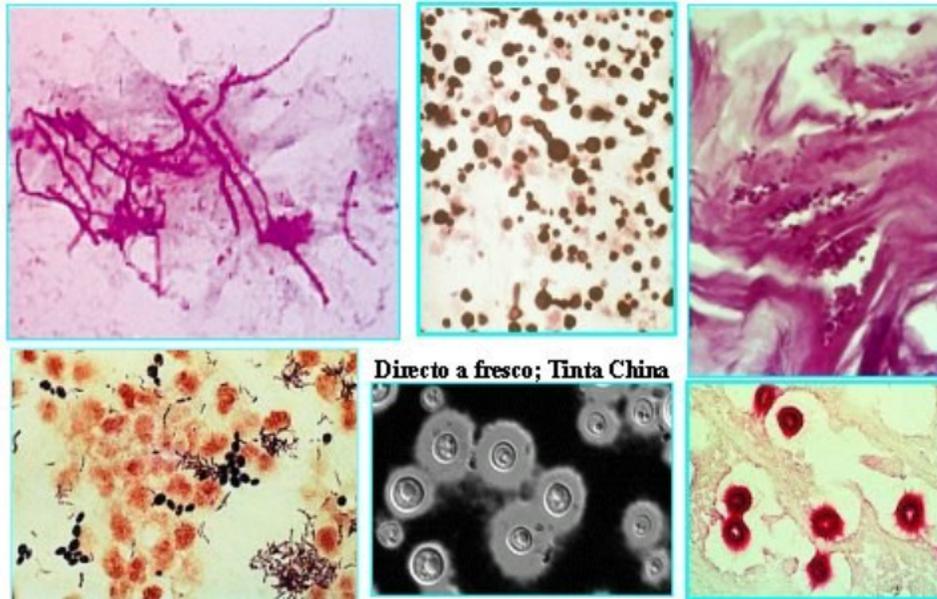


# MANUAL MICRODIAGNOSTICA

## SEGUNDA PARTE

# DIAGNOSTICO DE HONGOS Y LEVADURAS



## Índice:

Diagnóstico Clínico de las Micosis	3
Micosis Superficiales	4
Micosis Profundas	5
Diagnóstico Clínico	7
Obtención de Muestras	8
Transporte	9
Manejo	9
Procesamiento de las Muestras	9
Muestras más comunes, etiología más probable, recogida y transporte	12
Examen Directo	16
Agentes etiológicos de micosis superficiales cutáneas y mucocutáneas	17
Clasificación de Medios de Cultivo	20
Elección de medios de Cultivo	20
Identificación	23
Otros Medios Diagnósticos Complementarios	24
Pruebas de Sensibilidad	26
Bibliografía	27

# DIAGNOSTICO CLINICO DE LAS MICOSIS

Durante la última década se ha observado un incremento de las enfermedades micóticas, sobre todo las de tipo oportunista, ello ha significado la aparición de nuevas formas clínicas de micosis así como localizaciones o presentaciones no habituales, además de la presencia de nuevas especies fúngicas consideradas antiguamente como no patógenas pero que excepcionalmente producían enfermedad en individuos inmunodeprimidos. Diversos factores han permitido la aparición de infecciones emergentes: cambios poblacionales y sus patrones de costumbres, avances tecnológicos y desarrollo económico de algunos países, que ha permitido la generalización de tratamientos médicos quirúrgicos invasivos, con supervivencia de enfermos que difícilmente superaban procesos patológicos y que favorecen el desarrollo de micosis sistémicas; incremento de viajes inter y transcontinentales, nuevos mecanismos de adaptación de algunos microorganismos que conlleva a la aparición de resistencia a los antifúngicos e infección por VIH.

Actualmente se reconocen entre 300 y 400 especies de hongos causantes de micosis sistémicas, las cuales constituyen un pequeño porcentaje del total de más de 100 000 especies catalogadas. Por todo ello se prefiere mencionar un "comportamiento oportunista" por parte del hongo, debido a que los patógenos primarios al infectar a individuos inmunosuprimidos, se comportan con mayor agresividad, originando infecciones sistémicas, diseminadas, de evolución aguda y mal pronóstico. En este tipo de micosis es necesario considerar al binomio huésped – parásito. Las infecciones oportunistas se producen cuando los mecanismos de defensa específicos e inespecíficos del huésped son ineficaces, mientras que las sistémicas o diseminadas se producen cuando fallan los mecanismos celulares de defensa en los neutrófilos.

