disolver los ingredientes a BM.
- Ajustar el pH a 7
- Fraccionar 8 ml por tubo de ensayo.
- Esterilizar en autoclavar 15 minutos a 121°C.

### Procedimiento:

- Inocular un tubo con pequeño fragmento de colonia de la cepa en estudio, un control positivo (*Cladosporium* spp.) y un control negativo (*F. pedrosoi*).
- Simultáneamente inocular un tubo de SGAE con los controles y la cepa en estudio.
- Incubar a 25 – 28 °C y examinar semanalmente
- Cuando se observe desarrollo en la superficie del medio de cultivo transfiera los tubos a la heladera (4 - 10 °C).

### Interpretación:

El ensayo se considera negativo cuando los tubos una vez incubados a 4-10 °C no muestran degradación de la gelatina. Las especies saprófitas del género *Cladosporium* son proteolíticas y licúan la gelatina y el suero de Loeffler. Las especies patógenas de este género no tienen actividad proteolítica. La observación debe realizarse hasta las cuatro semanas.

### **CRECIMIENTO A 37 °C**

Igual al detallado para levaduras.

### **CONVERSIÓN DE ARTROCONIDIOS A LA FORMA DE ESFÉRULAS DE COCCIDIOIDES SP.**

Este hongo puede convertirse a su forma parasítica sobre medios definidos a 40°C y con una atmósfera de 20% de CO<sub>2</sub>. La conversión también se logra por inoculación experimental.

### **AGAR BASE PARA PRUEBA DE CONVERSIÓN DE ARTROCONIDIAS A ESFÉRULAS DE COCCIDIOIDES SP.**

Ionagar N°2 o agar purificado	10	g
AD c.s.p.	1000	ml

- Mezclar el agar con el agua y dejar estacionado durante 15 minutos.
- Disolver en BM hasta fusión completa.
- Fraccionar a razón de 10 ml en tubos con tapa a rosca.
- Esterilizar a 121°C 15 minutos y dejar enfriar en bisel.

### **Medio líquido de converse**

Glucosa 1M	22	ml
Acetato de amonio 1M	16	ml
Fosfato monopotásico 1M	3.75	ml
Fosfato dipotásico 1M	3	ml
Sulfato de magnesio 1M	1.6	ml
Sulfato de Zinc 0.01M	1.24	ml
Cloruro de sodio 0.01M	24	ml
Bicarbonato de sodio 0.01 M	14	ml
Cloruro de calcio 0.01 M	2	ml
AD c.s.p.	1000	ml

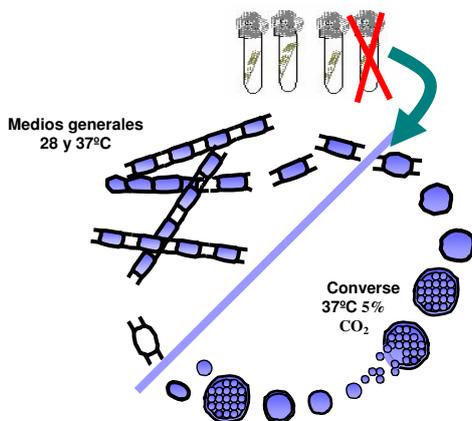
- Dispensar a razón de 10ml en tubos con tapa a rosca.



- Autoclavar a 120 °C 15 minutos.
- El pH final es 6,6.

#### Procedimiento:

- Inocular cuatro estrías de agar extracto de levadura glucosa con la cepa en estudio e incubar a temperatura ambiente durante diez a catorce días.
- Matar uno de los cuatro cultivos con formol 40% durante 24 horas a temperatura ambiente.
- Observar el cultivo con LFAA para determinar la presencia de arthroconidios. Si aún no se formaron continuar incubando y repetir la observación sobre otra cepa muerta hasta la cuarta semana.
- Si hay arthroconidios, preparar una suspensión, de la cepa viva, agregando varias gotas del líquido de Converse sobre la superficie de la colonia.
- Recoger la suspensión con una pipeta Pasteur e inocular con ella cuatro tubos con el medio base.
- Incubar a 40 °C en atmósfera de 15-20 % de CO<sub>2</sub> de una a cuatro semanas.
- Matar semanalmente un tubo del medio completo de conversión y observar hasta desarrollo de las esférulas.
- Si a las cuatro semanas el ensayo es negativo se debe repetir hasta tres veces.



**Todas las técnicas en donde se trabaje con hongos dimorfos deben realizarse dentro de un equipo de seguridad biológica clase II.**

#### CONVERSIÓN DE LA FASE MICELIAL A LEVADURIFORME PARA IDENTIFICACIÓN DE HONGOS DIMORFOS

*Histoplasma capsulatum*, *P. brasiliensis*, *B. dermatitidis* y *S. schenckii* pueden ser convertidos desde la fase micelial a la levaduriforme por cultivo a 35°C en medios enriquecidos.

#### Procedimiento:

- Sembrar un pequeño fragmento del hongo en estudio en agar BHI-S y en AGS-E.

- Incubar el BHI-S a 35°C en atmósfera de 10% de CO<sub>2</sub> y el AGS-E a 28°C (tubo control).
- Examinar semanalmente hasta observar desarrollo y luego al microscopio en busca de células brotantes, hasta la cuarta semana.

#### Interpretación:

Cuando la forma levadura está presente se confirma el dimorfismo por reconversión de la colonia a la fase micelial. Si sólo se observan hifas es necesario repetir el procedimiento tres veces antes de considerar que el hongo es monomorfo. Es necesario aclarar que la conversión de la fase micelial a levaduriforme puede ser extremadamente difícil de lograr "in vitro", por lo cual, a veces la inoculación experimental se hace imprescindible.

#### CONVERSIÓN DE LA FASE LEVADURIFORME A MICELIAL PARA CONFIRMAR LA IDENTIFICACIÓN DE HONGOS DIMORFOS

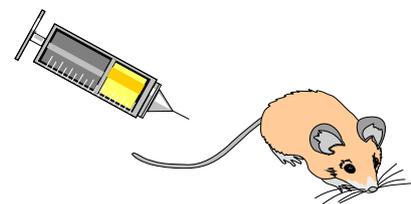
Esta prueba se realiza para descartar la posibilidad de identificar erróneamente como hongo dimorfo a las levaduras formadoras de micelio, o las que puedan estar contaminando la cepa sospechosa sujeta a ensayo de conversión micelio-levadura.

#### Procedimiento:

- Inocular la fase levaduriforme obtenida en BHI-S sobre dos estrías de AGS.
- Incubar a temperatura ambiente durante 1-4 semanas, y observar al microscopio.
- Si el aspecto microscópico de la cepa en estudio es coincidente con la fase micelial del tubo original, se confirma el dimorfismo.

#### INOCULACIÓN EXPERIMENTAL

Suele ser necesaria para demostrar la fase parasítica de los hongos.



#### Procedimiento:

- Realizar una suspensión con 5 ml de SF estéril de la cepa en estudio.
- Recoger con una jeringa y mezclar con 5 ml de mucina gástrica estéril.
- Limpiar la zona abdominal de cuatro ratones, con alcohol 70°.
- Inocular intraperitonealmente 3 ratones, con 1 ml de la suspensión antes preparada. Al cuarto ratón inocularle 1ml de SF estéril (Control de lote).



- Matar el primer ratón a los cuatro días, otro a los catorce y el último al mes.
- Preparar frotis de hígado, bazo, pulmón, corazón y riñones u otro tejido que presente alteraciones y colorearlos con MNP, PAS, HE y Giemsa.
- Sembrar varios fragmentos de cada órgano en tubos de BHI-S y AGS-C y controlar semanalmente hasta crecimiento. Descartar a los cuarenta días.

