

EXAMEN MICOLÓGICO DE MUESTRAS CLÍNICAS

Autora

Dra. Maria C. Halley Posada

Departamento

Microbiología

CONTENIDO

- Toma de muestras
- Diagnóstico de candidiasis
- Diagnóstico de levaduras de interés médico
- Diagnóstico de laboratorio de la criptococosis
- Diagnóstico de laboratorio de la histoplasmosis
- Diagnóstico de laboratorio de la aspergilosis
- Diagnóstico de laboratorio de la mucormicosis
- Diagnóstico de laboratorio de la esporotricosis
- Diagnóstico de laboratorio de las dermatofitosis
- Diagnóstico de laboratorio de Pitiriasis versicolor
- Diagnóstico de laboratorio de la Tiña negra
- Diagnóstico de laboratorio de las Piedra
- Diagnóstico de laboratorio de la Cromomicosis
- Diagnóstico de laboratorio de Micetomas

TOMAS DE MUESTRAS

En las últimas décadas, el impacto de las micosis en la salud pública mundial ha ido en aumento, debido entre otros factores a la pandemia de SIDA, los tratamientos invasivos y las enfermedades debilitantes. Es por esto que el personal del Laboratorio de Microbiología debe estar capacitado para ofrecer el nombre del hongo encontrado en una muestra clínica, además de dar más información sobre la conducta a seguir, como por ejemplo:

- Cuales muestras serían las más apropiadas de acuerdo a la sintomatología del paciente
- Con que frecuencia y cómo deben recogerse las muestras
- Bajo las condiciones del paciente, cual de las micosis pudiera y cuales no pudieran estar presentes

- Que pruebas serológicas pudieran realizarse y la interpretación correcta de sus resultados
- Si hay elementos micóticos en el examen microscópico directo de la muestra, qué indica esto
- Que impacto pudieran tener los resultados del laboratorio en el probable diagnóstico de una micosis
- Posibles tratamientos.

A su vez el personal del laboratorio debe tener acceso a aquellos datos clínico-epidemiológicos del paciente que pudieran contribuir al correcto diagnóstico:

- Edad, sexo, raza, ocupación
- Características de la lesión. Principales signos y síntomas
- Posibles vías de inoculación
- Tiempo de evolución
- Lugar de residencia y regiones visitadas
- Posibles contactos con animales
- Estado general del paciente. Factores predisponentes
- Resultados de los exámenes complementarios de laboratorio clínico y radiológicos.

Toma de la muestra

- Selección apropiada de las muestras clínicas: en el cuadro a continuación se presentan las infecciones micóticas más comunes y los especímenes de los cuales se recuperan los agentes etiológicos, así como las estructuras micóticas que suelen observarse en el estudio microscópico del producto patológico.
- Rechazo de los productos inadecuados:
 - ⊕ La saliva no debe considerarse esputo
 - ⊕ Las escamas de piel o pelos no deben ser colectados al azar, sino que correspondan al borde de la lesión las unas y que sean los realmente dañados los otros
 - ⊕ La sangre debe ser sin anticoagulante
 - ⊕ No son válidas las muestras congeladas o almacenadas en hielo seco por más de un día
 - ⊕ La toma de muestras debe ocurrir antes de instaurar la terapéutica antimicótica
- Cantidad de la muestra: en micología, la presencia del hongo es más probable, cuando la muestra es tomada de forma abundante.

- Tiempo: el transporte rápido de los productos clínicos hacia el laboratorio es importante para la recuperación de los agentes etiológicos de las infecciones micóticas, sobre todo porque en la muestra existen una mezcla de bacterias y de otros hongos que interfieren en la supervivencia del hongo patógeno.
- Transporte y almacenamiento: siempre que se pueda se debe lograr hacer un frotis directo de la muestra y proceder a la siembra inmediata en los medios de cultivo adecuados. En caso de que esto no sea posible las muestras deben ser transportadas en recipientes estériles que provean humedad. Si es necesario, se debe añadir a la muestra solución salina estéril, y en el caso de exudados y secreciones en donde existan bacterias en grandes cantidades se debe añadir a la solución salina estéril penicilina (500U/mL), estreptomicina (500 µg/mL) o cloramfenicol (500ug/mL). Si se sospecha el crecimiento de actinomicetales no se deben añadir antibióticos, ya que estos pueden inhibir el crecimiento de los mismos.
- Cuando no se puedan procesar inmediatamente las muestras patológicas se pueden almacenar en las siguientes condiciones:
 - ⊕ Los pelos, las escamas de piel y las uñas, pueden permanecer almacenadas a temperatura ambiente durante varias semanas sin peligro de deterioro.
 - ⊕ El esputo, el líquido de bronco aspirado, cepillado bronquiales, orina, sangre, materia fecal y los exudados diversos deben permanecer a 4°C por no más de 24 horas.
 - ⊕ El LCR, la médula ósea y los fluidos torácicos y abdominales se mantienen a temperatura ambiente o, de preferencia, en incubación a 30°C, por no más de 24 horas.
 - ⊕ A pesar de esas medidas, debe tenerse en cuenta que puede presentarse márgenes de error, por lo que las muestras deben ser procesadas inmediatamente después de la toma.
- Indicaciones para el paciente: En el caso de las micosis superficiales, evitar que el paciente se aplique tópicamente algún medicamento, por lo menos tres días antes de la toma de muestras. Existen indicaciones específicas para cada caso, por ejemplo en el caso de una toma transbronquial se recomienda al paciente que se lave la boca, no así en el exudado faríngeo.

Técnica de toma de muestras micológicas

- Objetivo: determinar la presencia de estructuras fúngicas en el examen directo de las muestras o el crecimiento de colonias correspondientes a hongos productores de enfermedad en cultivo micológico.

- Alcance: Se le realizará a todos los pacientes que soliciten dicha prueba y que reúnan las condiciones mínimas necesarias para su realización con éxito en el diagnóstico y la identificación de micosis.
- Definiciones: no procede
- Responsabilidades: Técnico y profesional que atienden el cubículo.
- Condiciones de seguridad y bioseguridad: Remitirnos a las normas de bioseguridad del laboratorio de microbiología y cumplir medidas extremas de bioseguridad (campanas de seguridad biológica con aire filtrado e incinerador), en el caso de trabajar con muestras y cultivos presuntivos de hongos altamente patógenos como: C. Immitis, P. Brasiliensis. H. Capsulatum y B. Dermatitides.
- Equipos y materiales o reactivos:
 - ⊞ Tubo de ensayo de 15 X 150 mm, estéril y seco con tapón de algodón
 - ⊞ Tubo de ensayo de 15 X 150 mm, estéril con SSIE
 - ⊞ Tubo de ensayo de 15 X 150 mm, estéril con SSIE más antibióticos
 - ⊞ Frascos de boca ancha estériles y secos
 - ⊞ Pipetas Pasteur estériles con bulbos de goma
 - ⊞ Portaobjetos y cubreobjetos limpios y desengrasados
 - ⊞ Placas de Petri estériles
 - ⊞ Hisopos de algodón
 - ⊞ Jeringuillas de 10 y 20 mL
 - ⊞ Hojas y mango de bisturí
 - ⊞ Espéculo vaginal
 - ⊞ Etanol absoluto a la concentración de 70 %
 - ⊞ Torundas
 - ⊞ Refrigerador
 - ⊞ Mecheros
 - ⊞ Medios de cultivo de agar dextrosa Sabouraud con y sin antibióticos
 - ⊞ Mesa de exploración
 - ⊞ Buena iluminación

Operaciones preliminares

- Interrogatorio al paciente para saber si está apto para la toma de muestras (medicamentos aplicados, etc.)
- Rotulado de placas y tubos

- Desinfección de la zona con torunda estéril impregnada con alcohol 70 %, frotando vigorosamente, siempre que el estado de la lesión y del paciente lo permitan.

Procedimiento

- **Escamas:** Se toman de la periferia de las lesiones cutáneas secas, con ayuda de un bisturí, o el borde de un portaobjeto, se colocan en placa de Petri o portaobjetos, colocándolos debajo del área afectada. En el caso del portaobjetos, colocarle otro encima y envolver en papel estéril hasta su procesamiento.
- Las muestras de tipo exudativo, se toman con hisopo humedecido en SSE y si no se procesa inmediatamente, se coloca el mismo en un tubo de ensayo para transportarlo inmediatamente al laboratorio.
- En lesiones en las que se sospeche pitiriasis versicolor se puede utilizar el método de cinta adhesiva, que consiste en presionar el lado engomado contra la lesión y pegarlo posteriormente sobre un portaobjetos para su observación.
- **Pelos:** Tomar los pelos enfermos utilizando una pinza para depilar, debido a que estos están dañados y rotos inmediatamente después de la emergencia del folículo, estos se desprenden desde la raíz y se colocan en placa Petri, hasta su observación y siembra. En los casos de tiñas del cuero cabelludo, muchas veces es necesario, además de los pelos recolectar mediante raspado, escamas y pus (este último en casos de lesiones inflamatorias o querion).
- **Uñas:** Se debe raspar, ayudado por bisturí, por el lado del lecho ungüéal, o sea por la superficie que está en contacto con el dedo. En lesiones supurativas, se colecta el pus por presión y se recoge con hisopo estéril.
- **Exudados de mucosas**, (*cavidad bucal, vaginal, faríngea, conjuntival y nasal*): Explorar la región afectada y se toma el producto con hisopo, frotando repetidamente las lesiones eritematosas, ulcerosas o donde existan placas blanquecinas. En estos casos la realización del frotis y la siembra inmediata son muy necesarios. Para el transporte de los exudados se introducirá el hisopo en SSE.
- **Exudado ótico:** Debe ser con ayuda de otoscopio. Inspeccionar el oído externo en busca de lesiones o de las colonias de hongos. Introducir hisopo fino y hacer un ligero raspado para obtener la muestra.
- **Productos del tracto respiratorio:** (básicamente son: esputo y muestra por aspirado)
- **Esputo:** Limpieza bucal con desinfectante local, sin gargarismos. Colectar el esputo en recipiente de boca ancha estéril y el menor tiempo posible a

temperatura ambiente. Debe ser el primero de la mañana, obtenido como resultados de tos profunda. Se deben coleccionar tres muestras seriadas.

- **Muestra bronquial y aspirado traqueal:** debe ser realizado por el médico de asistencia, en pacientes debilitados y que no pueden expectorar y en quienes se sospeche micosis pulmonar.
- **Orina:** De ser posible, lo ideal es coleccionar la muestra a través de punción suprapúbica hecha por el urólogo, en caso de que no sea posible, previa asepsia y antisepsia de la región genital, se hará por la técnica del chorro medio con la primera orina de la mañana, utilizando frasco oscuro de boca ancha.
- **Pus:** Previa antisepsia de la región afectada, puncionando el absceso para evitar contaminaciones bacterianas. En caso de drenaje espontáneo por fístula, después de asepsia y antisepsia tomar la secreción con pipeta Pasteur estéril o hisopo de algodón.
- **Líquido céfalo raquídeo:** a través de punción lumbar realizada por el médico, dividiendo la muestra en tres tubos, para estudio citoquímico, bacteriológico y micológico.
- **Médula ósea:** por punción con aguja adecuada partir preferentemente de cresta iliaca., Siempre por médico experto. el material debe ser situado en gasas estériles humedecidas con SSE y conducido de inmediato a su procesamiento.
- **Sangre:** Se requieren de 10 ml de sangre total en tubos de ensayo sin anticoagulante. Una vez separado el suero, se debe conservar en congelación a 0° C, o preferentemente a -70 °C. Es conveniente agregar a la muestra de suero dos gotas de Timerosal por ml, a una concentración de 1: 2000.
- Interpretación de los resultados: Los exámenes directos se informaran como positivos en el caso de que en la observación microscópica se aprecie la presencia de hifas, pseudohifas y/o células levaduriformes., especificando en caso la estructura encontrada.
- En el caso de los cultivos se informará el género y especie de hongo patógeno de que se trate y en el caso de no obtener crecimiento se informará: *no se obtuvo crecimiento de hongos patógenos.*
- En el caso en que se obtenga crecimiento de bacterias o de hongos contaminantes se informará: *muestra contaminada.*

DIAGNÓSTICO DE CANDIDIASIS

Candidiasis es una micosis causada por diversas especies de levaduras del género *Cándida*, en especial *C. albicans*, que es capaz de ocasionar una amplia gama de manifestaciones clínicas en dependencia de la localización de la misma, afectando

fundamentalmente mucosas (boca, vagina, etc.), piel, uñas y de forma excepcional otros órganos como pulmones, aparato génito-urinario, intestinos, etc.