La mayoría de las micosis oportunistas siguen siendo ocasionadas por las especies clásicas: *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Cryptococcus neoformans*. Sin embargo, por las razones expuestas anteriormente han emergido nuevos hongos oportunistas

Durante las últimas décadas, el aumento en la prevalencia de las infecciones fúngicas ha sido constante, relacionado fundamentalmente con el incremento de pacientes inmunocomprometidos y con el uso generalizado de antimicrobianos, la utilización de inmunosupresores, maniobras diagnósticas invasoras y la implantación de alimentación parenteral.

Junto a estas micosis invasoras, que podríamos llamar oportunistas, coexisten otras micosis, que podríamos considerar primarias, causadas por hongos muy adaptados para la supervivencia en los tejidos infectados. Algunas de ellas se comportan como micosis profundas, y se caracterizan porque se distribuyen en determinadas zonas geográficas, donde resultan endémicas. Otras, ubicuas, se caracterizan por afectar a piel y mucosas: se trata de las dermatomicosis y candidosis de las mucosas. Con menos frecuencia, se encuentran las micosis subcutáneas, caracterizadas por la agresividad local y poca tendencia a la diseminación a distancia, y que suelen contar con antecedentes traumáticos que justifican la inoculación del hongo.

El cultivo sigue siendo el "gold standard" del diagnóstico microbiológico, ya que permite la identificación del agente etiológico y la realización del estudio de sensibilidad. Sin embargo, no está exento de inconvenientes: la necesidad de obtener muestras por métodos invasores, la posible contaminación de la muestra, su dificultad para diferenciar fácilmente entre infección y colonización, la baja sensibilidad que presenta y su lentitud para el diagnóstico.

Las pruebas de sensibilidad a los antifúngicos están basadas en las técnicas de microdilución en caldo, que se desarrollaron para conocer la actividad in vitro de los antibacterianos. Estas técnicas determinan la CMI (concentración mínima inhibitoria), que se obtiene calculando porcentajes de inhibición respecto a un control de crecimiento. Los estándares incluyen recomendaciones para la conservación, la preparación y la interpretación de las pruebas, así como un sistema para controlar la calidad de los resultados. La introducción de estas técnicas produjo un cambio cualitativo en los

## MICOSIS SUPERFICIALES

**1. COSMÉTICAS.** Son las que afectan la capa córnea de la piel y la porción suprafolicular del cabello y vellos, generalmente asintomáticas por la poca o nula respuesta inmune.

a) Pitiriasis versicolor. Producida por especies del hongo lipofilico *Malassezia*: *M.furfur*, *M. globosa*, *M. obtusa*, *M. restricta*, *M. slooffiae*, *M. sympodiales*, hongo que puede ser colonizante de la epidermis; se relaciona con la presencia de ciertos aminoácidos y compuestos hidrófobos en la piel, así como la disminución del recambio epitelial del estrato córneo. El cuadro clínico se manifiesta por la presencia de lesiones maculares hiper o hipopigmentadas en la piel del tórax, parte superior de la espalda y brazos. Las especies del hongo *Malassezia* pueden estar involucradas en otros cuadros clínicos como la dermatitis seborreica, foliculitis en pacientes inmunocomprometidos, fungemia en lactantes prematuros en nutrición parenteral con emulsiones lipídicas y síndrome de Gougerot-Carteaud, que es una papilomatosis en región intermamaria, interescapular, cuello y abdomen.

b) Tiña negra palmar. Infección crónica del estrato córneo causada por el hongo levaduriforme dematiaceo *Phaeoannelomyces werneckii*, que consiste en lesiones maculares color oscuro afectando principalmente las palmas de las manos y las plantas de los pies, rara vez en la cara.

c) Piedra negra. Son nódulos duros, negros, adheridos a la porción extrafolicular del cabello, producida por la forma sexual del hongo *Piedraia hortae*.

d) Piedra blanca. Son nódulos blandos de color blanquecino que se pueden localizar en vellos de cejas, bigote o pelo escrotal y vulva, al igual que en cabello de la cabeza. Es producida por colonización de especies del hongo levaduriforme *Trichosporum*: *T. asteroides*, *T. beigelii/cutaneum*, *T. inkin*, *T. mucoides*, *T. ovoides*, *T. pullulans*. Este hongo también se ha asociado a fungemia en pacientes inmunosuprimidos, especialmente VIH positivos.