**NOTA:** LOS ANIMALES DEBEN SER CAMBIADOS DE JAULA DIARIAMENTE, Y LA CAMA DE VIRUTA SE DEBE ESTERILIZAR ANTES DE DESCARTARLA, YA QUE LA PRESENCIA DE EXUDADOS OCULARES Y NAALES, ORINA Y MATERIA FECAL PUEDEN CONTENER EL HONGO, QUE DESARROLLA SOBRE LA VIRUTA SU FASE INFECTIVA HACIÉNDOLA BIOLÓGICAMENTE PELIGROSA. LOS ANIMALES INOCULADOS DEBEN MANTENERSE AISLADOS, LEJOS DE LAS PERSONAS Y OTROS ANIMALES.

#### ANTIBIOGRAMA POR DIFUSIÓN CON DISCOS DE FLUCONAZOL

##### Inóculo

- Utilizar un cultivo de 24 h de crecimiento.
- Tomar una punta de ansa de la cepa y resuspender en un tubo con 5 ml de SF estéril.

Si se trata de una cepa del género *Candida*, se homogeneiza con vórtex y se ajusta la turbidez a 0,5 en la escala de McFarland (equivale a  $1 \times 10^6$ - $5 \times 10^6$  UFC/ml).

##### Procedimiento

- Colocar un hisopo estéril dentro de la suspensión del inóculo, embeber y rotar contra las paredes del tubo para eliminar el exceso de líquido.
- Tomar una placa de Mueller Hinton suplementado con 2% de glucosa y azul de metileno, sembrar cuidadosamente (sin presionar el hisopo) en 3 direcciones para obtener crecimiento homogéneo en toda la superficie.
- Otro método es cubrir la superficie de la placa. con 3 ml del inóculo diluido 1/10. Volcar el excedente de la placa y retirar el resto de líquido con una punta.
- Dejar que la humedad se absorba durante 10-15 minutos en estufa a 35 °C.

##### **Colocación de los discos**

- Con la ayuda de una pinza de punta fina estéril, colocar los discos sobre la superficie del agar en

forma equidistante (20 mm del borde y 40 mm entre sí).

##### **Incubación**

- Incubar las placas a 35°C durante 24 horas.
- Si luego de la incubación, los halos de inhibición no son correctamente distinguibles, puede prolongarse 24 horas más, ejemplo: *Candida parapsilosis*.

##### **Lectura**

- Medir con regla el diámetro del halo externo de la zona de inhibición.

La zona a medir es la definida por las colonias con diámetro normal, si dentro de esta zona hubiere y colonias con crecimiento inhibido, con un diámetro menor al de las colonias externas, estas colonias no deben ser consideradas mutantes resistentes.

##### Interpretación de los resultados

Los puntos de corte **presuntivos** establecidos por el Departamento de Micología del Instituto Malbrán (por recta de regresión) son los siguientes:

Discos (Malbrán)	Diámetro del halo en mm (CON AZUL DE METILENO)		
	Sensible	SDD	Resistente
Fluconazol 25 µg	≥16	9-15	≤8
Fluconazol 50 µg	≥22	15-21	≤14

**SDD:** sensibilidad dosis dependiente

##### **MEDIO MUELLER HINTON PARA DIFUSIÓN CON DISCOS DE FLUCONAZOL**

Preparar 1 litro de Mueller Hinton según las instrucciones del fabricante, (DIFCO, OXOID Britania, Argentina o similar), agregar 20 g de glucosa y 100 ul de la solución stock de azul de metileno. Autoclavar 15 minutos a 1 atmósfera. Enfriar a 50°C y colocar 25 ml por placa de Petri de 90 x 20 mm, de modo de obtener 4 +/-1 mm de espesor.

##### **SOLUCIÓN STOCK DE AZUL DE METILENO (SS-AM)**

Preparar una solución stock, agregando 0,1 g de Azul de metileno a 20 ml de agua destilada (5 mg/ml). Concentración final de SS-AM en el medio (5 µg/ml).

**Observación:** el disco de papel cargado con fluconazol debe ser conservado a 4°C, **NO CONGELAR**, porque pierde potencia.

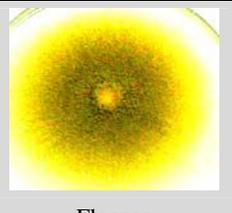
**LAS CEPAS IDENTIFICADAS COMO R O SDD POR ESTE MÉTODO DEBEN SER REEVALUADAS POR EL METODO DE REFERENCIA.**



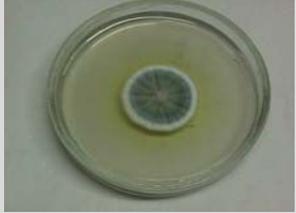
**CARACTERÍSTICA DE LAS COLONIAS**

Forma	Elevación	Margen o borde	Superficie	Pigmento anverso
circular 	plana y extendida 	liso o entero 	plegada 	rojo 
irregular 	elevada y limitada 	Ondulado 	sectorizada 	violeta 
filamentosa 	convexa umbilicada 	Lobado 	cerebriformes 	amarillo 
rizoidal 		Desfleado 	con surcos radiales 	marrón 