Su diagnóstico microbiológico se basa fundamentalmente en:

- Examen microscópico directo
- Cultivo e identificación
- Pruebas serológicas

Objetivo

- Determinar el género y especie de levadura que se encuentra produciendo infección.

Alcance

- Se le realizará a todas las muestras llegadas al laboratorio con la indicación de estudio micológico en busca de candida.

Definiciones:

- No procede.

Responsabilidad:

- Profesional y técnico que atienden el departamento de Micología.

Condiciones de seguridad y bioseguridad:

- Referidas anteriormente.

Equipos, materiales y reactivos:

- Referidos anteriormente, además de incubadora y refrigerador doméstico.

Operaciones preliminares:

- No procede.

Procedimiento

- La candidiasis puede presentarse en cualquier localización, por lo que los productos patológicos pueden ser muy diversos. Dentro de los más frecuentemente recolectados se encuentran: exudados, escamas epidérmicas, sangre, esputo, orina, LCR, etc.

Examen directo

- El material obtenido se coloca entre cubre y portaobjetos con una gota de KOH 10 o 20 %, en el caso de piel y uñas. También se puede recurrir a diversas tinciones como Gram, Wright, Giemsa, PAS, etc.
- Tanto al directo como en las tinciones pueden observarse grandes acúmulos de blastosporas de 2-4 μ de diámetro durante las infecciones de Cándida.
- La presencia de pseudomicelios o micelios verdaderos, determina el estado patógeno y virulento de la levadura, lo que confirma el diagnóstico.

- En el caso de piel y uñas, donde *Candida* no es flora normal, la observación de levaduras o la obtención de un cultivo puro, hacen el diagnóstico.

Cultivo

- Las diversas especies de *Candida* crecen en la mayoría de los medios habituales como *Sabouraud*, agar sangre, infusión de cerebro corazón y extracto de levadura. Es importante saber que *Candida albicans* crece en medio de Sabouraud-cloranfenicol-cicloheximida, pero algunas especies son inhibidas por esta última (*C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, y *C. zeylanoides*), por lo que se recomienda siempre sembrar en los dos medios de Sabouraud.
- Las características de las colonias son similares en estos medios, crecen de 2 a 3 días a 28-37°C, dando colonias blanquecinas, húmedas, limitadas, opacas y en ocasiones se observa pseudomicelio dentro del agar. En ocasiones se puede observar una coloración blanco amarillento o rosa (*Candida guilliermondii*).
- Hay medios selectivos para el género *Candida*, como el *Biggy*, rico en citratos que eliminan la flora bacteriana y sulfitos que son reducidos a sulfuros, de manera que las colonias se ven de un color café oscuro, lo que las hace distinguibles de otros hongos levaduriformes.
- El hecho de que tengamos un cultivo puro de *Candida* no indica forzosamente una candidiasis, ya que estas integran parte de nuestra flora, por lo que es necesario una estrecha correlación con los aspectos clínicos, para llegar al diagnóstico.

Microscopía de la colonial

- ⊕ Se observan blastosporas, dependiendo de cada especie fluctúan entre 2-10 μ de diámetro, formando gemas de la mitad de su tamaño; en ocasiones se puede observar pseudomicelio, sobre todo cuando provienen de medios pobres o viejos. Se tiñen bien con azul de algodón, PAS, Wright, aunque no se rigen por el Gram, generalmente son positivas, llegando a cambiar cuando las colonias envejecen.
- ⊕ **Tipificación (se basa en pruebas fisiológicas y morfológicas)**
 - **Morfología en agar arroz o harina de maíz:** permite diferenciar las especies de *Candida* de otras levaduras. Como característica de este género, en ese medio pueden observarse pseudohifas, blastosporas y en el caso de *Candida albicans* clamidosporas redondas de pared gruesa, terminales o intercalares.
 - **Formación de tubo germinativo:** la presencia de tubo germinativo nos permite una rápida identificación presuntiva de *Candida albicans*
 - **Crecimiento en medio líquido de Sabouraud:** *C. krusei*, crece en la superficie, dando un velo amplio. *C. tropicalis* también crece en la

superficie pero además produce burbujas. El resto de las especies crecen en el fondo del tubo formando un sedimento.

- **Asimilación de carbohidratos** (*auxanograma del carbono*): se basa en la utilización de determinados carbohidratos como única fuente de carbono. Los patrones de asimilación para las diferentes especies de este género y otras levaduras de interés médico se recogen en tablas y claves de clasificación (ver anexos).
- **Fermentación de los carbohidratos** (*zimograma*): se basa en la producción de gas a partir de determinados carbohidratos. Los patrones de fermentación para las diferentes especies de este género y otras levaduras de interés médico se recogen en tablas y claves de clasificación (ver anexos).
- **Reducción del tetrazolio**: esta prueba puede servir como complemento de otras para la diferenciación de especies:

C. albicans	Colonias crema rosa	
C. tropicales	Colonias rojo violeta	
C. krusei	Colonias rosa	
C. parapsilosis	Colonias blanco mate	
C. guilliermondii	Colonias rojas	

- **Determinación de los serotipos de C. albicans**: mediante la aglutinación en lámina es posible determinar el serotipo (A o B) a que pertenecen las cepas de C. albicans.
- **Pruebas serológicas**: en la candidiasis sistémica es útil la detección de anticuerpos frente a Cándida, con vistas a realizar un diagnóstico rápido, para lo cual se han diseñado un gran número de pruebas. Entre las más utilizadas se encuentran:
 - ✧ **Inmunoprecipitación**: inmunodifusión doble (DID) y la contra inmunolectroforesis (CIEF), fundamentalmente.
 - ✧ **Inmunofluorescencia indirecta** (IFI), para la detección de anticuerpos específicos anti-tubo germinativo.
 - ✧ **Análisis inmunoenzimáticos (ELISA)**: tanto para la detección de anticuerpos como antígenos circulantes (mananos) de Cándida spp, los cuales presentan mayor especificidad.

*La descripción de estas técnicas se realiza en anexo aparte.

DIAGNÓSTICO DE LEVADURAS DE INTERÉS MÉDICO

Formación de tubos germinativos

Descripción de la técnica

- Colocar en una gradilla un número de tubos de ensayo (12 x 75) igual al número de cepas a estudiar, más dos tubos de ensayo destinados a los controles positivo y negativo.
- Distribuir estérilmente 0,1-0,5 mL de suero sanguíneo normal (conejo, equino, humano), clara de huevo o agua peptonada 1 % en cada uno de los tubos a utilizar.
- Con una aguja de inoculación, asa de platino o pipeta capilar tocar una colonia y transferir un pequeño inóculo que se emulsiona en la alícuota de suero.
- Incubar a 37°C durante 2,5-3 horas
- Colocar una gota de suspensión entre cubre y portaobjeto y observar con objetivo de bajo poder de resolución para confirmar la presencia o no de tubo germinativo.

*Cepas conocidas de *Cándida albicans* y *C. tropicalis* deben ser utilizadas como controles positivo y negativo respectivamente.*

Lectura

- Los tubos germinativos se presentan como filamentos hifales laterales con aproximadamente la mitad del ancho y 3-4 veces la longitud de la célula que lo origina y que a diferencia de la pseudohifa no presenta constricción en su punto de origen.

Interpretación de los resultados

- La presencia de tubo germinativo nos permite una rápida identificación presuntiva de *C. albicans*.

Observaciones

- Períodos de incubación de más de tres horas pueden originar resultados falsos positivos
- Inóculos muy concentrados interfieren con la formación de tubo germinativo. Optimo: 10^5 a 10^6 células/mL.
- Cultivos viejos o contaminados inhiben la formación de tubo germinativo.

Morfología en agar harina de maíz o arroz

- **Microcultivo en placa de Petri (*Dalmau*)**
 - ⊞ Prepara agar maíz-tween 80 (1 %) o agar arroz-tween 80 y distribuir en placas Petri a razón 25-30 mL por placa de 20 x 120 mm.

- ⊞ Con una aguja estéril inocular la superficie del medio realizando dos estrías paralelas de 2,5 cm de longitud y a 1 cm de distancia entre sí.
- ⊞ Flamear la aguja y realizar estría perpendiculares a las anteriores de iguales características para diluir el inóculo. Evitar profundizar en el agar en ambos casos.
- ⊞ Coloca un cubreobjetos estéril sobre las estrías realizadas. Incubar 28°C durante 24-72 horas.
- ⊞ Observar al microscopio con la placa de Petri abierta utilizando objetivos de poco aumento.
- ⊞ Una cepa de *C. albicans* conocida se debe utilizar como control.

Lectura e interpretación

- ⊞ Se observan los patrones de crecimiento y se interpretan según la presencia o no de blastosporas, pseudohifas, artrosporas, clamidosporas, etc.
- **Microcultivo o cultivo en lámina para levaduras (*Macdonald y Wegener*)**
 - ⊞ Cubra el fondo de la placa de Petri con papel de filtro
 - ⊞ Introducir en la misma un angular de vidrio de fondo **U** o **V**, un portaobjetos y un cubreobjetos.
 - ⊞ Esterilizar en autoclave durante 15 minutos.

Técnica

- ⊞ Verter 15 mL de agar arroz o harina de maíz-Tween 80 (1 %), en una placa de Petri y dejar solidificar.
- ⊞ Con ayuda de un bisturí, cortar pequeños cuadrados de aproximadamente 0,5 cm².
- ⊞ Colocar sobre el portaobjetos una o más porciones del agar.
- ⊞ Con asa realizar dos estrías en la superficie del bloque de agar, preferentemente en forma de cruz.
- ⊞ Humedecer el papel de filtro con agua destilada estéril e incubar a temperatura ambiente (28°C).
- ⊞ Observar los cultivos después de 24 a 72 horas de incubación.
- ⊞ Añadir azul algodón a los cultivos y colocar el cubreobjeto.
- ⊞ Observar al microscopio.
- **Asimilación de carbohidratos (auxanograma)**
 - Variante I (McGinnis)***

⊞ *Descripción de la técnica*

- Prepara una suspensión de la levadura a estudiar en agua destilada estéril hasta obtener una densidad equivalente al estándar # 4 de McFarland.
- Añadir 1 mL de la suspensión a un tubo de ensayo que contiene de 20 a 25 mL del medio basal para estudios de asimilación de carbohidratos previamente fundido hasta 50°C (YNB Difco Laboratories)
- Mezclar bien y verter el contenido del tubo en placas de Petri. Dejar solidificar.
- Colocar asépticamente sobre la superficie del agar presionando suavemente los discos impregnados con los diferentes carbohidratos a estudiar. Espaciar los discos a fin de evitar la confluencia de los halos de crecimiento.
- Incubar la placa en forma invertida a 30°C y observar diariamente durante 48-96 horas.