**2. CUTÁNEAS.** Se refiere a una diversidad de cuadros clínicos en los que están involucrados la piel y sus anexos. Las manifestaciones en piel son prurito, eritema y descamación; en cuero cabelludo son alopecia e invasión al cabello tipo endothrix, ectothrix y tipo fávico; y en uñas, onicomycosis.

a) Dermatofitosis. Producida por un grupo de hongos queratinolíticos identificados como dermatofitos: *Microsporum*, *Trichophyton*, *Epidermophyton*. Sus cuadros clínicos se denominan tiñas y se encuentran entre las infecciones más prevalentes a nivel mundial, principalmente en países en desarrollo. Las Tiñas del cuero cabelludo son: Tiña capitis no inflamatoria, tiña capitis inflamatoria, con formación de querioma de Celso y tiña fávica. Las otras, dependiendo del lugar del cuerpo comprometido son: Tiña barbae, Tiña corporea, Tiña manuum, Tiña unguium u onicomycosis, Tiña cruris y Tiña pedis.

Estos hongos se han clasificado según su hábitat en antropofílicos, zoofílicos y geofílicos. Los propágulos infectantes son los arthroconidios, que son adquiridos por contacto directo, se adhieren especialmente a los corneocitos (no a células endoteliales), germinan y penetran al estrato córneo formando ramificaciones de hifas; la invasión es favorecida por las condiciones específicas de este hábitat: células muertas, temperatura inferior a 37°C, humedad adecuada y aporte suficiente de hierro y otros nutrientes. Los dermatofitos tienen potentes queratinasas capaces de desdoblar en el pelo la queratina rica en cisteína, y la metionina en la piel; estas diferencias podrían explicar el tropismo de algunas especies por ciertos tejidos.

b) Dermatomicosis. Son infecciones crónicas que afectan la piel altamente queratinizadas de palmas, plantas, uñas y espacios interdigitales. Los cuadros clínicos son muy similares a las tiñas producidas por dermatofitos, pero el tratamiento es diferente. Dentro de los principales agentes etiológicos están los hongos hialinos como el *Scytalidium dimidiatum*, *S. hyalinum*, *Fusarium* sp, *Aspergillus* spp, especies de *Cándida* y hongos negros como especies del género *Phialophora*, *Curvularia*, *Alternaria*, *Bipolares*, etc.

## MICOSIS PROFUNDAS

1. **SUBCUTANEAS.** Son infecciones del tejido celular subcutáneo, adquiridas por trauma con material contaminado por hongos saprofitos ambientales. Afectan la dermis y epidermis y las manifestaciones clínicas son crónicas; se pueden caracterizar por ser inflamatorias y granulomatosas.

a) **Esporotricosis.** El hongo que la produce se denomina *Sporothrix schenckii*. Después de un período de incubación de 15 a 30 días (se ha reportado hasta 2 años) se produce una lesión nodular, denominada chancro, en el tejido cutáneo y subcutáneo en el sitio de inoculación. Clínicamente se pueden producir diferentes cuadros como la esporotricosis linfocutánea, que compromete vasos linfáticos drenantes; la fija o dermoepidérmica, con lesión única y sin compromiso de vasos linfáticos; la pulmonar primaria, que se observa en pacientes inmunosuprimidos, se adquiere por inhalación y simula una tuberculosis cavitaria; la pulmonar metastásica; la osteoarticular, forma diseminada en huesos y articulaciones; la esporotricosis invasiva generalizada, que es rara; y se han descrito casos de formas meníngeas y oculares en pacientes inmunosuprimidos.