**TEXTURA**

		
Aceitosa y brillante (ver centro)	Algodonosa o lanosa	Cremosa y húmeda
		
Flocosa	Velosa	Glabra
		
Granulosa	Aterciopelada	Cerebriforme

**CRECIMIENTO**

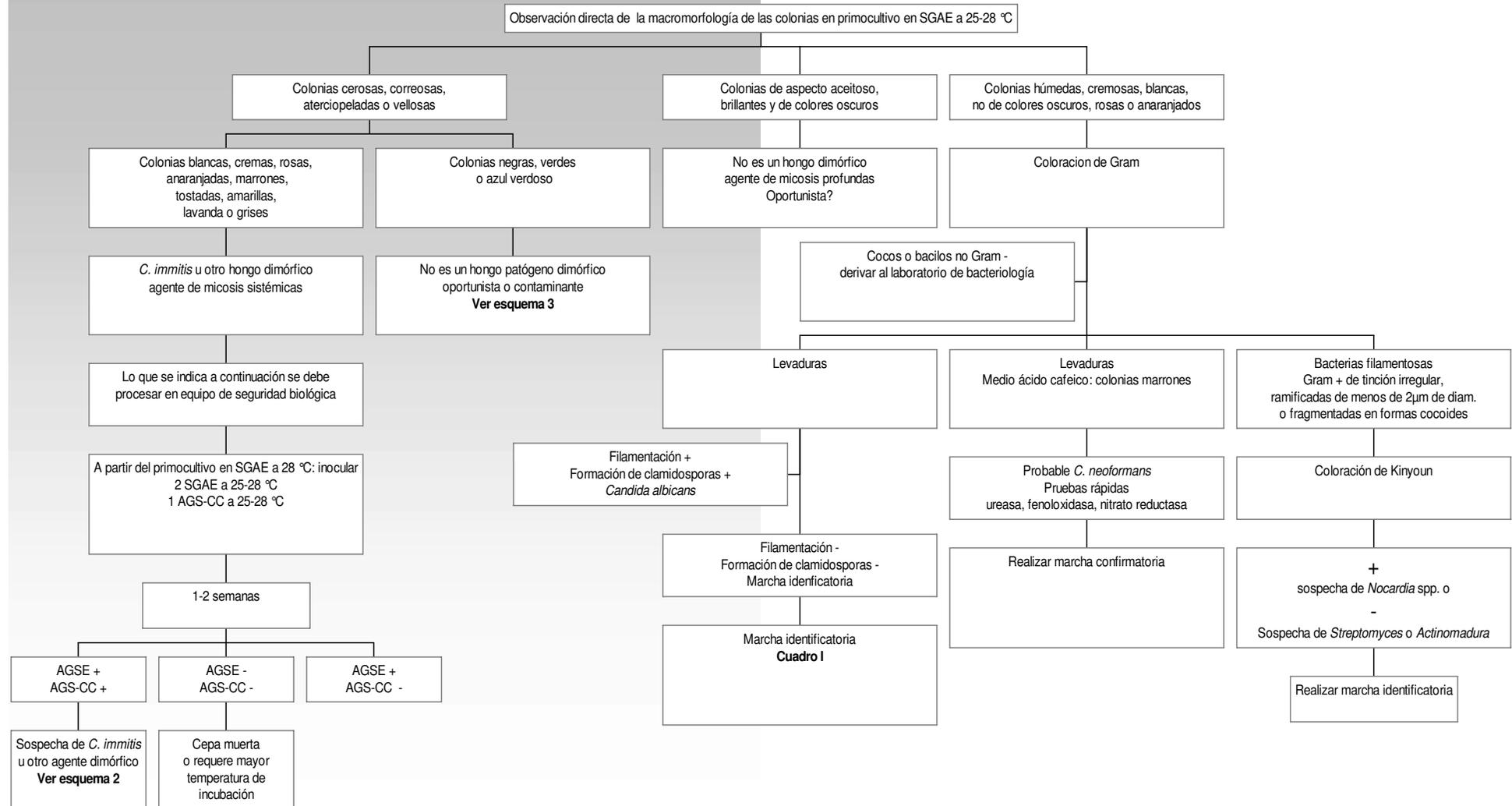
			
<b>Muy rápido y/o invasivo.</b> (menos de 3 días, por ejemplo <i>Mucor</i> sp.)	<b>Rápido</b> (3 a 7 días, por ejemplo <i>Paecilomyces</i> sp.)	<b>Moderado</b> (7 a 14 días, por ejemplo <i>Penicillium</i> sp.)	<b>Lento</b> (más de 14 días, por ejemplo <i>Exophiala</i> sp.)