⊞ *Lectura e interpretación*

- La presencia de crecimiento alrededor de los disco se considera como una prueba positiva. Los patrones de asimilación para las diferentes especies de *Cándida* y otras levaduras de interés médico, se recogen en tablas y claves de identificación.

Observaciones

- ⊞ Los discos pueden ser sustituidos por gotas de las soluciones de carbohidratos o por 1 mg del producto puro
- ⊞ Algunos especialistas recomiendan realizar pases sucesivos de las cepas a estudiar en medio de extracto de carne para evitar el crecimiento de fondo que resulta de la capacidad de las levaduras para almacenar nutrientes y utilizarlos al encontrarse en medio carente de los mismos.
- ⊞ La técnica de asimilación en medio líquido (Wickerham) no es de uso práctico en laboratorios diagnósticos pues requiere de mucho tiempo para su lectura definitiva (24 días).

• **Asimilación de carbohidratos (auxanograma)**

Variante II (Huppert)

⊞ *Descripción de la técnica*

- Prepara una suspensión densa de un cultivo de 24-48 horas de la levadura a estudiar en agua destilada estéril (densidad equivalente al estándar número 4 de MacFarland)

- Saturar un hisopo estéril en la suspensión de levadura y sembrar la superficie de una placa Petri conteniendo medio basal de asimilación para obtener un crecimiento confluyente (se procede de forma similar al antibiograma bacteriano).
- Dejar secar la placa durante 30 min.
- Colocar asépticamente sobre la superficie del agar los discos impregnados con los diferentes carbohidratos a estudiar. Espaciar los discos a fin de evitar la confluencia de los halos de crecimiento.
- Incubar la placa de forma invertida a 30°C y observar diariamente por 3 días.

Lectura e interpretación

- Igual a la variante I

• **Fermentación de carbohidratos (zimograma)**

⊞ ***Descripción de la técnica***

- A partir de un cultivo puro de 24-48 horas de la levadura a estudiar preparar una suspensión en 2 mL de agua destilada estéril equivalente al estándar 2 de McFarland.
- Con una pipeta estéril añadir 0,2 mL de la suspensión a cada uno de los tubos que contienen los carbohidratos a estudiar agitando ligeramente los mismos.
- Inocular un tubo sin azúcar que será utilizado como control.
- Incubar a 30°C y visualizar diariamente hasta una semana.

⊞ ***Lectura e interpretación***

- Sólo la presencia de gas en el tubo de Durham es interpretada como prueba **positiva**.

Observaciones

- ⊞ Muchos especialistas utilizan un indicador de pH en el medio de fermentación. Un cambio de color en un tubo no inoculado es un índice de contaminación. En un tubo inoculado es un indicador de que el azúcar es asimilado.
- ⊞ Todo carbohidrato que es fermentado es también asimilado, lo contrario no se cumple necesariamente.

• **Crecimiento en medio líquido**

⊞ ***Descripción de la técnica***

- Tomar una asada de un cultivo de 24-48 horas de la cepa de levadura que se desea identificar.

- Inocular un tubo de 13 x 100 conteniendo 2-3 mL de medio líquido de Sabouraud.
- Incubar a 37°C durante 3-4 días.

Lectura

Debe tenerse en cuenta la modalidad del crecimiento del medio:

- En la superficie, formando velo más o menos espeso.
- En el fondo del tubo, formando un sedimento.
- También observar la presencia o no de burbujas.

- **Reducción del tretazolio**

- ⊞ ***Descripción de la técnica***

- La cepa en estudio debe inocularse en el medio de cultivo específico.
 - Incluir cepas controles previamente conocidas.
 - Los medios inoculados deben incubarse a 37°C hasta que el crecimiento se haga evidente.

- Lectura***

- Se realiza teniendo en cuenta el pigmento desarrollado por la cepa, el cual está en dependencia de la especie.

- **Detección de ureasa**

- ⊞ ***Descripción de la técnica***

- Tomar una asada de un cultivo fresco (24-48 horas) de la cepa de levadura a estudiar.
 - Inocular en 1-1,5 mL de medio líquido de urea.
 - Incubar a 30 o 37°C.

- Lectura***

- El cambio de color del indicador rojo fenol del amarillo al rosa púrpura se considera como positiva, en tanto que las cepas ureasa negativas no producen alteraciones del color.

- **Prueba de termotolerancia**

- ⊞ ***Descripción de la técnica***

- Para esto es suficiente con incubar los cultivos a identificar a temperatura ambiental (28°C), a 37°C y a 40°C, en medios de cultivo apropiados según la especie. Generalmente se emplea agar papa dextrosa, agar extracto de malta o agar Sabouraud.

- Lectura***

- Para comprobar la viabilidad o no de la cepa sometida a la prueba, es necesario realizar subcultivo a partir de los medios incubados a diferentes temperaturas. El crecimiento de la cepa original, indica la tolerancia a la temperatura específica a la que fue incubada anteriormente.

- **Asimilación de nitrato**

- ⊞ *Descripción de la técnica*

- Prepara una suspensión en agua destilada estéril a partir de un cultivo de 24-48 horas de la cepa a estudiar, con una densidad equivalente al estándar número 4 de McFarland.
 - Añadir 1 mL a un tubo conteniendo 20 mL del medio basal de asimilación de nitratos (base de carbono para levaduras o equivalente).
 - Verter en placa de Petri de 20 x 100 mm.
 - Dejar solidificar unos minutos.
 - Colocar en una placa un disco de papel de filtro (6 mm de diámetro) impregnado con una solución de nitrato de potasio (# %) y otro con una solución de peptona 3 %.
 - Incubar a 28°C durante 48-72 horas.

- ⊞ *Lectura*

- La presencia de un halo de crecimiento alrededor del disco de nitrato indica que la levadura estudiada utiliza esta sal como única fuente de nitrógeno, por lo tanto la prueba es positiva. En todos los casos debe observarse crecimiento alrededor del disco de peptona, el cual constituye el control de viabilidad y crecimiento de la prueba.

- **Producción de pigmento en medio de ácido caféico**

- ⊞ *Descripción de la técnica*

- A partir de un cultivo de 24-48 horas de la levadura, se inocula por estrías en placas a que contengan e medio de agar caféico. Las placas se pueden incubar a 30 o 37°C por lo menos de 7 días.

- Lectura*

- La aparición de pigmento oscuro en el área del inóculo indica una prueba positiva. Los microorganismos incapaces de utilizar el ácido caféico, no producen cambios de color.

- **Prueba de patogenicidad en el ratón**

- ⊞ *Descripción de la técnica*

- A partir de un cultivo puro de 24-48 horas del microorganismo a estudiar se prepara una suspensión en solución salina.
- Inocular por vía intracerebral en un ratón lactante.
- Observar al animal diariamente hasta el quinto día.

Lectura

- ⊕ Si la cepa en estudio es patógena, el animal muere al término de unos pocos días y durante el estudio histopatológico de sus órganos puede demostrarse la presencia del agente inoculado. Las especies no patógenas pueden ocasionar la formación de microabscesos a diferentes niveles, pero nunca producen la muerte del animal.

DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO DE LA CRIPTOCOCOSIS

- La criptococosis es una micosis sistémica, de curso agudo, subagudo o crónico producida por un hongo levaduriforme, oportunista, encapsulado, el *Cryptococcus neoformans*. En la mayoría de los casos la infección es pulmonar primaria y se disemina al sistema nervioso central, los huesos y la piel. En muy pocos casos se describen infecciones cutáneas de la piel.

El diagnóstico de laboratorio se basa en

- Examen microscópico directo de los productos patológicos.
- Cultivo e identificación.
- Pruebas serológicas.

Objetivo

- Determinar la presencia de *Cryptococcus neoformans* en los productos patológicos estudiados.

Alcance

- Se le realizará a todas las muestras llegadas al laboratorio con la indicación de estudio micológico en busca de *C. neoformans*.

Definiciones: no procede.

Responsabilidad

- Profesional y técnico que atienden el departamento de Micología.

Condiciones de seguridad y bioseguridad: referidas anteriormente.

Equipos, materiales y reactivos

- Referidos anteriormente, además de incubadora y refrigerador doméstico.

Operaciones preliminares: no procede.

Procedimiento

- La toma de la muestra se realiza en dependencia de la localización del cuadro. Puede incluir esputo, LCR, orina, exudados, material de biopsia, suero, etc. Y se efectúa según las normas explicadas anteriormente.
- **Examen directo**
 - ⊕ Es el método de elección para el diagnóstico inicial y se recomienda practicarlo por rutina a todos los casos que tengan manifestaciones neurocerebrales.
 - ⊕ El LCR o la orina se centrifugan y del sedimento se colocan dos gotas en el portaobjetos.
 - ⊕ Enseguida se agrega una gota de **tinta china** para poner de manifiesto a través del microscopio la presencia la cápsula sobre un fondo negro y dentro de la cápsula el cuerpo redondo de la levadura gemando.
 - ⊕ El esputo debe ser tratado con NAOH 10 % para observar las levaduras capsuladas características.
 - ⊕ A partir de las muestras también se pueden realizar frotis, fijando al calor y agregando, extendiendo una gota de tinta china o **nigrosina**, por refringencia con el microscopio se puede observar fácilmente el cuerpo de la levadura y el halo de la cápsula.
- **Cultivo**
 - ⊕ Los medios de cultivo más utilizados son Sabouraud, extracto de levadura, agar BHI, no se debe sembrar en medios conteniendo cicloheximida, ya que esta inhibe el crecimiento de *C. neoformans*. El desarrollo se obtiene de dos a tres días, a temperatura ambiente o a 37°C.
 - ⊕ Las colonias son limitadas, mucoides, convexas, de color blanco amarillento y dan un aspecto de "leche condensada", raras veces toman un rosa pálido.
 - ⊕ Al microscopio se observan células levaduriformes de aproximadamente 4 a 8 μ de diámetro con blastosporas de la mitad de su tamaño, ambas con todo y la cápsula llegan a medir hasta 20 μ de diámetro.
 - ⊕ Un medio de cultivo selectivo para *C. neoformans*, es a base de semillas de "alpiste negro" (*Guizotia abyssinica*), donde genera colonias con pigmento café-marrón, que se distinguen de otros géneros y especies.

Pruebas especiales

- **Producción de ureasa:** descrita anteriormente. En este caso después de inoculado el medio de urea se incubaba a 37°C durante 4-6 horas o a temperatura ambiente durante tres días y se observará el cambio de color del medio de amarillo a rosado por alcalinización del mismo. Todas las cepas de *C. neoformans* desdoblan la urea.

- **Asimilación de inositol:** el medio de base de inositol se prepara de la misma manera en que fue descrito para el auxanograma de *Cándida*, sólo que en este caso se le adiciona inositol. El medio se inocula con una asada del microorganismo y se incuba a temperatura ambiente por cinco a siete días. En caso de ser positiva la prueba se observará crecimiento abundante sobre la superficie del medio.

El género *Cryptococcus* es la única levadura que da positiva la prueba y aunque *Trichosporum* también asimila el inositol, la diferencia morfológica es tan marcada que permite diferenciarlo fácilmente.