b) **Cromoblastomicosis.** Micosis producida por un grupo de hongos dematiáceos, tales como *Fonsecaea pedrosoi*, *Fonsecaea compactum*, *Phialophora verrucosa*, *Cladosporium carrionii* y *Rhinocladiella aquasperma*. Las lesiones son crónicas, de meses a años, y en las muestras clínicas (raspado de puntos negros y biopsias) se observan las células escleróticas de medlar o células fumagoides que son patognomónicas de esta entidad.

c) **Lobomicosis.** Producida por el hongo *Loboa loboii*, con lesiones crónicas tipo queloides en sitios anatómicos expuestos, como por ejemplo la región sacra, miembros inferiores, superiores y región auricular.

d) **Rinosporidiasis.** El agente etiológico no es un hongo, es un microorganismo acuático perteneciente al reino Stromophila denominado *Rhinosporidium seeberii*. La rinosporidiosis se caracteriza por la formación de lesiones polipoides, pedunculadas y papilomatosas que obstruyen los conductos aéreos, la nasofaringe, laringe y conjuntivas.

e) **Eumicetomas.** Infección de carácter crónico que se adquiere por trauma con material contaminado por hongos como *Madurella mycetomatis* y *Exophiala* sp. El cuadro clínico se caracteriza por fistulización, edemas y gránulos de azufre.

f) **Faeohifomicosis.** Infección por inoculación traumática de hongos dematiáceos, como por ejemplo *Alternaria alternata*, *Bipolaris spicifera*, *Curvularia geniculata*, *Exophiala jeanselmei*, *Exophiala moniliae*, *Wangiella dermatitidis*. En las lesiones se observan hifas pigmentadas y no células escleróticas. Estos hongos también pueden causar infección cutánea y sistémica.

g) **Hialohifomicosis.** Infección por inoculación traumática de hongos hialinos a nivel subcutáneo, pero también puede cursar con compromiso sistémico. Los pacientes inmunocomprometidos los pueden adquirir por vía aérea, por ejemplo infección por *Fusarium* spp, y *Aspergillus* spp.

2. **SISTÉMICAS.** Este tipo de micosis se adquieren por inhalación de propágulos de los hongos que están en el medio ambiente, muchas veces en nichos ecológicos muy restringidos. Causan cuadros clínicos que dependen del estado inmunológico del huésped y de la cantidad de propágulos inhalados, y pueden ser desde cuadros asintomáticos inespecíficos, hasta procesos pulmonares granulomatosos; en pacientes inmunocomprometidos se manifiesta de forma generalizada.

a) **Histoplasmosis.** Es producida por el hongo *Histoplasma capsulatum* variedad *capsulatum*, quien predomina en América, desde el sur de Canadá hasta Argentina, y la variedad *duboisii* en el África; su nicho son cuevas de murciélagos, gallineros y palomares. Dentro de las formas clínicas tenemos la presentación aguda y crónica, la pulmonar (asintomática, leve, moderada, grave, neumónica o cavitada), la diseminada, de leve a progresiva, y la mucocutánea.

b) Blastomycosis. Infección causada por *Blastomyces dermatitidis*, cuyo nicho ecológico es el suelo de gallineros, corrales y establos, terrenos con alto contenido orgánico, abonados o con deyecciones de animales, pH ácido y elevada humedad. La infección es crónica, con lesiones granulomatosas y supurativas; la más frecuente es la pulmonar (aguda o crónica), pero también se presenta la forma extrapulmonar crónica con afección de piel, huesos y tracto genitourinario, la forma aguda fulminante y las formas asintomáticas.

c) Coccidioidomycosis. Infección causada por *Coccidioides immitis* en zonas endémicas desde el sudoeste estadounidense, Centro América, Venezuela, Paraguay hasta la Patagonia en Argentina. La inhalación de artroconidios puede causar un cuadro pulmonar con o sin diseminación sistémica (ósea, meníngea y cutánea) principalmente en pacientes inmunocomprometidos.

d) Paracoccidioidomycosis. Micosis granulomatosa producida por el hongo dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis*, restringido a zonas boscosas de los grandes ríos y lagos del Brasil, Venezuela, Colombia, Paraguay y norte de Argentina. La infección puede ser asintomática o sintomática, como la forma juvenil aguda, con compromiso pulmonar y del sistema reticuloendotelial, con adenopatías, hepatomegalia y afección ósea, o como la forma crónica del adulto con lesiones pulmonares y metástasis a diversos órganos, y lesiones en mucosa orofaríngea y úlceras vegetativas peribucales.