# **Anexos**

**Esquemas y cuadros utilizados para  
el diagnóstico de las  
micosis sistémicas**

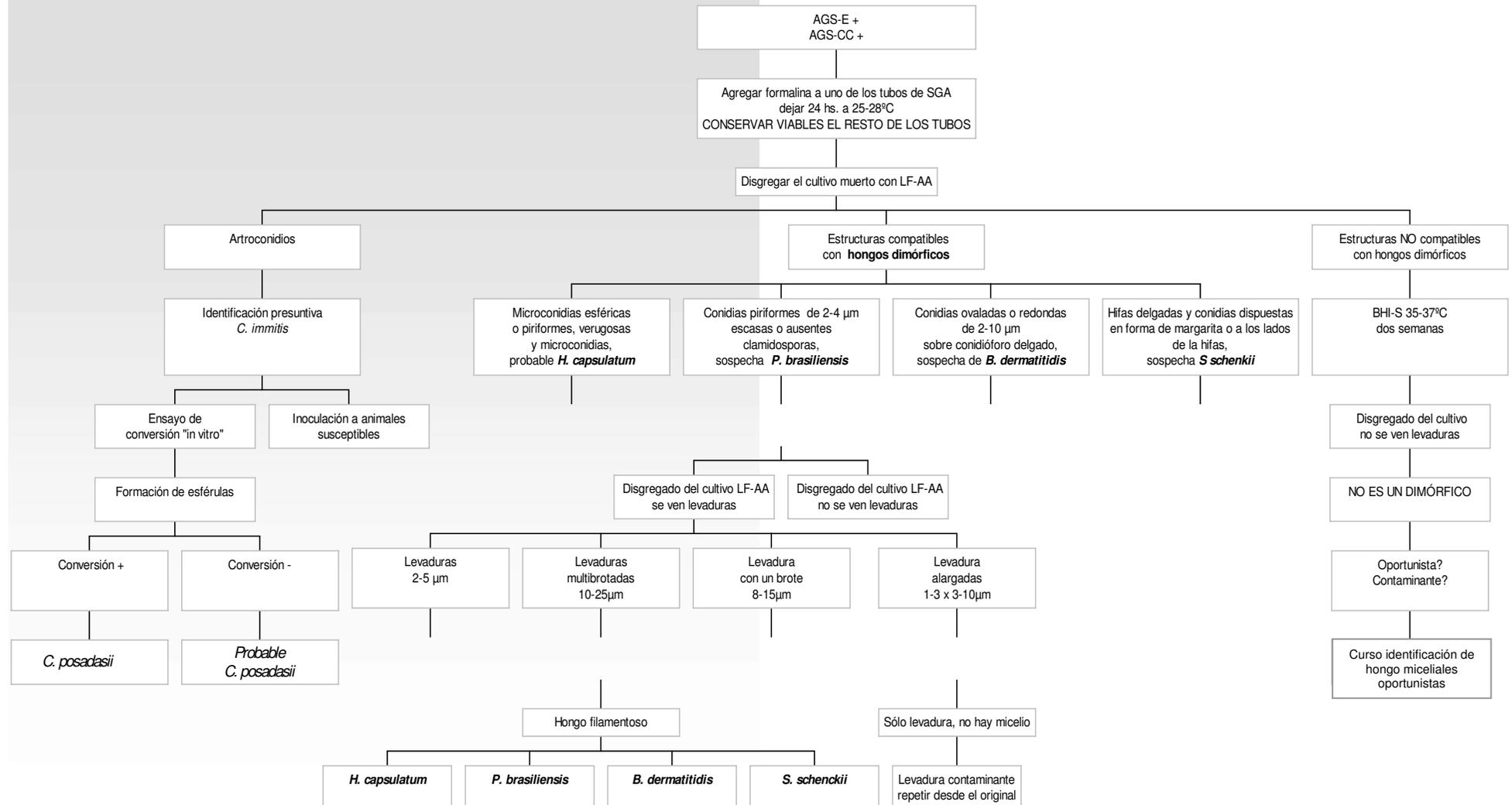


### Esquema 1 - IDENTIFICACIÓN DE LOS PRINCIPALES AGENTES PATÓGENOS PRIMARIOS U OPORTUNISTAS



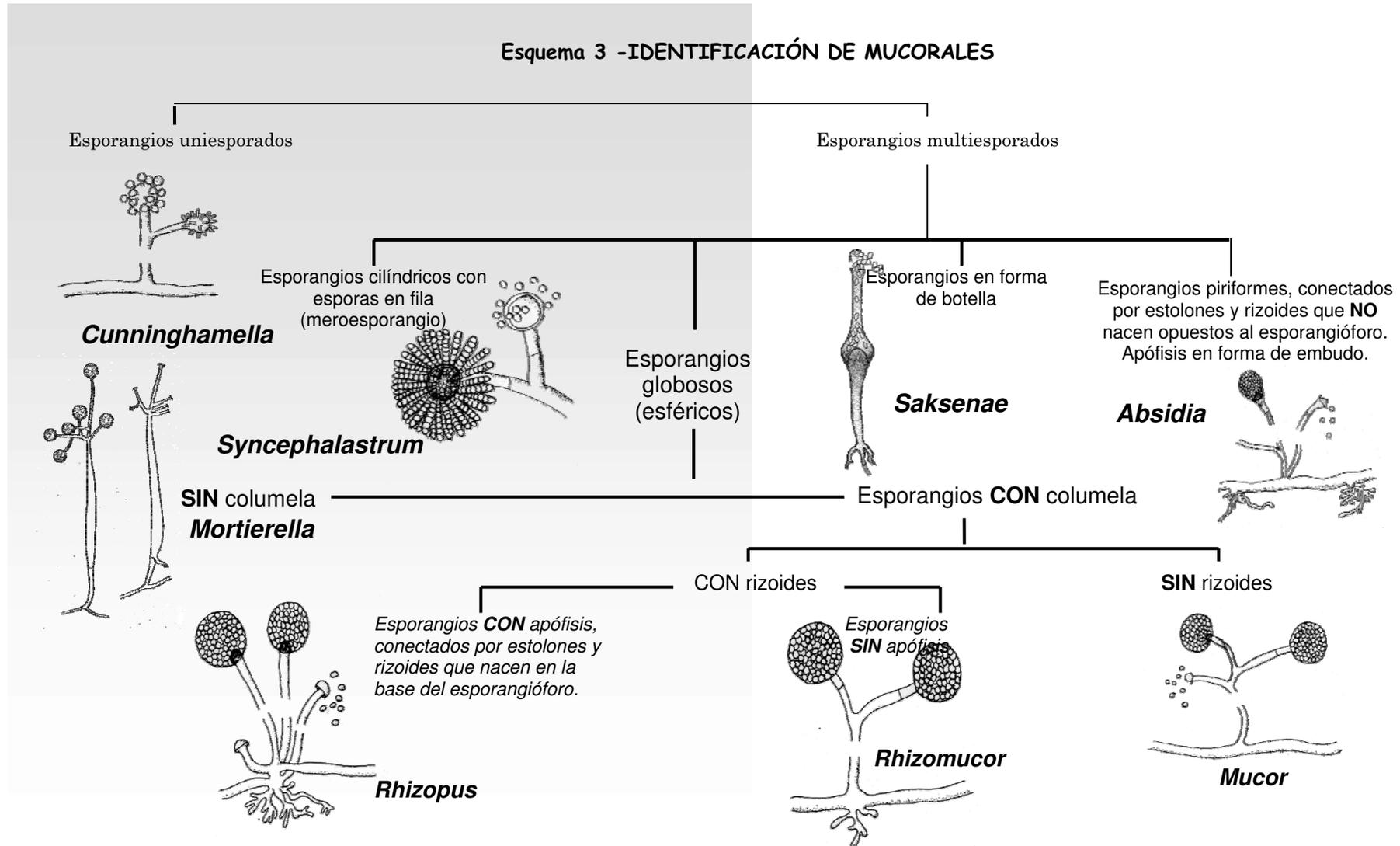


## Esquema 2- IDENTIFICACIÓN DE HONGOS DIMÓRFICOS AGENTES DE MICOSIS SISTÉMICAS





### Esquema 3 - IDENTIFICACIÓN DE MUCORALES





**CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS DE LAS PRINCIPALES LEVADURAS ASOCIADAS AL HOMBRE**

Especie	Fermentación							Asimilación														Urea	37°C						
	GLU	GAL	SAC	MAL	LAC	RAF	TRE	GLU	GAL	SOR	SAC	MAL	CEL	TRE	LAC	MEL	RAF	MLZ	XIL	ARA	MNT			INO	RAM	ERI	CIT	NIT	
<i>Candida albicans/</i>	+	v	-/s	+	-	-	v	+	+	v	v	+	-	+/l	-	-	-	v	+	v	+	-	-	-	+	-	-	+	
<i>C. dubliniensis</i>																													
<i>C. famata</i>	w/-	w/-	w/-	w/-	-	w/-	w/-	+	+	v	+	+	+	+	v	v	+	v	+	+/w	+	-	-	v	v	v	-	n	v
<i>C. glabrata</i>	+	-	-	-	-	-	v	+	-	-	-	-	-	v	v	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>C. guilliermondii</i>	+	v	+	-	-	+	+	+	+	v	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	v	-	v	-	n	+
<i>C. krusei</i>	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+/w	-	n	+
<i>C. lusitaniae</i>	+	v	v	v	-	-	v	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	v	+	-	-	v	-	v	-	n	+
<i>C. parapsilosis</i>	+	v	-/s	-/s	-	-	-/s	+	+	+/l	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	
<i>C. tropicalis</i>	+	+	v	+	-	-	+/s	+	+	v	v	+	+/l	+	-	-	-	v	+	v	+	-	-	-	+/l	-	-	+	
<i>Cryptococcus albidus</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	v	v	+	+	+	+/w	v	v	+	+	+	v	+	+	+	v	v	+	+	+	v
<i>Cr. laurentii</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	+	v	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	v	+/w	-	+	-	
<i>Cr. neoformans/</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	+	v	+	+	+/w	+	-	-	+/w	+	+	+/w	+	+	+	+	v	v	-	+	+
<i>Cr. gatti</i>																													
<i>Pichia anomala</i>	+	v	+	v	-	w/-	-	+	v	-	+	+	+	+	-	-	+	+	v	v	+	-	-	+	+	+	n	v	
<i>Rhodotorula glutinis</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	v	v	+	+	v	-	-	v	+	+	v	v	-	v	-	-	v	+	+	+	+
<i>Rh. minuta</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	v	v	+	-	v	+	v	-	-	+	+	+	v	-	-	-	-	-	-	+	v
<i>Rh. mucilaginosa</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	v	v	+	v	v	+	-	-	+	v	+	v	v	-	v	-	v	-	+	+	+



## CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS DE LAS PRINCIPALES LEVADURAS ASOCIADAS AL HOMBRE

Especie	Fermentación							Asimilación														Urea	37°C					
	GLU	GAL	SAC	MAL	LAC	RAF	TRE	GLU	GAL	SOR	SAC	MAL	CEL	TRE	LAC	MEL	RAF	MLZ	XIL	ARA	MNT			INO	RAM	ERI	CIT	NIT
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	+	v	+	v	-	+	-	+	v	-	+	+	-	+	-	v	+	v	-	-	-	-	-	-	-	-	n	v
<i>Trichosporum. asahii</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	+	v	v	+	+	v	+	-	-	v	v	v	v	v	+	+	+	-	+	+
<i>Tr. cutaneum</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	+	v	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
<i>Tr. inkin</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	v	v	+	+	+	+	+	-	-	+	+	v	v	+	-	+	+	-	+	+
<i>Tr. mucoides</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
<i>Tr. ovoides</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	+	v	+	+	+	v	+	-	v	v	+	v	+	+	+	+	v	-	+	v

GLU: Glucosa, SAC: Sacarosa, MAL: Maltosa, LAC: Lactosa, RAF: Rafinosa, TRE: Trehalosa, SOR: L-Sorbosa, CEL: Celobiosa, MEL: Melibiosa, MLZ: Melezitosa, XIL: Xilosa, ARA: L-Arabinosa, MNT: Manitol, INO: Inositol, RAM: L-rhamosa, ERI: Eritritol, CIT: Citrato, NIT: Nitrato, 37 °C: Crecimiento a 37 °C, Urea: Ureasa. n: no determinado.

**Fermentación:** + : positivo fuerte (campanita llena de gas dentro de 7 días); l : positivo retardado o latente (campanita rápidamente llena luego de más de 7 días); s: positivo lento (la campanita se llena de gas lentamente luego de más de 7 días); w : positivo débil (campanita no completamente llena, 1/3 de gas luego de la lectura final); - : negativo, no fermenta; v : figuran como variables aquellos compuestos en los que algunas cepas de esa especie fermentan el azúcar y otras no.

**Asimilación:** +: Positivo; l: positivo retardado o latente (presenta un crecimiento rápido pero luego de la primer lectura); s: positivo lento (el crecimiento aparece lentamente a lo largo de la incubación); w: positivo débil; -: negativo; v: algunos aislamientos son positivos y otros negativos para esa determinación.

NOTA: Los perfiles de asimilación se encuentran descriptos para el método de asimilación en medio líquido, al utilizar el método auxonográfico los resultados pueden presentar variaciones.