- **Auxanograma:** el medio se prepara de la misma manera que para *Cándida*, adicionando azúcares de igual forma, los más empleados son glucosa, dextrosa, galactosa, maltosa, rafinosa, celobiosa, trealosa y xilosa. Los medios se incuban a temperatura ambiente de 5 a 7 días y se procede a realizar la lectura.
- **Zimograma:** preparación del medio descrita anteriormente. El género *Cryptococcus* no fermenta los azúcares y por tanto el resultado es negativo.
- **Crecimiento a 37°C (prueba de termotolerancia):** se inocula medio de Sabouraud simple y se incuba a 37°C durante tres días al cabo de los cuales se valora si hubo crecimiento. *C. neoformans* crece a esta temperatura.
- **Morfología en agar maíz:** en este medio de cultivo las cepas de *C. neoformans* no forman filamentos, solamente blastoconidias alrededor de las estrías.
- **Producción de pigmento en medio de ácido caféico:** *C. neoformans* es siempre positivo a esta prueba. Otros del género pueden presentar pigmentos más claros como el *C. terreus*.
- **Patogenicidad en el ratón:** si la cepa en estudio corresponde a *C. neoformans*, el ratón muere a los pocos días de ser inoculado y el estudio histopatológico de los órganos puede demostrar la presencia de células levaduriformes encapsuladas. Las otras especies del género no son patógenas para el ratón.

Pruebas inmunológicas

- Las técnicas serológicas tradicionales en busca de anticuerpos circulantes, como fijación del complemento, DID, CIEF, no son recomendables, ya que la producción de anticuerpos anti-*Cryptococcus* es escasa. Como herramienta para el diagnóstico se utilizan las pruebas en busca de antígenos.
- La técnica de elección es la **aglutinación de látex**. al agregar suero, LCR u orina con contenido de antígenos circulantes a las partículas de látex sensibilizadas con anticuerpos anti-*Cryptococcus* se produce reacción de aglutinación la cual es de alta especificidad; la sensibilidad varía entre 90 y 95 %

- ***Inmunofluorescencia indirecta***: se utiliza para detectar la presencia de anticuerpos en suero.
- ***ELISA***: es la técnica más sensible para la detección de anticuerpos, aunque el número de “falsos positivos” es mayor que con la prueba de aglutinación de látex.
- ***Intradermoreacción***: hasta el momento no se ha obtenido antígeno estandarizado (criptococquina) que permita evaluar la hipersensibilidad tardía en esta enfermedad, y con los antígenos que se ha procesado se ha demostrado que esta prueba no tiene valor diagnóstico.

DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO DE LA HISTOPLASMOSIS

- Es una enfermedad granulomatosa, principalmente pulmonar causada por la inhalación de conidios del hongo dimórfico llamado *Histoplasma capsulatum*. De inicio afecta a los pulmones y se disemina a otros órganos.

Objetivo

- Determinar la presencia de *Histoplasma capsulatum* en los productos patológicos estudiados.

Alcance

- Se le realizará a todas las muestras llegadas al laboratorio con la indicación de estudio micológico en busca de *Histoplasma capsulatum*

Definiciones: no procede.

Responsabilidad

- Profesional y técnico que atienden el departamento de Micología.

Condiciones de seguridad y bioseguridad

- Referidas anteriormente y además tener en cuenta que la fase filamentosa, debe manejarse con un índice alto de seguridad, ya que estos medios reproducen las condiciones ecológicas de la forma infectante.

Equipos, materiales y reactivos

- Referidos anteriormente, además de incubadora y refrigerador doméstico.

Operaciones preliminares: no procede.

Procedimiento

- Productos patológicos: cuando se sospecha histoplasmosis en un paciente, los productos patológicos más frecuentes son: esputo y otras secreciones respiratorias, sangre, médula ósea, LCR, orina, biopsias de piel y mucosas, hígado, bazo y cerebro. Las muestras se toman según se explicó antes.

Examen directo

- Es poco útil, debido a que las levaduras de *H. capsulatum* son muy pequeñas e intracelulares, y normalmente pasan inadvertidas.
- **Procesamiento de las muestras**
 - ⊕ **Espuito y otras secreciones respiratorias:** deben recogerse temprano en la mañana, durante al menos tres días consecutivos, previo enjuague vigoroso de la boca. El volumen de la muestra debe ser de unos 10-15 mL. Es recomendable además del examen directo y el cultivo, realizar inoculación en animales de experimentación.
 - ⊕ **Sangre:** muestra muy útil. Inocular 10 mL de la muestra en frascos de hemocultivos con medios bifásico (BHI con 10 % de sangre de carnero) Incubar a 37°C, paralelamente hacer pases semanales a medios agarizados con sangre. Incubar a 37°C; paralelamente hace pases a agar Sabouraud e incubar a 25-30°C. La correcta aereación de estos cultivos es fundamental para lograr el crecimiento esperado.
 - ⊕ **Médula ósea:** también resulta una muestra muy útil para el aislamiento. Se debe sembrar en medios con y sin sangre e incubar a 37°C y 25-30°C respectivamente.
 - ⊕ **Orina y LCR:** centrifugar y sembrar el sedimento en agar infusión de cerebro corazón (BHI) e incubar a 37°C y en agar Sabouraud con antibióticos a 25-30°C.
 - ⊕ Los cultivos son los que dan el diagnóstico de certeza de la histoplasmosis. Sin embargo no en todos los casos son factibles de obtener.
- **Tinciones**
 - ⊕ Son técnicas más rápidas y útiles, se pueden realizar a partir de esputo, otras secreciones, o de fragmentos de biopsias. Las tinciones de preferencia son PAS, Giemsa, Wright. Las levaduras de *H. capsulatum*, se observan de color azul oscuro, intracelulares, pequeñas, redondas a ovoides de 1-4 μ rodeadas por un halo que semeja en una cápsula, con brotes o yemas de unión estrecha con la célula madre.

Cultivo

- Se recomienda que el primocultivo se realice en Sabouraud antibiótico. Se mantienen a 25°C durante dos a tres semanas.
- **Morfología colonial:** se han descrito dos tipos morfológicos de las colonias: el tipo **A** (albino) y el tipo **B** (brown), las cuales como su nombre lo indica, difieren en su color blanco y color ante o marrón respectivamente. Ambas tienen aspecto algodonoso, liso o cerebriforme.
- **Morfología microscópica:** se observan macroconidios tuberculados de 14-18 micras, generalmente redondos, que nacen de conidióforos angostos;

también se observan microconidios de dos a 4 micras, esféricos, de pared lisa, que nacen de conidióforos cortos y angostos, dispuestos en ángulo recto a la hifa vegetativa. El tipo **B** produce mayor número de microconidios que el tipo **A**.

La morfología de la colonia es indistinguible de otros hongos contaminantes, por lo que es necesario la demostración de los macroconidios tuberculados y la **conversión a fase levaduriforme**, que se obtiene por incubación en agar sangre o BHI a 37°C, agregando 2-3 mL de caldo BHI, o medio líquido de Sabouraud.

La colonia levaduriforme al principio es blanca, lisa y pegajosa y su examen microscópico muestra una mezcla de pseudohifas, hifas en proceso de conversión y levaduras no gemantes. Posteriormente la colonia toma un aspecto cremoso y su examen microscópico permite observar las levaduras gemantes, ovals de dos a cuatro micras de diámetro. Los blastoconidios se encuentran en el extremo angosto de la levadura, tienen cuello estrecho con aspecto de fino filamento.

Pruebas inmunológicas

- Según algunos autores estas pruebas son positivas en aproximadamente el 90 % de los casos de histoplasmosis sistémica, pero esta proporción es mucho menor en infecciones localizadas o asintomáticas en individuos inmunodeprimidos.
- La prueba de **fijación del complemento** es más sensible que la **inmunodifusión**, mientras que esta es más específica. La aparición de bandas **H** y **M** le confieren alta especificidad a esta prueba:
 - ⊕ **Banda M:** indica infección activa o pasada, o la aplicación reciente de la prueba intradérmica de histoplasmina.
 - ⊕ **Banda H:** indica infección activa, casi siempre parece acompañada de la banda M.
- También se puede realizar aglutinación por látex, donde se mezcla suero con partículas de látex cubiertas con histoplasmina.
- Además de estas pruebas se puede realizar CIEF y ELISA.

Prueba intradérmica de histoplasmina

- Consiste en la inoculación de 0,1 mL de antígeno metabólico obtenido del filtrado de un cultivo de la fase filamentosa de *H. capsulatum* (histoplasmina), previamente diluido y estandarizado. La lectura de la prueba se realiza a las 48-72 horas.
- Su positividad está dada por la formación de una zona de induración con un diámetro mayor de 5 mm. Se considera que esta prueba es positiva entre los 15 y 40 días siguientes a la infección. Su valor diagnóstico es limitado,

sin embargo, ha sido una herramienta importante en el conocimiento de la epidemiología de la histoplasmosis ya que ha permitido delimitar las áreas endémicas. En las formas graves de la histoplasmosis la negativización de la intradermorreacción es índice de mal pronóstico.

DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO DE LA ASPERGILOSIS

- Con este término se engloba a un grupo de enfermedades causadas por varios miembros del género *Aspergillus*. Estas enfermedades infecciosas, la mayoría de las veces son de tipo oportunista, y en algunos casos el agente etiológico se comporta como patógeno primario.

El diagnóstico de laboratorio de las diferentes formas clínicas se basa en

- Examen directo y cultivo de los productos patológicos
- Examen histopatológico
- Pruebas serológicas

Objetivo

- Determinar la presencia de especies de *Aspergillus* en los productos patológicos estudiados.

Alcance

- Se le realizará a todas las muestras llegadas al laboratorio con la indicación de estudio micológico en busca de *Aspergillus*.

Definiciones: no procede.

Responsabilidad

- Profesional y técnico que atienden el departamento de Micología.

Condiciones de seguridad y bioseguridad: referidas anteriormente.

Equipos, materiales y reactivos

- Referidos anteriormente, además de incubadora y refrigerador doméstico.

Operaciones preliminares: no procede.

Procedimiento

Productos patológicos a estudiar:

- Esputo
- Producto de raspado de colonias superficiales
- Piezas de biopsia
- Sangre

Examen directo

- El producto patológico se observa entre cubre y porta agregando KOH 15 %
- Se observan filamentos largos, ramificados y septados, en algunos casos, como la aspergillosis pulmonar, se pueden observar cabezas aspergilaes y conidios en gran cantidad.
- En casos de aspergilosis ótica, el producto se toma con hisopo con ayuda del otoscopio; la observación directa por el microscopio se hace agregando una gota de azul de algodón, lo que pone en evidencia las estructuras mencionadas.
- En el caso de la onicomicosis y úlceras necróticas se observan hifas delgadas, tabicadas y hialinas.
- En los casos esporádicos de micetoma por *Aspergillus nidulans*, se ven granos eumicéticos blancos que miden de 1-3 mm, redondos.

Cultivo

- Se deben realizar en medios ordinarios, teniendo en cuenta que la cicloheximida puede inhibir algunas especies de *Aspergillus*.
- Deben sembrarse al menos dos tubos de cada medio e incubar a temperatura ambiente (25-28°C) y 37°C. Muchas de las especies son termotolerantes. Es importante hacer cultivos repetidos a intervalos separados (de días).