e) Criptococosis. Infección subaguda o crónica pulmonar o meníngea causada por *Cryptococcus neoformans*, hongo ubicuo en la naturaleza principalmente en excretas de palomas (variedad *neoformans* y *grubii*) y detritus de árboles (variedad *gatti*). Las levaduras desecadas y de menor tamaño son inhaladas, llegan a espacios alveolares, pero el desarrollo de la enfermedad depende de la respuesta del sistema inmune celular. Aunque el foco primario es el pulmón, el tropismo por el Sistema Nervioso Central (SNC) puede llevar a diseminación a meninges; en pacientes inmunosuprimidos puede haber presentación clínica mucocutánea que corresponde a metástasis de la forma diseminada.

3. **OPORTUNISTAS.** Este tipo de micosis involucra especies de hongos que forman parte de la microflora ambiental o son comensales de la piel y mucosa, y quienes habitualmente son eliminadas por el sistema inmune celular. Cuando hay deficiencia de la respuesta inmune, alteraciones de la flora bacteriana por suministro de antibióticos o la existencia de enfermedades de base en el paciente, como por ejemplo la diabetes o enfermedades mieloproliferativas con neutropenia, pueden causar una infección diseminada fatal para el paciente.

a) Candidiasis sistémica. Es la micosis más frecuente. Es producida por *Cándida albicans* y otras especies del mismo género, capaces de invadir sangre y otros órganos profundos. Las levaduras de *Cándida* son colonizadoras de la mucosa rectal, vaginal y bucal, por lo que las infecciones pueden ser endógenas; también se ha demostrado la transmisión interpersonal o como resultado de contaminación con sondas y catéteres.

b) Aspergilosis sistémica. Es producida por especies del género *Aspergillus*. *Aspergillus fumigatus* es el agente causal de más del 90% de los casos de aspergilosis invasora; se adquiere por inhalación de conidios, que germinan e invaden los tejidos. Los pacientes con neutropenia prolongada. Conforman el principal grupo de pacientes con riesgo para adquirir esta grave infección, al igual que pacientes leucémicos y receptores de órganos, los cuales pueden sufrir aspergilosis pulmonar invasora o aspergilosis sistémica con compromiso del SNC, infarto cerebral, vasculitis o abscesos cerebrales.

c) Zigomicosis. Infecciones causadas por hongos pertenecientes a los mucorales: *Mucor spp*, *Rhizomucors spp*, *Rhizopus spp*, *Cunninghamella spp*, etc. Su hábitat es la materia orgánica en descomposición. Causan cuadros principalmente subcutáneos, pero formas sistémicas han sido también descritas, siendo la más frecuente la rinocerebral; también se puede presentar a nivel pulmonar, cutáneo, intestinal, en SNC, periorbitaria y nasal.

d) Pneumocistosis. Neumonía causada por el hongo *Pneumocystis jiroveci* y que afecta pacientes inmunocomprometidos, principalmente VIH positivos.

# DIAGNOSTICO CLINICO

## La clínica solo provee un diagnóstico presuntivo:

- Las lesiones de consulta ambulatoria frecuente caracterizadas por prurito y eritema pueden sugerir micosis superficiales cutáneas, mas sin embargo otras enfermedades pueden presentar cuadros clínicos similares. Adicionalmente, el uso de corticoides tópicos en lesiones de este tipo pueden generar cuadros atípicos de difícil diagnóstico clínico.

- Las micosis de órganos profundos son cada vez más frecuentes en la práctica clínica, afectando especialmente a sujetos con grados variables de inmunocompromiso, como en aquellos con infección por el VIH y enfermedades hematológicas malignas. Las manifestaciones clínicas pueden ser inespecíficas y no siempre sugerir infección por hongos, por lo tanto un diagnóstico micológico precoz aumenta considerablemente el éxito del tratamiento.