## GLOSARIO

### A

**ACÉRVULO:** (L. *acervus* = montón, forma diminutiva) Capa de hifas, que origina conidióforos cortos y apretados, que forman una masa en forma de almohadilla. Característico de los Melanconiales.

**ACICULAR:** En forma de aguja.

**ACROCATENULADO:** Una cadena de conidios que tienen la célula más joven en el ápice; también se llaman blastocatenadas.

**ACRÓGENO:** Producido en la punta o en el ápice de la célula conidiógena.

**ACRÓPETA:** Se dice de la cadena de conidios donde el conidio más antiguo está en la base y el más joven en el ápice.

**ACROPLEURÓGENO:** Producido en la punta y a lo largo de los lados de la célula conidiógena.

**AÉREO, MICELIO:** Unidades hifales encima de la interfase del agar de la colonia.

**ALEURIOCONIDIO:** Conidio que se desarrolla a medida que se expande el extremo de una célula conidiógena o una rama hifal. Es liberada por lisis o fractura de su célula de sostén; aleuria.

**ANAMORFO:** Estructura somática o reproductiva que se origina sin nueva combinación nuclear (reproducción asexual) estado asexual o imperfecto.

**ANÉLIDE:** (L. *annelus* = anillo) Tipo de célula conidiógena percurrente que produce los conidios blasticos en sucesión basípeta, dejando cada uno como un collar de material celular al ser liberados. El extremo de la anélide se alarga con la producción de cada conidio quedando las cicatrices en forma de anillo en su superficie externa, cerca del locus conidiógeno. El primer conidio es holoblástico, los siguientes son enteroblásticos.

**ANELOCONIDIO:** Un conidio producido en una anélide.

**ANISOGAMIA:** (Gr. *a* = no + *isos* = igual + *gamos* = matrimonio, unión) Unión de planogametas morfológicamente similares pero de distinto tamaño.

**ANTERIDIO:** (Gr. *antheros* = florido + *idion*, sufijo diminutivo) La estructura gametangial masculina, gametangio masculino.

**ANTROPÓFILO:** Un hongo (dermatofito) que crece preferentemente en el hombre más que otros animales, o en el suelo.

**APÍCULO:** Una proyección corta, afilada, de un conidio o de una espora.

**APÓFISIS:** Una hinchazón. La hinchazón en forma de V justamente abajo de la columela y arriba de los esporangióforos, como en *Absidia* sp.

**APOTECIO:** (Gr. *apoteke* = depósito) Un ascocarpo abierto.

**ARTROCONIDIO:** Un conidio tálico liberado por la fragmentación o lisis de las hifas. No es notablemente mayor que la hifa de la cual fue producido, y su separación se efectúa en un tabique.

**ARTROSPORA:** (Gr. *artron* = articulación + *sporos* = semilla, espora) Espora resultante de la fragmentación de una hifa. También llamada oidio.

**ASCÍGERO:** (Gr. *askos* = saco) El estadio con ascos de un Ascomiceto.

**ASCO:** (Gr. *askos* = saco) Estructura en forma de saco, que por lo general contiene un determinado número de ascosporas (típicamente 8), las cuales por lo común se forman como resultado de cariogamia

y meiosis. Característico de los Ascomycetes.

**ASCOCARPO:** (Gr. *askos* = saco + *karpos* = fruto) Estructura que lleva las ascas y las ascosporas; cuerpo fructescente de los Ascomicetos, también se llama ascoma.

**ASCÓGENO:** Que lleva ascas.

**ASCOGONIO:** (Gr. *askos* = saco + *gennao* = yo doy nacimiento) El gamentagio "femenino" de los ascomicetos.

**ASCOMA:** Cuerpo fructífero que origina los ascos y las ascosporas.

**ASCOSPORA:** (Gr. *askos* = saco + *sporos* = semilla, espora) Una espora, usualmente el resultado de la nueva combinación nuclear, formada en un ascó; la propágula reproductiva teleomórfica de los *Ascomycotina*. La espora se forma internamente después de meiosis.

**ASEPTADO:** (L. *ab* = distante + *septum* = tabique) Sin paredes transversales.

**ASEXUAL:** (L. *ab* = distante + *sexus* = sexo) Reproducción que no requiere cariogamia y meiosis.

**ASPERGILOSIS:** (*Aspergillus* = un género de Deuteromycetes) Nombre genérico de las enfermedades causadas por varias especies de *Aspergillus*, tanto en los animales como en los seres humanos.

**ASPORÓGENO:** (Gr. *a* = no + *sporos* = semilla, espora + *gennao* = yo doy nacimiento) Que no forma esporas.

### B

**BALISTOSPORA:** Espora que es expulsada violentamente de su célula esporógena, como en algunos *Basidiomycota*.

**BASIDIO:** (Gr. *basidion* = pequeña base) Estructura que lleva sobre su superficie un determinado número de basidiosporas. (típicamente 4) las cuales generalmente se forman como resultado de cariogamia y meiosis.

**BASIDIOCARPO:** (Gr. *basidion* = pequeña base, basidio + *karpos* = frutos) Cuerpo fructífero portador de basidios.

**BASIDIOSPORA:** (Gr. *basidion* = pequeña base + *sporos* = semilla, espora) Espora nacida de un basidio que se desarrolla después de la cariogamia y la meiosis en los *Basidiomycotina*.

**BASÍPETA:** Se dice de la cadena de conidios donde el conidio más antiguo está en el ápice y el más joven en la base.

**BASOCATENULADO:** Una cadena de conidios que tiene el conidio más joven en la base de la cadena, arriba del ápice de las células conidiógenas.

**BINOMIO:** (L. *bi* = dos + *nomen* = nombre) El nombre científico de un organismo, está compuesto por dos nombres: el primero designa el género y el segundo la especie.

**BLÁSTICO:** Conidio que se forma como un brote de la célula conidiógena y luego es delimitado por un tabique.

**BLASTOCONIDIO:** Conidio holoblástico que se desprende en el punto predeterminado en la madurez y deja una cicatriz en yema. Ejemplo: el proceso de la gemación en las células de levadura.

**BLASTOSPORA:** (Gr. *blastos* = yema, brote + *sporos* = semilla, espora) Espora sexual formada por gemación.

### C

**CÁPSULA:** Mucopolisacárido hialino que cubre el cuerpo celular de



ciertas levaduras (*Cryptococcus* spp, *Rhodotorula* spp) y algunas esporas y conidios.

**CARIOGAMIA:** (Gr. *karyon* = nuez, núcleo + *gamos* = matrimonio, unión) Fusión de dos núcleos.

**CATENULADO:** En cadenas o en series de extremo con extremo.

**CÉLULA MADRE DEL ASCO:** En los Ascomycetes, la célula binucleada del uncínulo en la que se presenta cariogamia; al desarrollarse da un asco.

**CENOCÍTICO:** (Gr. *koinos* = común + *kytos* = un recipiente hueco) No tabicado; se refiere a que los núcleos incluidos en el citoplasma no están separados por paredes transversales, es decir, los núcleos están situados en una matriz común.

**CIGOTO:** Resultado de la fusión de dos células haploides para formar una célula diploide. La meiosis puede presentarse inmediatamente, como en la mayor parte de los cigomicetos.

**CLAMIDOCONIDIO:** Conidio tálico formado de una célula hifal preexistente por modificación. Esto por lo regular incluye aumento en el espesor de la pared y algunas veces alargamiento de la célula, con el protoplasma que se hace más denso. El conidio es liberado por fractura o por lisis de la hifa adyacente.

**CLAMIDOSPORA:** (Gr. *chlamys* = manto + *sporos* = semilla, espora) Célula hifal, encerrada por una gruesa pared celular, que finalmente se separa de la hifa madre y se comporta como espora de resistencia; tipo de conidio tálico.