Identificación

- ⊞ Las colonias se desarrollan rápidamente, de 3 a 4 días. Cada especie tiene una morfología característica. Al microscopio se observan las clásicas colonias aspergilaes. Las características micológicas de cada especie se explican posteriormente.
- ⊞ Se conocen unas 170 especies de *Aspergillus*, aunque hay autores que citan unas 600 especies.

Se pueden identificar por las siguientes características:

- ⊞ Pigmentación de la colonia en anverso y reverso (en medios de agar Czapek y agar extracto de malta)
- ⊞ Forma y longitud del conidióforo
- ⊞ Forma de las vesículas
- ⊞ Presencia de métulas
- ⊞ Posición de las fiálides
- ⊞ Tamaño y longitud de las cadenas de conidios
- ⊞ Pigmento en el medio de cultivo

El género *Aspergillus* se caracteriza por la presencia de conidióforos más o menos largos que terminan en una vesícula ensanchada que lleva las células

conidiógenas (fiálides sin collarete). Estas fiálides pueden salir directamente de la vesícula o a partir de otras células intermedias llamadas métulas. Los conidios (fialosporos) son unicelulares y se disponen en cadenas acropétalas. Son de colores muy variados, responsables de los colores de la colonia.

Es importante señalar que el sólo aislamiento de una especie de aspergillus de una muestra clínica, incluso de Aspergillus fumigatus, no es suficiente para hacer el diagnóstico de aspergilosis.

Característica de las especies de mayor importancia médica

Desde el punto de vista clínico las más importantes son:

- Fumigatus, Níger, Flavus, Terreus

Aspergillus fumigatus

- Colonias blancas al principio
- Reverso incoloro o rojo
- Conidióforos 330 μ lisos, incoloros
- Cabeza hasta de 100 μ
- Vesícula en forma de masa
- Uniseriado (sólo fiálides)
- Conidios redondos, verdes, equinulados, de 2,5-3 μ
- Crece a 57°C

Aspergillus flavus

- Colonias verde amarillentas
- Reverso rojo a rosado
- Cabazas radiadas, 300-400 μ
- Vesículas grandes, hemisféricas, 20-60 μ
- Uniseriado o biseriado (fiálides y métulas)
- Conidios redondos a piriformes, equinulados, de 3,5-4,5 μ

Aspergillus niger

- Colonias blancas al principio, que pueden volverse amarillas y que rápidamente se torna de color negro
- Reverso de color gamuza a crema (a diferencia de los hongos dematiáceos)
- Conidióforos largos y lisos
- Vesícula esférica, grandes métulas (biseriado)
- Fiálides pequeñas, conidios negros

Aspergillus terreus

- Colonias de color crema-beige a marrón, algodonosas al principio, después granulosas
- Pliegues radiales irregulares
- Vesículas pequeñas (15 μ), en forma de cúpula
- Biseriado, cadenas cortas de conidios elípticos (2-3 μ)
- Saprofito frecuente de suelo y aire

Aspergillus nidulans

- Colonias verde amarillentas a marrón
- Presencia de cleistotecios
- Reverso rojizo
- Vesículas biseriadas, columnares
- Conidios redondos, verdes, equinulados

Pruebas serológicas

Las más empleadas en la aspergilosis son las de inmunoprecipitación. Para la detección de anticuerpos se emplean:

- Inmunodifusión doble
- Contraelectroforesis
- Inmunoelectroforesis
- Inmunofluorescencia
- ELISA

Estas pruebas son específicas de especie. El número de arcos varía según las formas clínicas. Pueden desaparecer 2-5 meses después de la curación. Se detectan anticuerpos precipitantes en 50-70 % de las formas pulmonares alérgicas y en 90 % de los aspergilomas; en las formas diseminadas el valor de la serología está menos precisado.

DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO DE LA MUCORMICOSIS

- La mucormicosis es la infección micótica oportunista causada por los miembros del orden mucorales. Son hongos primitivos, de crecimiento rápido, saprofitos y de gran ubicuidad; que se caracterizan por producir cuadros agudos rinocerebrales y pulmonares fundamentalmente en diabéticos descompensados y en inmunodeprimidos.
- La vía de entrada más frecuente es la respiratoria; también existe la implantación oral, nasal, y conjuntival y la inoculación cutánea por

traumatismos, cirugías y aplicación de material contaminado. Sus agentes etiológicos tienen cierta predilección por la invasión de los vasos sanguíneos, causando embolismo y la subsecuente necrosis del tejido circundante.

Objetivo

- Determinar la presencia de especies de hongos mucorales en los productos patológicos estudiados.

Alcance

- Se le realizará a todas las muestras llegadas al laboratorio con la indicación de estudio micológico en busca de mucormicosis.

Definiciones

- El género más comúnmente asociado a este padecimiento es el *Rhizopus* y con menor frecuencia el *Rhizomucor*, *Mucor*, y *Absidia*.

Responsabilidad

- Profesional y técnico que atienden el departamento de Micología.

Condiciones de seguridad y bioseguridad

- Referidas anteriormente.

Equipos, materiales y reactivos

- Referidos anteriormente.

Operaciones preliminares

- No procede.

Procedimiento

Los productos patológicos fundamentales son:

- Esputo
- Tejido necrótico
- Exudados
- Raspado de cornetes superiores
- Material de biopsia
- Lavados bronquiales
- Heces fecales

Examen directo

- Las muestras se procesan con KOH 10 %.
- Al microscopio de observan numerosas hifas cenocíticas (no tabicadas), hialinas, dicotómicas, anchas y de pared fina, de aproximadamente 5 μ de

ancho por 20-50 μ de largo. Esta imagen se considera patognomónica. A veces muestran ensanchamientos bulbosos y ramificaciones irregulares.

Cultivo

- Es de menor importancia porque los hongos mucorales suelen ser flora habitual de vías respiratorias, además son contaminantes muy frecuentes y deben hacerse repetidamente para evitar confusiones.
- Los medios empleados son Sabouraud dextrosa y papa dextrosa agar, estos hongos son inhibidos por la cicloheximida.
- Incubación de 3-5 días a temperatura ambiente.
- Todos los hongos mucorales dan colonias vellosas, algodonosas, blanco-grisáceas, que llenan los tubos o las placas de Petri.

Identificación

- La tipificación se lleva a cabo en base a los criterios micromorfológicos, por la peculiaridad de los elementos de fructificación en forma de estructuras cerradas (esporangios), de cada especie; que están sostenidos por una estructura especializada de una hifa que se denomina esporangio foro.

Características de las especies de importancia médica más frecuentes

- ***Rhizopus***: los esporangióforos se producen en grupos por encima de los rizoides.
- ***Mucor***: los esporangióforos se producen a lo largo de la hifa y no se observan rizoides en su nacimiento
- ***Absidia***: los esporangióforos se producen entre los nodos o protuberancias a partir de los cuales se producen los rizoides.

Pruebas inmunológicas

- No hay procedimientos serológicos, ni intradermorreacción para el diagnóstico.

DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO DE LA ESPOROTRICOSIS

- La esporotricosis es una micosis subcutáneas, producida por un hongo dimórfico denominado *Sporothrix schenckii*. Es de curso subagudo o crónico. Fundamentalmente afecta piel y linfáticos y excepcionalmente huesos, articulaciones y otros órganos. (vísceras y pulmones).
- La vía de entrada fundamental es a través de traumatismos cutáneos, que inoculan el microorganismo y hay una segunda vía más rara que es la respiratoria.

- Las manifestaciones clínicas se caracterizan por pápulas chancroides que se agrandan, se rompen y se ulceran. Estas lesiones aparecen generalmente a lo largo de los linfáticos que drenan a al sitio de inoculación primario.

Objetivo

- Determinar la presencia de *Sporothrix schenckii* en los productos patológicos estudiados.

Alcance

- Se le realizará a todas las muestras llegadas al laboratorio con la indicación de estudio micológico en busca de esporotricosis.

Definiciones

- No procede.

Responsabilidad

- Profesional y técnico que atienden el departamento de Micología.

Condiciones de seguridad y bioseguridad

- Referidas anteriormente.

Equipos, materiales y reactivos

- Referidos anteriormente.

Operaciones preliminares:

- No procede.

Procedimiento

Los productos patológicos fundamentales son:

- Pus de lesiones cutáneas
- Material obtenido por biopsia
- Material obtenido por punción
- Esputo

Examen directo

- Es poco útil para esta micosis, ya que el parásito no se visualiza ni aun cuando se realice frotis con PAS. En casos excepcionales se observan levaduras redondas u ovoides, cuerpos en forma de cigarro o cuerpos asteroides.

Cultivo

- Es el mejor método para establecer el diagnóstico; se toman secreciones directamente de las lesiones con asa o hisopo, puede realizarse también de

la expectoración, linfa, sangre, etc. Los medios de cultivo más adecuados son: agar Sabouoraud dextrosa y Sabouoraud cicloheximida.

- Se deben incubar a temperatura ambiente durante 5-8 días. A partir del primocultivo se puede demostrar el dimorfismo, resembrando las colonias en medios de cultivo ricos como agar sangre o BHI agar a 37°C, durante 5 días (prueba confirmatoria de *S. Schenkii*).

Identificación

- ***Morfología fase filamentosa:*** tamaño limitado, llena el tubo en aproximadamente 10 días. Al inicio las colonias son beige, posteriormente café oscuras. Con aspecto membranoso, radiadas, con escaso micelio aéreo y ligeramente acuminadas.
- ***Micromorfología:*** hifas delgadas, serptadas, ramificadas, y hialinas. Su reproducción es a base de microconidias que se disponen alrededor de un conidióforo, como si fuese una "margarita" y otras que nacen directamente desde las hifas (microaleurioconidias).
- ***Macromorfología fase levaduriforme:*** las colonias se desarrollan en 3-5 días, presentándose en forma levaduriforme, cremosa-blanco amarillentas, ligeramente acuminadas. Son colonias muy similares a las bacterianas.
- ***Micromorfología:*** células levaduriformes (blastoconidias), ovoides o alargadas, de aproximadamente 5 μ . En ocasiones se observan residuos de micelio (proveniente del dimorfismo); si estas se obtienen del primocultivo, sólo se ven células levaduriformes.

Intradermoreacción

- Se realiza con el antígeno en fase micelial, (esporotricina M), estandarizado, y a una dilución 1:2000. Se aplica como cualquier cutirreacción, en el antebrazo, inyectando una décima. La lectura se realiza a las 48 horas y una respuesta de más de 5 mm de induración y eritema se considera positiva. El criterio de esta prueba es patognomónico de la infección.

Pruebas serológicas

- Las más realizadas son las determinaciones de precipitinas y aglutininas como precipitación en tubo y capilar. Son técnicas poco útiles para el diagnóstico, pero sí para el pronóstico, en particular en los casos graves y diseminados.

DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO DE LAS DERMATOFITOSIS

Las dermatofitosis o tiñas son infecciones producidas por hongos denominados dermatofitos, que se dividen en tres géneros: *Trichophyton*, con 28 especies; *Microsporum*, con 20 especies y *Epidermophyton*, con 1 especie; que tienen tendencia a invadir los tejidos queratinizados de la piel y los anexos (pelos y uñas).

Son unas de las micosis más frecuentes y constituyen del 20 al 25 % de las consultas dermatológicas.

Objetivo

- Determinar el género y especie del hongo dermatofito que se encuentra produciendo infección.

Alcance

- Se le realizará a todas las muestras llegadas al laboratorio con la indicación de estudio micológico.

Definiciones

- No procede.

Responsabilidad

- Profesional y técnico que atienden el departamento de Micología.

Condiciones de seguridad y bioseguridad

- Referidas anteriormente.

Equipos, materiales y reactivos

- Referidos anteriormente, además de incubadora y refrigerador doméstico.
- Operaciones preliminares: no procede.

Procedimiento

- Una vez llegadas las muestras al departamento se procederá a realizar el **examen directo** de las escamas de piel, pelos, uñas, colocándolos en solución de hidróxido de Potasio al 15 o 20 %, entre cubre y portaobjetos, dejando que la solución actúe por espacio de 5 o 10 minutos. a esta solución se le puede añadir dimetilsulfóxido (DMSO) en proporción de 4 partes de DMSO y 60 partes de hidróxido de potasio.
- Pasados 5 a 10 minutos, se procede a la observación microscópica de la preparación.

Interpretación de los resultados

- Escamas de piel y uñas: en el caso de ser positiva la prueba se observan filamentos septados, ramificados y/o fragmentados en artroconidios rectangulares o redondos, distribuidos irregularmente en las escamas. En ocasiones es difícil la identificación de los filamentos, sobre todo cuando el paciente está bajo algún tratamiento médico, tópico o general.
- También pueden observarse filamentos en vías de desnaturalización o hialinos, muy irregulares y fragmentados. Es importante diferenciar los filamentos de los dermatofitos de los de hongos contaminantes y de artefactos o fibras, así como del mosaico fúngico.

- Mosaico fúngico: Son las estructuras formadas por la precipitación del KOH, estas son alargadas y poliédricas, refringentes y de diámetro más o menos irregular.
- En el caso del examen de pelos se pueden observar dos tipos de infecciones:
 - ⊞ Infección ectotrix: Se observan conidias en la superficie del pelo. Existen tres tipos de infección:
 - Microspórica: se observan pequeñas conidias (2μ de diámetro), en masa, a escasos milímetros de la emergencia del pelo, formando vainas.
 - Microide: se observan cadenas de pequeñas conidias (2μ de diámetro) en la superficie del pelo
 - Megaspórica: se observan cadenas de grandes conidias (4 a 5μ de diámetro) en el exterior del pelo.
 - ⊞ Infección endotrix: Se observan conidias y/o filamentos en el interior del pelo (4μ de diámetro).

Cultivo

- La muestra debe ser sembrada en tubos de agar Sabouraud con cloramfenicol y agar Sabouraud cloramfenicol/cicloeximida, empleando generalmente el mismo bisturí con que se tomó la muestra.

Objetivo:

- Obtener el crecimiento de colonias de las diferentes especies de dermatofitos presentes en la muestra.

Alcance

- Se le realizará a todas las muestras llegadas al laboratorio para ese fin, después de realizado el examen directo, si este fue posible.

Definiciones

- No procede.

Responsabilidades

- Técnico y profesional que atienden el cubículo.

Condiciones de seguridad y bioseguridad

- Remitirnos a las normas de seguridad y bioseguridad del laboratorio.

Equipos, materiales y reactivos

- Referidos anteriormente.

Operaciones preliminares

- Toma de muestra de escamas de piel, pelo y uñas y examen directo a dichas muestras.

Procedimiento

- Con el mismo bisturí con que se tomó la muestra se realizan cortes longitudinales en la cuña de agar tratando de depositar el contenido de la hoja del bisturí sin llegar a la pared posterior del tubo. Posteriormente se tapa el tubo y se deposita en gradillas en posición vertical a temperatura ambiente, realizando lecturas diarias con el fin de detectar el crecimiento de las colonias de **dermatofitos**. El crecimiento de las colonias de dermatofitos es lentos, de 8 a 20 días, a una temperatura de 25°C.

Interpretación de los resultados

- El diagnóstico y clasificación de los dermatofitos se basa en las características morfológicas macroscópicas y microscópicas de la colonia, así como en sus características fisiológicas y nutricionales.
- La morfología macroscópica es muy útil y en ocasiones, puede ser suficiente para identificar una especie.
- Las colonias de los dermatofitos generalmente son de colores claros (blanco, crema, amarillo, rosado), aunque existen especies de colores más oscuros como *Trichophyton violaceum* y algunas cepas de *Trichophyton rubrum*.
- Pueden ser algodonosa, pulverulentas o aterciopeladas, con pliegues radiales o irregulares. Los pigmentos vertidos al medio de cultivo pueden ser de color amarillo-naranja, marrón, rojo vino, rosado, negro, etc., en dependencia de cada especie. Estas características se toman a partir del crecimiento d colonial en agar Sabouraud sin inhibidores. Por lo tanto una vez observada la colonia de hongo, esta debe ser sembrada en agar Sabouraud simple, para que desarrollen todas sus características.

Observación microscópica de las colonias

- Se toma un fragmento del micelio con aguja o asa angular y se coloca entre cubre y porta objetos con una gota de lactofenol azul de algodón. Sin embargo, lo más aconsejable es realizar un microcultivo o cultivo en lámina, utilizando medios pobres que induzcan o favorezcan la esporulación, como el agar arroz o el agar maíz y permitan observar el hongo en su crecimiento. (la técnica será descrita posteriormente)
- En cualquiera de los dos casos deben observarse las siguientes estructuras:
 - ⊕ Hifas septadas o ramificadas
 - ⊕ Hifas especiales: hifa en espiral, hifas pectinadas
 - ⊕ Conidias: macroconidios y microconidios.

- Para la identificación de dermatofitos puede ser suficiente la observación de sus características morfológicas. Sin embargo, en algunas ocasiones es necesario hacer estudios adicionales de acuerdo a las exigencias fisiológicas y nutricionales de algunas especies.

Técnica de microcultivo

Objetivo

- Observación de las estructuras características de las diferentes especies de dermatofitos, tales como:
 - ⊕ Hifas septadas o ramificadas
 - ⊕ Hifas especiales: hifa en espiral, hifas pectinadas
 - ⊕ Conidias: macroconidios y microconidios.

Alcance

- Se le realizará a todas las colonias de dermatofitos obtenidas de cultivo en Sabouraud agar.

Definiciones

- No procede.

Responsabilidades

- Técnico y profesional que atienden el cubículo.

Condiciones de seguridad y bioseguridad

- Remitirnos a las normas de seguridad y bioseguridad del laboratorio.

Equipos, materiales y reactivos

- Referidos anteriormente.

Operaciones preliminares

- Obtención de colonia de dermatofito en cultivo en Sabouraud agar.

Procedimiento

- Se toma una porción de agar arroz o maíz de aproximadamente 1 cm² con un grosor de 3 mm y se coloca en un portaobjetos estéril, inoculándose con asa angular un fragmento de la colonia en cada una de las esquinas del fragmento de agar, se coloca posteriormente un portaobjetos estéril se incuba la preparación a temperatura ambiente en cámara húmeda por espacio de 7 a 10 días.

Interpretación de los resultados

- Una vez transcurrido el tiempo necesario se levanta el cubreobjetos y se coloca sobre un portaobjetos con una gota de lactofenol azul de algodón y se desecha el agar y se coloca sobre el portaobjetos que lo contenía una

gota de lactofenol azul de algodón y se coloca un cubreobjetos, quedando de esta forma dos láminas listas para observar.

- En la observación microscópica aparecerán las diferentes estructuras características de cada especie. En documento anexo se presenta un cuadro con las estructuras que se observan en cada especie de **dermatofito**.

Pruebas especiales para el diagnóstico de los dermatofitos

Prueba de la ureasa

- Es útil para diferenciar *T. Mentagrophytes* de *T. Rubrum*. El primero desdobra la urea hasta amoníaco con el consiguiente aumento del pH y cambio en el color del medio. *T. Rubrum*, no produce ureasa. Puede existir variación entre cepas de una misma especie.

Operaciones preliminares

- Obtener cultivo puro de *Trichophyton*.

Procedimiento

- Se toma un fragmento de la colonia y se pasa a un tubo de 13 x 100 conteniendo 1-2 mL de medio de urea líquido o cuña de agar urea, se incuba a temperatura ambiente (28-30 °C) y se realiza la lectura a los 7 días.

Interpretación de los resultados

- En las cepas de *T. mentagrophytes* el medio se observará rosado intenso y en las cepas de *T. Rubrum* el medio mantendrá su color inicial (amarillo).

Perforación del pelo "in vitro"

- Es otra prueba útil para diferenciar las dos especies antes mencionadas.

Operaciones preliminares

- Obtener cultivo puro de *Trichophyton*.

Procedimiento

- Se colocan fragmentos de 1-2 cm de pelo de niña impúber, preferiblemente rubios en una placa de Petri. Se esterilizan en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.
- Se añade agua destilada estéril (10 mL) y 4 ó 5 gotas de una solución acuosa de extracto de levadura (10 %) estéril.
- Observar microscópicamente al menos 1-2 veces por semana, incubar hasta 4 semanas a 28-30 °C.

Interpretación de los resultados

- La prueba se considera positiva por la presencia de perforaciones cónicas perpendiculares al eje del pelo.

Crecimiento en medio de arroz

- Esta prueba se realiza con el fin de diferenciar la especie de *Microsporum canis* de *M. audouinii*

Operaciones preliminares

- Obtener cultivo puro de *Microsporum*.

Procedimiento

- En un frasco Erlenmeyer de 50 mL de capacidad se colocan 8g de arroz pulido con 25 mL de agua destilada.
- Esterilizar en autoclave durante 15 min. a 121°C. Sobre la superficie se colocan fragmentos de la colonia de *Microsporum* que se quiere estudiar. Se incuba a 28-30°C, durante 7 a 10 días.

Interpretación de los resultados

- Se observa la aparición de una coloración amarillo-naranja sobre los granos de arroz, donde hay crecimiento micelial, indicando la presencia de la especie de *Microsporum canis*.

Prueba de la Lámpara de Wood

- Se utiliza para diferenciar algunas infecciones cutáneas de origen fúngico.

Operaciones preliminares

- No procede.

Procedimiento

- Aplicar en un cuarto oscuro un haz de luz ultravioleta de 365 nm sobre las lesiones cutáneas. Se utiliza muy comúnmente para demostrar la infección por *M. canis* sobre todo en niños.

Interpretación de los resultados

- Las escamas y los pelos infectados muestran una fluorescencia verde brillante.
- La luz de Wood también produce una fluorescencia amarillo oro en las lesiones de pitiriasis versicolor, causadas por *Malassezia furfur*.

Producción de pigmento

- Se realiza en el medio de Baxter.

Operaciones preliminares

- Obtener cultivo puro de *Trichophyton*.

Procedimiento

- Se inocula una porción de colonia de dermatofito en el medio de Baxter en cuña y se incuba de 7 a 10 días, observando la aparición de pigmento

en el medio. También se puede realizar en medio de agar Papa dextrosa o agar maíz.

Interpretación de los resultados

- Las diferentes especies de dermatofitos producen diferentes pigmentos, por ejemplo el *T. Mentagrophytes* produce color vino intenso, *Epidermophyton floccosum* un color amarillo intenso, etc.