**CLEISTOTECIO:** (Gr. *kleistos* = cerrado + *theke* = caja) Ascoma de paredes sólidas que típicamente no tiene un poro u orificio y contiene, al azar, ascos con ascosporas.

**COLONIA:** (L. *colonia*) Grupo de individuos que son de la misma especie y viven en estrecha asociación. En los hongos, el término por lo general indica el conjunto de hifas que crecen a partir de un solo punto y forman un talo discoidal o globoso.

**COLUMELA:** (L. *columna* = columna) Estructura estéril existente dentro de un esporangio u otra fructificación; a menudo una prolongación del pedúnculo.

**COLLARETE:** El remanente de una pared celular que se encuentra en la punta de una fiálide. Es el resultado de la rotura de la punta de una célula conidiógena durante la liberación del primer fialoconidio. También, el anillo de material de la pared celular alrededor de un esporangio cuando éste se disuelve o se rompe.

**CONIDIO:** (Gr. *konis* = polvo + *idion* = sufijo diminut.) Espora asexual, generalmente formada en el extremo o lado de una hifa; en algunos casos una célula hifal preexistente puede convertirse en un conidio.

**CONIDIO BLÁSTICO:** (Gr. *blastos* = brote) Conidio que sale de una sola porción de una célula conidiógena preexistente.

**CONIDIO TÁLICO:** (Gr. *thallos* = vástago joven) Conidio formado por transformación de la totalidad de una célula hifal preexistente, se denomina también artroconidio.

**CONIDIÓFORO:** (Gr. *konis* = polvo + *phoreus* = portador) Hifa especializada que lleva conidios. Hifa simple o ramificada que sale de una hifa somática y lleva en su ápice, o en sus lados, una o más células conidiógenas.

**CONIDIÓGENA, CÉLULA:** La célula que origina un conidio.

**CONTACTO GAMETANGIAL:** (Gr. *gametes* = esposo + *angeion* = recipiente) Forma de reproducción sexual por la cual dos gametangios se ponen en contacto pero no se fusionan. El núcleo masculino migra al gametangio femenino a través de un poro o tubo de fecundación.

**COPULACION GAMETANGIAL:** (Gr. *gametes* = esposo +

*angeion* = recipiente) Forma de reproducción sexual por la cual dos gametangios o sus protoplastos se fusionan y dan lugar a un cigoto; éste va a dar una espora de resistencia.

**COREMIO O SINEMA:** (Gr. *syn* = junto + *nema* = hilo) Grupo de conidióforos reunidos que forman una estructura alargada portadora de esporas en el ápice.

**CUERPO FRUCTIFERO:** Véase **FRUCTIFICACIÓN**.

## D

**DEHISCENCIA:** La abertura de un poro en la madurez o la rotura de un tallo (en un tabique) para liberar una propágula.

**DEMATIACEO:** Hongo que tiene pigmento melanótico pardo o negro en la pared celular; feohifomicete.

**DENTICULADO:** Célula conidiógena que lleva denticulos.

**CONIDIACION DETERMINADA:** Tipo de conidiación en la cual el conidio del extremo de una cadena no prolifera. Conidióforo determinado. Célula conidiógena (conidióforo) que no se extiende, no sigue creciendo después de la formación de un conidio.

**DICARIONTE:** (NL. *di* = dos + Gr. *karyon* = nuez, núcleo) Par de núcleos estrechamente asociados, cada uno por lo general derivado de células madres distintas.

**DICARIOTICO:** (NL. *di* = dos + Gr. *karyon* = nuez, núcleo) Con referencia a una célula que tiene un dicarionte.

**DICOTOMICO:** Tipo de ramificación de las hifas que es repetitiva, sin patrón, las ramas tienen aproximadamente igual tamaño entre sí y con el tallo del cual se originaron.

**DICTIOCONIDIO:** Conidio de dos células (tabicación transversal).

**DICTIOSPORA:** (Gr. *dictyon* = red + *sporos* = semilla, espora) Espora con tabiques perpendiculares entre sí.

**DIMORFICO:** (Gr. *dis* = dos veces + *morphe* = forma) Que produce dos tipos de zoosporas.// Hongo capaz de crecer en forma de levadura o micelio.

**DIPLOIDE:** (Gr. *diploous* = doble) Que contiene el número doble (2n) de cromosomas.

## E

**ENDOBOTICO:** (Gr. *endos* = dentro + *bios* = vida) Un organismo que vive dentro del substrato, generalmente constituido por las células del hospedante.

**ENDOCONIDIO:** (Gr. *endos* = dentro + conidio) Espora asexual formada dentro de una hifa (endógenamente) y luego forzada hacia afuera.

**ENDOGENO:** De adentro.

**ENDOSPORA:** Artroconidios formados dentro de alguna otra unidad, como es una esférula.

**ENTEROBLASTICO:** Formado por las capas internas de la pared celular de una célula conidiógena.

**EQUINULADO:** Cubierto de pequeñas espinas.

**ESPECIES:** (L. *species*) Unidad de clasificación. Un grupo de individuos muy afines que se parecen unos a otros en ciertos caracteres heredados. Es designada por un binomio formado por el nombre genérico y el epíteto específico.

**ESPORO:** (Gr. *sporos* = semilla, esporo) Unidad de diseminación, diminuta, que funciona como una semilla, pero que difiere de ellas en



que no contiene un embrión preformado.

**ESPORANGIO:** (Gr. *sporos* = semilla, espora + *angeion* = recipiente) Estructura en forma de saco, cuyo contenido protoplasmático completo se convierte en un número indefinido de esporas.

**ESPORANGIOFORO:** (Gr. *sporos* = semilla, espora + *angeion* = recipiente + *phoreus* = portador) Hifa especializada que porta un esporangio.

**ESPORANGIOLO:** (Gr. *sporos* = semilla, espora + *angeion* = recipiente + L. *olum* = sufijo diminutivo) Pequeño esporangio que contiene pocas esporas.

**ESPORANGIOSPORA:** (Gr. *sporos* = semilla, espora + *angeion* = recipiente + *sporos*) Unidad reproductiva (espora) que se ha formado en un esporangio.

**ESPOROCLADIO:** (Gr. *sporos* = semilla, espora + *klados* = rama) Tiene tipo especial de rama fértil de un esporangióforo que lleva merosporangios.

**ESPORODOQUIO:** (Gr. *sporos* = semilla, espora + *docheion* = envase) Estroma en forma de almohadilla o tapete de hifas cubiertas con conidióforos.

**ESPOROFORO:** (Gr. *sporos* = semilla, espora + *phoreus* = portador) Cualquier estructura que lleve esporas.

**ESTERIGMA:** (Gr. *sterigma* = soporte) Una pequeña rama o estructura hifal que sostiene un esporangio, un conidio o una basidiospora.

**ESTOLON:** Hifa aérea que forma rizoides cuando entra en contacto con la superficie de agar (o del sustrato). Con frecuencia hay hinchazón (llamada nódulo) en éste punto.

**EXOCONIDIO:** (Gr. *exo* = fuera + conidio) Cualquier espora asexual formada sobre la superficie de una hifa (exógenamente).

**EXOGENO:** Desde afuera.

## F

**FASE IMPERFECTA:** Fase asexual (de ordinario conidial) de un hongo.

**FASE PERFECTA:** Fase sexual de un hongo.

**FEO-:** Pigmentado, en tono oscuro.

**FIALIDE:** (Gr. *phialis* = botellita) Tipo de célula conidiógena que produce conidios blásticos de una manera basípeta, sin un aumento detectable de su longitud

**FIALOCONIDIO:** Conidio producido por una fiálide.

**FIALOSPORA:** (Gr. *phialis* = vaso + *sporos* = semilla, espora) Espora producida por una fiálide.

**FIBULA:** (L. *fibula* = hebilla) Una conexión hifal a manera de puente, característica del micelio secundario de muchos Basidiomycetes.

**FISION:** (L. *fissio*) División de una célula en dos células.

**FRAGMENTACION:** (L. *frangere* = romper) Segmentación del talo en partes, cada una de las cuales es capaz de crecer y dar un nuevo individuo. Un método de reproducción asexual.

## G

**GAMETA:** (Gr. *gametes* = esposo, célula sexual) Célula sexual diferenciada o núcleo sexual que se fusiona con otro en el proceso de

reproducción sexual.

**GAMETANGIO:** (Gr. *gametes* = esposo + *angeion* = recipiente) Estructura que contiene gametas.

**GEMACION:** (L. *gemmatio*) Proceso de formación de una pequeña yema a partir de una célula progenitora. Una de las formas de reproducción asexual.

**GENERO:** (L. *genus* = raza) Categoría taxonómica que incluye una cantidad de especies. El nombre del género (nombre genérico) es el primer nombre en el binomio.

**GENICULADO:** Doblado, como la rodilla.

## H

**HALOFILO:** Que tolera concentraciones de sal elevadas.

**HAPLOIDE:** (Gr. *haplous* = simple) Que contiene el número reducido (n) de cromosomas.

**HELICOSPORA:** (Gr. *helix* = hélice + *sporos* = semilla, espora) Espora enrollada, helicoidal.

**HERMAFRODITA:** (Gr. *Hermes* = el mensajero de los dioses, símbolo del sexo masculino + *Afrodita* = la diosa del amor, símbolo del sexo femenino) Se refiere a las especies en las cuales un mismo individuo produce los órganos sexuales masculinos y femeninos.

**HETEROCARIOSIS:** (Gr. *heteros* = otro + *karyon* = nuez, núcleo) Estadío en el cual se presentan en un mismo protoplasto núcleos genéticamente diferentes.

**HETEROCARIOTICO:** (Gr. *heteros* = otro + *karyon* = nuez, núcleo) Se dice de un microorganismo que genéticamente tiene núcleos diferentes en el mismo protoplasma.

**HETEROGAMETANGIA:** (Gr. *heteros* = otro, diferente + *gametes* = esposo + *angeion* = recipiente) Gametangios masculinos y femeninos morfológicamente distintos.

**HETEROGAMETAS:** (Gr. *heteros* = otro, diferente + *gametes* = esposo) Gametas masculinas y femeninas morfológicamente distintas.

**HETEROTALICO:** (Gr. *heteros* = otro, diferente, + *thallos* = brote, talo) Según una versión: se refiere a una especie constituida por individuos autoestériles (auto-incompatibles) que, para la reproducción sexual, requiere la unión de dos talos compatibles, sin considerar la posible presencia de ambos órganos, masculino y femenino sobre el mismo individuo. Según otra versión: se refiere a una especie en la los sexos se presentan en talos separados de modo que para la reproducción sexual se requieren dos talos diferentes.

**HIALO-:** Incoloro, también hialino.

**HIFA:** (Gr. *hyphae*: telaraña) La unidad estructural de los hongos; un filamento tubular.

**HIFA ASCOGENA:** (Gr. *hyphae* = tejido + *askos* = saco + *gennaon* = yo doy nacimiento) Hifa especializada que origina uno o más ascos.

**HIFOMICETO:** Hongo anamorfo que produce micelio con pigmento oscuro perceptible en las paredes celulares, o sin él. Si la hifa está pigmentada se llama dematiácea; si es incolora, hialina.

**HIPERPLASIA:** (Gr. *hyper* = sobre + *plasis* = acción de modelar, formación) Excesiva multiplicación de células; ritmo anormal de división celular.

**HIPERTROFIA:** (Gr. *hyper* = sobre + *trophe* = alimento) Excesivo crecimiento de la célula.

**HOLOBLASTICO:** Se dice de un conidio en el cual las paredes se forman de todas las paredes de las células conidiógenas.



**HOMOTALICO:** (Gr. *homo* = mismo + *thallos* = brote, talo) Se refiere a los hongos para cuya reproducción sexual basta un solo talo que es, por tanto, esencialmente autocompatible.

**HONGO:** (L. *fungus* = seta) Organismo eucariota aclorófilo cuya estructura somática es generalmente filamentosos y ramificada. Los hongos tienen paredes celulares y núcleos. Se reproducen típicamente tanto de modo sexual como asexual. Se nutren por absorción.

**HOSPEDADOR:** (Gr. *hospes* = el que recibe a un extraño como invitado) Organismo vivo que alberga al parásito.

## I

**INDETERMINADO:** Crecimiento que puede proseguir más allá de un tamaño definido.

**INDURADO:** Duro.

**INTERCALAR:** Formado dentro de una unidad hifal.

**ISOGAMETANGIO:** (Gr. *isos* = igual + *gametes* = esposos + *angéion* = recipiente) Gametangios, presumiblemente de sexo opuesto, que son morfológicamente indistinguibles.

**ISOGAMETAS:** (Gr. *isos* = igual + *gametes* = esposo) Gametas, presumiblemente de sexo opuesto, que son morfológicamente indistinguibles.

## L

**LANOSO:** Con aspecto de lana

**LENTICULAR:** En forma de una lente doble convexa o de una lenteja.

**LEVADURA:** Célula fúngica simple, usualmente ovoide, que se duplica por la formación de blastoconidios, en plano de división, o por fiálide o anélide reducido.

## M

**MACROCONIDIO:** (Gr. *makron* = largo + *konis* = polvo + *idion* = sufijo diminutivo) El mayor de dos tipos de conidios producidos de la misma manera por el mismo hongo.

**MEDIO:** (L. *medium* = intermediario) Substrato de composición química equilibrada que se emplea en el laboratorio para cultivar microorganismos. Los medios pueden utilizarse en estado líquido o gelificarse con agar, gelatina u otros agentes.

**MEIOSIS:** (Gr. *meiosis* = reducción) Dos divisiones nucleares consecutivas, una de las cuales es reduccional. Como resultado de la meiosis se producen cuatro núcleos haploides.

**METULA:** Célula basal de las profiálides del conidióforo de los *Penicillium* spp. (ver página 92).

**MICELIO:** (Gr. *mykes* = seta, hongo) Masa de hifas que constituye el cuerpo vegetativo (talo) de un hongo.

**MICOLOGIA:** (Gr. *mykes* = seta, hongo + *logos* = discurso) La ciencia que estudia los hongos.

**MICROCONIDIO:** (Gr. *mikron* = pequeño + *konis* = polvo + *idion*, sufijo diminutivo) El menor de dos tipos de conidios producidos de la misma manera por el mismo hongo. A menudo actúa como un espermacio.

**MICRON:** (Gr. *mikron* = pequeño) Unidad de medida igual a 0,001 mm o aproximadamente 1/25.000 de pulgada.

**MONILIFORME:** Que tiene hinchazones que se presentan a intervalos regulares de una hifa.

**MONOCARIOTICO:** (Gr. *monon* = solo, sencillo + *karyon* = nuez, núcleo) Que contiene un solo núcleo.

**MONOMORFICO:** (Gr. *monos* = solo, uno + *morphe* = forma) Que produce un solo tipo de zoospora.// Hongo con una sola forma somática, micelio o levadura.

**MUCORMICOSIS:** Enfermedad causada por algunas de las especies de Mucorales en los animales o seres humanos.

## O

**OIDIO:** (Gr. *oidion* = pequeño huevo) Célula hifal libre, de pared delgada, originada por fragmentación de una hifa somática en sus células componentes o a partir de un oidióforo. Se comporta como una espora o como un espermacio.

**OIDIOFORO:** (Gr. *oidion* = pequeño huevo + *phoreus* = portador) Una hifa que se fragmenta en oídios desde su extremo hacia la base.