Características principales de los tres géneros de dermatofitos

- ***Trichophyton*:** Sus macroconidias son de paredes delgadas, con una superficie lisa en forma de lápiz o fusiformes, miden de 4-8 x 8-50 μm y están divididos en 3-8 células. Las microconidias son de aproximadamente de 2-4 μm de tamaño, con diversas formas, como piriformes, esféricas y claviformes.
- ***Microsporum*:** Se caracterizan por presentar abundantes macroconidias de muy diversas formas, como fusiformes, claviformes, ovales, etc. de 7-20 x 30-160 μm ; multitabicados, de 3-7 células (a veces hasta 15), generalmente de pared gruesa, rugosa o equinulada, que se derivan de conidióforos cortos. Presentan escasos microconidios de forma globosa o piriforme, ubicados individualmente o a lo largo de la hifa.
- ***Epidermophyton*:** Presentan grandes macroconidias claviformes, que miden entre 15 a 30 μm de largo por 5-10 de ancho de paredes gruesas y lisas, con tres o cuatro tabiques transversales. Pueden nacer de forma independiente o varias de un mismo punto, como racimos. No tiene microconidias. Existe una sola especie.

Diagnóstico de la Pitiriasis versicolor

- La pitiriasis versicolor es una micosis superficial causada por un hongo dimórfico y lipofílico, denominado *Malssezia furfur* (*Pityrosporum furfur*), se caracteriza por la presencia de placas de fina descamación (pitiriasis) que pueden ser hiper o hipocrómicas (versicolor), generalmente localizadas en el tronco, cuello y extremidades, aunque en ocasiones puede presentarse en la cara. Las lesiones son asintomáticas y en ocasiones pueden confluir formando manchas extensas.
- El diagnóstico se basa fundamentalmente en el examen de las lesiones sospechosas, mediante lámpara de Wood y en el estudio micológico de las mismas.
- La lámpara de Wood al incidir sobre las lesiones permite observar la fluorescencia amarillo-naranja que produce la pitiriasis versicolor. En los casos que han llevado tratamiento local o sistémico, las lesiones pueden ser negativas a la luz de Wood.

Diagnóstico

Objetivo

- Determinar la presencia del agente etiológico que se encuentra produciendo infección.

Alcance

- Se le realizará a todas las muestras llegadas al laboratorio con la indicación de estudio micológico, en busca de *Malassezia furfur* o *Pityriopsisporum ovale*, o para descartar Pitiriasis versicolor.

Definiciones

- No procede.

Responsabilidad

- Profesional y técnico que atienden el departamento de Micología.

Condiciones de seguridad y bioseguridad

- Referidas anteriormente.

Equipos, materiales y reactivos

- Referidos anteriormente, además de incubadora y refrigerador doméstico.

Operaciones preliminares

- No procede.

Procedimiento

- Toma de la muestra: Se realiza raspando las placas escamosas, ya sea con bisturí, o portaobjetos y situándolas en placa de Petri o utilizando cinta adhesiva que se observará posteriormente al microscopio.
- Una vez llegadas las muestras al departamento se procederá a realizar el **examen directo** de las escamas de piel, las cuales se aclaran con KOH al 15 % o con lactofenol azul, observando la presencia de células levaduriformes, redondas de 4-8 μ de diámetro, agrupadas en racimos, mezcladas con filamentos gruesos, cortos, rectos o ligeramente angulados y sin ramificaciones. También se puede utilizar como colorante KOH al 10%, adicionando tinta azul Parker, fórmula 1-3.
- **Cultivo:** no son necesarios para el diagnóstico, teniendo una imagen microscópica como la anterior, pero se pueden realizar en agar Sabouraud con un 5-15% de aceite de oliva. Se incuban a 25 o 37 °C durante 8 días, desarrollando colonias cremosas, blanco amarillentas y sólo se realizan en centros de investigación.

Diagnóstico de laboratorio de la tiña negra

- La tiña negra es una micosis superficial causada por un hongo levaduriforme dematiáceo, denominado *Exophiala werneckii*, es una infección asintomática de curso crónico y se caracteriza por la formación

de manchas hiperpigmentadas, preferentemente en la palma de las manos.

- **Objetivo:** determinar la presencia del agente etiológico que se encuentra produciendo infección.
- **Alcance:** Se le realizará a todas las muestras llegadas al laboratorio con la indicación de estudio micológico, en busca de Tiña negra.
- **Definiciones:** no procede.
- **Responsabilidad:** Profesional y técnico que atienden el departamento de Micología.
- **Condiciones de seguridad y bioseguridad:** referidas anteriormente.
- **Equipos, materiales y reactivos:** Referidos anteriormente, además de incubadora y refrigerador doméstico.
- **Operaciones preliminares:** no procede.

Procedimiento

- **Toma de la muestra:** descrita anteriormente para las escamas de la piel, aunque generalmente las lesiones ocurren en la palma de las manos.
- **Examen directo:** En las escamas aclaradas con KOH al 15 % se observan hifas de trayectos tortuosos, tabicadas, de color marrón, de aproximadamente 5 micras de diámetro, con gran número de ramificaciones, clamidosporas y además acúmulos de blastospora. Las hifas están formadas por células redondas u ovales.
- **Cultivo:** *Exophiala wernwckii* es un hongo de crecimiento lento, de 15 a 21 días, aparece una colonia blanca grisásea, de superficie brillante, de bordes irregulares y que finalmente adquiere un aspecto veloso de color verde oscuro o negro. En el examen directo se observan células levaduriformes con un tabique central y con los extremos terminados en punta.
- **Pruebas bioquímicas:** hidroliza la caseína, prueba que permite diferenciarlo de otros hongos dematiáceos. (técnica que se describe en anexos)

Diagnóstico de laboratorio de la Piedra

- **Piedra blanca:** es una micosis superficial causada por un hongo levaduriforme denominado *Trichoporum beigeli* (*T. cutaneum*), es una infección crónica y asintomática, afecta los tallos pilosos en forma de nódulos blandos blanquecinos, preferentemente los de la cabeza, bigote o barba, axila y pubis.
 - ⊞ **Objetivo:** determinar la presencia del agente etiológico que se encuentra produciendo infección.

- ⊞ **Alcance:** Se le realizará a todas las muestras llegadas al laboratorio con la indicación de estudio micológico, en busca de Piedra blanca.
- ⊞ **Definiciones:** no procede.
- ⊞ **Responsabilidad:** Profesional y técnico que atienden el departamento de Micología.
- ⊞ **Condiciones de seguridad y bioseguridad:** referidas anteriormente.
- ⊞ **Equipos, materiales y reactivos:** Referidos anteriormente, además de incubadora y refrigerador doméstico.
- ⊞ **Operaciones preliminares:** no procede.

Procedimiento: se toma la muestra de los pelos según se explica anteriormente.

- **Examen directo:** Los pelos afectados se colocan entre cubre y portaobjetos con KOH 20 %. Al microscopio se observan los típicos nódulos formados por densas zonas de esporas (artro y blastosporas), acompañadas de masa de hifas tabicadas.
 - **Cultivo:** El producto patológico se siembra en agar Sabouraud a temperatura ambiente y se desarrollan las colonias rápidamente, siendo de color blanco o beige, al principio de superficie lisa, que posteriormente se torna rugosa. La microscopía de la colonia muestra hifas hialinas con gran cantidad de artroconidias y escasos blastoconidios.
- **Piedra negra:** Es una micosis superficial que afecta principalmente al pelo, causada por un hongo ascosporado denominado *Piedraia hortai*, es una infección crónica asintomática que afecta los tallos pilosos en forma de nódulos duros, de color negro, generalmente localizada en el cuero cabelludo.
 - ⊞ **Objetivo:** determinar la presencia del agente etiológico que se encuentra produciendo infección.
 - ⊞ **Alcance:** Se le realizará a todas las muestras llegadas al laboratorio con la indicación de estudio micológico, en busca de Piedra negra.
 - ⊞ **Definiciones:** no procede.
 - ⊞ **Responsabilidad:** Profesional y técnico que atienden el departamento de Micología.
 - ⊞ **Condiciones de seguridad y bioseguridad:** referidas anteriormente.
 - ⊞ **Equipos, materiales y reactivos:** Referidos anteriormente, además de incubadora y refrigerador doméstico.

⊞ **Operaciones preliminares:** no procede.

Procedimiento: Se toma la muestra de los pelos según se describió anteriormente.

- **Examen directo:** Los pelos se colocan entre cubre y portaobjetos con una gota de KOH 15 %, es común sentir la sensación de arena a la presión del cubreobjetos. Al microscopio se observan nódulos pigmentados de color café-ocre, las concreciones están formadas por tejido pseudo parenquimatoso, constituido por hifas septadas de paredes gruesas que simulan artrosporas, es posible ver ascas con dos o más ascosporas (esta imagen es característica).
- **Cultivo:** P. hortai crece a temperatura ambiente en medio de Sabouraud, presentando colonias negras-verdosas de dos a tres semanas, limitada, acuminadas, lisas y en ocasiones aterciopeladas.

Diagnóstico de laboratorio de la cromomicosis

- La cromomicosis es una infección subcutánea o profunda de curso crónico, causada por un grupo de hongos dimórficos, dematiáceos (negros), que penetran a través de la piel por inoculación traumática y se caracteriza por la formación de lesiones que pueden tener inicialmente el aspecto de pápulas eritemato-escamosas y más tarde toman aspecto verrugoso, costroso, en algunos casos vegetantes que pueden semejar una coliflor negra y con ulceraciones., localizados preferentemente en miembros inferiores.
- Los principales agentes de la cromomicosis son: Fonsecaea pedrosoi, F. Compacta, Phialophora verrucosa y Cladosporium carrionii.
 - ⊞ **Objetivo:** determinar la presencia del agente etiológico que se encuentra produciendo infección.
 - ⊞ **Alcance:** Se le realizará a todas las muestras llegadas al laboratorio con la indicación de estudio micológico, en busca de Cromomicosis.
 - ⊞ **Definiciones:** no procede.
 - ⊞ **Responsabilidad:** Profesional y técnico que atienden el departamento de Micología.
 - ⊞ **Condiciones de seguridad y bioseguridad:** referidas anteriormente.
 - ⊞ **Equipos, materiales y reactivos:** Referidos anteriormente, además de incubadora y refrigerador doméstico.
 - ⊞ **Operaciones preliminares:** no procede.

Procedimiento

- La toma de la muestra se realiza mediante el raspado de las lesiones, según se describe en los anexos. En lesiones más profundas pueden tomarse biopsias.
 - **Examen directo:** Es la forma más fácil y sencilla de hacer el diagnóstico. Como las escamas pueden ser muy gruesas se deben observar entre cubre y portaobjetos con KOH al 40 % o KOH al 20 % pero dejando reposar la preparación durante al menos 20 minutos. Al microscopio se observa la forma parasitaria de células fumagoides, mal llamadas cuerpos de Medlar), son estructuras de aproximadamente 4 a 10 μ de diámetro, que se encuentran solas o agrupadas, de color café, paredes gruesas, presentan doble membrana y pueden estar divididas por un tabique central; dan el aspecto de granos de café. Pueden encontrarse hifas corta, pardas tabicadas, la presencia sola de hifas no da el diagnóstico de esta micosis. Esta imagen es la misma para todos los agentes de la cromomycosis.
 - **Cultivo:** Las escamas se siembran en los medios de cultivo habituales de Sabouraud agar, incubándolas a 25°C. Todas las especies crecen lentamente y las colonias son macroscópicamente similares. Se manifiestan a los 10 días de sembradas y terminan de mostrar todas sus características entre 30 y 40 días.
- ⊕ Son colonias limitadas, vellosas, aterciopeladas, radiadas, con tonalidades verde oscuras o negras; en ocasiones pueden presentar un velo micelial blanquecino que a veces las cubre.
 - ⊕ La diferenciación de los géneros y especies debe realizarse por la morfología microscópica de la colonia. Los agentes pueden presentar al estudio microscópico alguno de los siguientes tipos o formas de conidios: phialophora, rhinocladiella (acrotheca) o cladosporium (hormodendrum). Dependiendo de la presencia y abundancia de cada una de estas formas de conidiación se llega a la determinación taxonómica del agente causal.
 - ⊕ **Phialophora:** Corresponde a una célula conidiófora denominada fiálide, que puede ser lateral o terminal a la hifa. Generalmente tiene forma de botella o frasco, corta o alargada con base redonda, oval, o elongada y un cuello estrecho con una abertura que posee un collarite. Los conidios se forman en el ápice de la fiálide y se expulsan a través del cuello, dando la apariencia de "flores en un vaso". Los conidios son ovales, de pared lisa e hialinos, sin cicatriz de unión.
 - ⊕ **Rhinocladiella (acrotheca):** Los conidióforos son simples y frecuentemente no difieren de la hifa vegetativa. Se producen conidios ovales en los extremos y a los lados de los conidióforos. Generalmente son únicos y no geman, aunque ocasionalmente se

observan cadenas formadas por gemación en una transición al tipo de conidiación *cladosporium*. Cuando se desprenden los conidios se observa una pequeña cicatriz de unión, tanto en el conidio como en el conidióforo. Las hifas, conidios y conidióforos son de color marrón pálido.