**OPERCULO:** (L. *operculum* = tapadera) Tapita articulada mediante una especie de bisagra, que cubre un esporangio o un asco.

## P

**PARASITO:** (Gr. *parasitos* = comiendo al lado del otro; de *para* = al lado + *sitos* = trigo, alimento) El organismo que vive a expensas de otro, generalmente invadiéndolo y causándole enfermedad.

**PARASITO FACULTATIVO:** (Gr. *parasitos* = compañero de mesa + L. *facultas* = habilidad) Un organismo que, según las circunstancias, es capaz de infectar otro organismo vivo, o de crecer sobre sustancia orgánica muerta.

**PARASITO OBLIGADO:** (Gr. *parasitos* = compañero de mesa; L. *obligare* = atar) El organismo que sólo puede obtener alimento tomándolo del protoplasma vivo. Los parásitos obligados no pueden ser cultivados sobre medios que no estén vivos.

**PECTINADO:** Como los dientes de un peine.

**PELICULA:** (L. *pellis* = piel, forma diminutiva) Agregación de bacterias o de levaduras que forman una especie de membrana o piel sobre la superficie de medios líquidos. Cualquier crecimiento superficial a manera de piel.

**PENICILADO:** Que tiene un penacho de finos cabellos, en forma de pincel; se aplica al conidióforo ramificado de *Penicillium*.

**PENICILIFORME:** (NL. *penicilliformis*, der. de *penicillium* = pequeño pincel) Como los conidióforos del género *Penicillium*.

**PERCURRENTE:** Crecimiento continuo de una célula conidiógena después de la reproducción del primer conidio. El crecimiento se presenta en el extremo abierto del conidióforo después de la dehiscencia del conidio.

**PERITECIO:** (Gr. *peri* = alrededor + *theke* = una caja) Ascocarpio cerrado que tiene paredes sólidas y un poro en la parte superior (ostiolo), a través del cual pueden escapar las ascoporas. Los ascos están acomodados en un penacho basal o capa himenial.

**PICNIDIO:** (Gr. *pyknon* = concentrado + *idion* = sufijo diminutivo) Cuerpo fructífero asexual, hueco, recubierto interiormente por conidióforos.

**PICNIDIOSPORAS:** (picnidio + Gr. *sporos* = semilla, espora) Conidio llevado en un picnidio.

**PICNIOSPORA O PICNIDIOSPORA:** (Gr. *pyknon* = denso) Vieja designación para el espermacio de las royas, utilizadas antes que



fuera descubierta la verdadera función de los espermacios.

**PLASMOGAMIA:** (Gr. *plasma* = un objeto moldeado + *gamos* = matrimonio, unión) La fusión de dos protoplastos.

**PLEUROGENO:** Que sale de los lados de un conidióforo o de una hifa.

**POROCONIDIO:** Conidio producido a través de un pequeño poro en una célula conidiógena.

**POROSPORA:** (Gr. *poros* = poro + *sporos* = semilla, espora) Una espora producida por los poros de un conidióforo.

**PROTISTA:** (Gr. *protiston* = el primerísimo) Reino propuesto por Haeckel en un intento para clasificar los organismos que muestran a un tiempo caracteres vegetales y animales.

**PSEUDOMICELIO:** (Gr. *pseudo* = falso + micelio) Serie de células, adheridas por los extremos, que forman una cadena. Producido por algunas levaduras.

## R

**REPRODUCCION:** (L. *re* = prefijo por de nuevo + *producere* = llevar adelante) La producción de nuevos individuos que presentan todos los caracteres típicos de la especie.

**REPRODUCCION SEXUAL:** Reproducción que requiere la fusión de dos núcleos compatibles, y la meiosis.

**RETICULADO:** (L. *reticulum* = una pequeña red) En forma de red; cubierto con crestas a manera de red.

**RIZOIDE:** (Gr. *rhiza* = raíz + *oeides* = como) Rama corta, delgada, de un talo, parecido superficialmente semejante a una raíz.

## S

**SAPROBIO FACULTATIVO:** (Gr. *sapros* = podrido + *bios* = vida; L. *facultas* = habilidad) Organismo que, según las circunstancias, es capaz de crecer sobre sustancia orgánica muerta o infectar otro organismo vivo.

**SAPROBIO O SAPROFITO:** (Gr. *sapros* = podrido + *bios* = vida) Organismo que utiliza como alimento la sustancia orgánica muerta.

**SAPROBIO OBLIGADO:** (Gr. *sapros* = podrido + *bios* = vida; L. *obligare* = atar) El organismo que debe obtener su alimento de la sustancia orgánica muerta, y es incapaz de infectar un organismo vivo.

**SEPTADO:** (L. *septum* = valla) Con paredes transversales, dispuestas más o menos regularmente.

**SEPTO:** (L. *septum* = valla, partición) Una pared transversal en una hifa.

**SEUDOHIFA:** Frágil hilera de células que resulta de la gemación de un blastoconidio que ha permanecido unido a los demás. Los tabiques que separan las células están completos y no hay conexión citoplásmica, como sucede en las hifas verdaderamente tabicadas.

**SEUDOPARENQUIMA:** Masa de hifas que forman una estructura parecida a tejido.

**SIMPODULA:** Célula conidiógena que se extiende más allá del punto del ápice en el cual se produce un conidio, formando un nuevo ápice; así se forman series de ápices en un lado, después en el otro.

**SOMATICO:** (Gr. *soma* = cuerpo) Se refiere a la estructura o función de la fase cuerpo - en los vegetales la fase vegetativa - para distinguirla de la reproductora.

**SOMATOGAMIA:** (Gr. *soma* = cuerpo + *gamos* = matrimonio,

unión) La fusión de células somáticas durante la plasmogamia.

## T

**TABIQUE:** Pared transversal.

**TALICO:** Se dice del conidio producido cuando no hay alargamiento del conidio inicialmente, antes de su delineación por un tabique. La célula madre entera se convierte en conidio.

**TALO:** (Gr. *thallos* = brote) Cuerpo de los hongos, fase somática.

**TAXONOMIA:** (Gr. *taxis* = orden, disposición + *nomos* = ley) La ciencia de clasificación.

**TELEOFORMO:** Estructura reproductiva de un hongo, que es el resultado de la plasmogamia o nueva combinación nuclear; estado sexual o perfecto.

**TERMINAL:** Formado en el extremo, así no hay más crecimiento.

**TUBO DE FECUNDACION (O TUBO COPULATIVO):** Tubo que se origina en el gametangio masculino y

penetra en el femenino, y por el cual pasan las gametas masculinas (núcleos).

## V

**VELLOSO:** Algodonoso.

**VERTICILADO:** Ramas o conidios que irradian de un punto común en una célula conidiógena o una hifa; alrededor de un vértice.

**VESICULA:** (L. *vesicula* = pequeña vejiga) Estructura delgada a modo de burbuja, en la cual las zoosporas se diferencian y liberan; también la cabeza bulbosa que remata los conidióforos de *Aspergillus*.

## Z

**ZIGOFORO:** (Gr. *zygos* = yugo + *phoreus* = portador) Una rama hifal especializada que lleva zigosporas.

**ZIGOSPORA:** (Gr. *zygos* = yugo + *sporos* = semilla, espora) Espora de resistencia resultado de la fusión de dos gametangios en los Zygomycetes.

**ZIGOSPORANGIO:** (Gr. *zygos* = yugo + esporangio) Un esporangio que contiene una zigospora.

**ZIGOTO:** (Gr. *zygos* = yugo) Célula diploide resultante de la unión de dos células haploides.

**ZOOFILO:** Que tiene un reservorio o huésped preferencial en un animal y no en el hombre.