- ⊞ ***Cladosporium (hormodendrum)*:** Existen variedades de *cladosporium*, corto y largo. En ambos nace de la hifa conidiógena 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 otros conidios secundarios. En la variedad *cladosporium* largo, la conidiación continúa formando largas cadenas; en la variedad corta se forman bifurcaciones en arborescencia, de donde se desprenden los conidios que quedan libres sin formar cadenas largas. Los conidios más jóvenes están en el extremo distal de la cadena y cuando se desprenden también presentan una cicatriz de unión.

Características de los principales agentes

- ***Fonsecaea pedrosoi***
 - ⊞ **Morfología colonial:** Las colonias son de crecimiento lento, de color marrón negruzco o negro grisáceo, verde olivo o negro, vellosas, de superficie plana o plegada.
 - ⊞ **Morfología microscópica:** Presenta los tres tipos de conidiación, aunque predominan los tipos *cladosporium* corto y *rinocladiella*.
- ***Phialophora verrucosa***
 - ⊞ **Morfología colonial:** La colonia es de crecimiento lento, de color que va del gris olivo oscuro al negro, al principio elevada y después plana; algunas veces rugosa y con prolongaciones radiales. Finalmente, un micelio gris cubre la colonia.
 - ⊞ **Morfología microscópica:** Presenta conidiación del tipo *phialophora*.
- ***Cladosporium carrionii***
 - ⊞ **Morfología colonial:** La colonia es de crecimiento lento, al cabo de un mes alcanza de 3 a 4 cm de diámetro, es lisa, o rugosa, de color olivo oscuro.
 - ⊞ **Morfología microscópica:** Generalmente sólo se encuentra conidiación tipo *cladosporium* largo.
- ***Fonsecaea compacta***
 - ⊞ **Morfología colonial:** Las colonias son de crecimiento muy lento, plegadas o elevadas, con aspecto veloso y de color negro. La mayoría de los conidios están contenidos en estas velosidades.

- ⊞ **Morfología microscópica:** Es indistinguible de *F. Pedrosoi*, excepto por la forma más compacta de acúmulos de los conidios. Los conidios son esféricos u ovoides de 1,5 x 2 x 3 micras de tamaño, mientras que las *F. Pedrosoi* son elípticas y más grandes.

* En cuadro anexo se muestran las características de estas especies.

Diagnóstico de laboratorio de los Micetomas

- El micetoma es un síndrome anatómico de tipo crónico constituido por aumento de volumen, deformación de la región que afecta y lesiones de aspecto nodular, fistulizadas, de donde drena un exudado filante, que contiene formas parasitarias denominadas "granos"; su etiología se debe a diversos actinomicetos aerobios y hongos verdaderos.
- Debido a la ubicuidad de los agentes de micetoma y su presencia como saprofitos del suelo, su papel etiológico debe ser definido en base a:
 - ⊞ Presencia de gránulos
 - ⊞ Aislamiento repetido del microorganismo
 - ⊞ Toma de muestra preferiblemente a partir de fístulas cerradas
- **Objetivo:** determinar la presencia del agente etiológico que se encuentra produciendo el micetoma.
- **Alcance:** Se le realizará a todas las muestras llegadas al laboratorio con la indicación de estudio micológico, en busca de agentes de micetoma.
- **Definiciones:** no procede.
- **Responsabilidad:** Profesional y técnico que atienden el departamento de Micología.
- **Condiciones de seguridad y bioseguridad:** referidas anteriormente.
- **Equipos, materiales y reactivos:** Referidos anteriormente, además de incubadora y refrigerador doméstico.
- **Operaciones preliminares:** no procede.

Procedimiento

- ⊞ ***La toma de la muestra*** se realiza del material que drena a partir de fístulas activas (exudado conteniendo "granos" o "gránulos"), debe recogerse con el asa micológica en cantidad suficiente para la observación microscópica y el cultivo. Si se trata de una fístula cerrada, la muestra debe tomarse mediante punción y drenaje. En caso de compromiso pulmonar, resulta conveniente tomar la muestra de esputo o lavado bronquial.
- ⊞ ***Examen directo:*** El material recolectado se coloca entre cubre y porta con una solución de lugol, solución salina o KOH al 10 % o se

realiza preparación de frotis coloreado por Gram. Las principales características de los "granos" a tener en cuenta son:

- ✧ Tamaño: entre 0,2-5,0 mm
- ✧ Color: los más frecuentes son los blanco amarillentos, negros rojos
- ✧ Forma: ovalados lobulados e irregulares.
- ✧ Consistencia: algunos son blandos y otros son duros por la presencia de una sustancia tipo "cemento".

Los gránulos producidos por actinomicetos están compuestos por filamentos finos Gram positivos, de 0,5-1,0 μ de diámetro; también pueden observarse bacilos y coco-bacilos. Los gránulos eumicóticos contienen hifas tabicadas anchas, de 2-5 μ de diámetro y se observan también células "hinchadas", de formas variables, que pueden medir hasta 15 μ , especialmente en la periferia de los gránulos.

✚ **Cultivo:** para el cultivo de los gránulos deben usarse diferentes medios de cultivo, teniendo en cuenta la etiología sospechada. Para los micetomas actinomicóticos no deben emplearse como única opción aquellos medios que contengan antibacterianos. Igualmente debe tenerse en cuenta que la cicloheximida puede inhibir a algunos de los posibles agentes eumicóticos.

- Algunas especies se deben sembrar de primoaislamiento en medios especiales, por Ej. *A. Madurae* y *S. Somaliensis* en medio de Lowenstein-Jensen; *Madurella mycetomatis* en BHI agar.
- Deben sembrarse varios tubos de diferentes medios e incubar a diferentes temperaturas (25°C y 37°C).
- El tiempo de incubación es muy variable, en dependencia del agente causal. Por lo general, los actinomicetos pueden demorar entre 8 y 15 días a temperatura ambiente, aunque algunas cepas de *A. Madurae* son de crecimiento mucho más lento. Por otra parte, la mayoría de los hongos causantes de micetoma son de crecimiento lento y tienen tiempo de incubación promedio de 15-30 días, aunque es aconsejable incubar hasta 6 semanas antes de considerarlo negativo.
- La identificación de los hongos responsable de micetoma de basa fundamentalmente en su morfología macro y microscópica, conidiogénesis y morfología de los conidios. Como ciertas especies (*M. grisea*, *M. mycetomatis*), no esporulan fácilmente, para la identificación deben usarse medio adicionales de esporulación (agar papa-dextrosa, agar maíz) y algunas pruebas bioquímicas como la utilización de carbohidratos y nitratos. En la identificación de los agentes actinomicetomas las pruebas

bioquímicas adquieren mayor importancia (hidrólisis de la caseína, liquefacción de la gelatina, hidrólisis de la urea, asimilación de carbohidratos).

- Las características de los granos son muy importantes para definir el agente etiológico.

Principales agentes etiológicos

<i>Micetomas eumicóticos</i>	
<i>Granos negros</i>	<i>Granos blancos</i>
• <i>Madurella grisea</i>	• <i>Pseudoallescheria boydii</i>
• <i>M. mycetomatis</i>	• <i>Acremonium falsiforme</i>
• <i>Exophiala jeanselmei</i>	• <i>A. kiliense</i>
• <i>Leptosphaeria senegalensis</i>	• <i>A. recifei</i>
<i>Micetomas actinomicóticos</i>	
• <i>Nocardia asteroides</i>	
• <i>N. brasiliensis</i>	
• <i>N. caviae</i>	
• <i>Actinomadura madurae</i>	
• <i>Actinomadura pelletieri</i>	
• <i>Streptomyces somaliensis</i>	
• <i>S. paraguayensis</i>	

Principales características de los agentes de micetoma:

Micetomas eumicóticos

- ***P. boydii***: Granos blancos, blandos, ovalados (<2 mm). Colonias de crecimiento rápido, color gris ratón. Conidios grandes unicelulares (7 mm) en conidióforos simples. Cleistotecio negro (30-37°C).
- ***M. grisea***: Granos negros, blandos, ovalados a lobulados (<1 mm). Colonias de crecimiento muy lento, color gris café. Pigmento difusible. Presencia de picnidios (30°C).
- ***M. mycetomatis***: Granos negros, duros, ovalados a lobulados (<2 mm). Colonias de crecimiento muy lento, aterciopeladas, color amarillo crema a ocre. Pigmento difusible carmelita pardo. Conidios escasos, filiformes (37°C).
- ***Kiliense***: Granos blancos, blandos, irregulares, (<1,5 mm). Colonias blancas, globosas. Pigmento violáceo difusible. Conidios en conidióforos simples. (30°C).

- *E. jeanselmei*: Granos negros, blandos irregulares (0,2-0,3 mm). Colonias de crecimiento lento, color oscuro, velvética. Reverso negro. Células levaduriformes, conidióforos en anélices (30°C).

Micetomas actinomicóticos

- *N. asteroides*: Granos blancos, blandos, irregulares (1 mm). Colonias de crecimiento rápido a 37°C, plegadas, color amarillo-naranja pardo. Bacilos cortos y cocos. Filamentos ramificados escasos. Ácido resistente.
- *N. brasiliensis*: Granos blanco-amarillos blandos, lobulados (1 mm). Colonias de crecimiento rápido a 30°C, características morfológicas y culturales muy parecidas a la anterior. Ácido resistente.
- *Actinomadura madurae*: Granos blancos, blandos, ovalados a lobulados, pocas veces rosado, grandes (5 mm). Colonias de crecimiento rápido a 37°C. Color blanco crema rojo. Lisa o arrugada, con delicados filamentos sin fragmentar, ramificados. No ácido resistente.
- *Pelletieri*: Granos rojos, duros, pequeños, ovalados a lobulados (1 MM). Colonias de crecimiento lento a 37°C, liso, seco, color rojo claro. Filamentos no fragmentados, delicados. No ácido resistente.
- *S. somaliensis*: Granos amarillo, duros, redondos a ovalados, grandes (2 mm). Colonias de crecimiento lento a 30°C. Color pardo a crema, lisas, filamentos ramificados, no fragmentados. Esporas. No ácido resistente.