- Según un consenso entre la Organización Europea para el Tratamiento del Cáncer, el Grupo Cooperativo de Infecciones Invasivas por Hongos de Bruselas, el Instituto Nacional de Alergias, el Grupo de Estudio de Enfermedades Infecciosas por Hongos y el Instituto Nacional de Salud de Bethesda, Maryland, se definió que para el diagnóstico de las infecciones fúngicas invasoras en pacientes con cáncer y trasplante de precursores hematopoyéticos se deben considerar los factores predisponentes en el hospedero, elementos clínicos-radiológicos y hallazgos del laboratorio. Estos factores considerados conjuntamente permitirían clasificar estas infecciones como demostradas, probables o posibles.

a) Infección demostrada: Es suficiente el hallazgo de hongos en sangre o en sitio normalmente estéril con un cultivo o examen directo, independiente de la presencia de factores predisponentes en el huésped o elementos clínicoradiológicos.

b) Infección probable: Es aquella en que existen factores predisponentes en el huésped, elementos clínicos sugerentes y un estudio micológico positivo, pero no definitivo, como podría ser una serología de galactomanan positiva o un cultivo positivo de sitio no estéril.

c) Infección posible: Es aquella en que alguno de los tres elementos no esta presente, ya sean los factores predisponentes, los elementos clínico-radiológicos o la micología.

## Papel del laboratorio en el diagnóstico de las micosis

- Los procedimientos del laboratorio son de gran utilidad para los médicos ya que confirman un diagnóstico presuntivo.

- Establece el agente etiológico.

- Son útiles en la selección y monitoreo de la terapia antifúngica, seguimiento evolutivo y para confirmar la curación.

Los procedimientos del laboratorio incluyen:

1. Demostración de los hongos en los especímenes a estudiar mediante

a) Microscopía óptica:

-Frescos ( KOH, Tinta china).

-Tinciones (Gram, Giemsa, HP)

b) Cultivos (incluye identificación hasta especie y la determinación de la sensibilidad in vitro).

2. Detección de la respuesta humoral específica en determinados hongos patógenos.

3. Detección de antígenos fúngicos y metabolitos en fluidos corporales o tejidos mediante técnicas serológicas.

## Objetivo principal del laboratorio

Detectar rápida y eficazmente la presencia de los hongos en muestras clínicas y determinar si es el agente etiológico o es un contaminante.

### OBTENCION DE LAS MUESTRAS

Para alcanzar el éxito en el diagnóstico micológico partiendo de una sospecha clínica, es fundamental realizar adecuadamente la recogida de la muestra a partir de la lesión, su correcta manipulación para mantener la viabilidad del agente etiológico y evitar posibles contaminaciones en su transporte y procesamiento, la siembra de la misma en los medios idóneos y a la temperatura adecuada, así como la identificación e interpretación correcta de los aislamientos. Únicamente con el procesamiento adecuado se puede recuperar el hongo claramente asociado con el proceso infeccioso. A la hora de valorar un crecimiento fúngico hay que tener siempre presente la necesidad de diferenciar un "aislamiento significativo" de otros que no lo son, ya que no es lo mismo identificar una especie fúngica que diagnosticar una micosis.

#### Consejos generales para optimizar la recogida de las muestras:

1. Debe disponerse de un protocolo de recogida de muestras que será actualizado periódicamente.
2. Es responsabilidad del médico asegurar una correcta recogida y envío en condiciones adecuadas de las muestras, funciones que no deben ser delegadas en personal no cualificado.
3. Es necesario recoger las muestras asépticamente, utilizando contenedores estériles, remitirlas al laboratorio antes de 2 horas y sembrarlas lo antes posible.
4. La muestra debe recogerse antes de instaurar el tratamiento y siempre de la parte activa de la lesión (cuando se sospecha una micosis pulmonar es preferible una muestra respiratoria que un hemocultivo).
5. Se debe evitar la utilización de hisopos siempre que el tipo de lesión lo permita, pues están contaminados frecuentemente con flora bacteriana. Sin embargo, algunas muestras (conducto auditivo, faringe, vagina, cérvix) no pueden ser recogidas de otra forma.
6. Las muestras de lesiones cerradas y abscesos suelen presentar un gran rendimiento. Deben aspirarse con jeringa y transferirse a un contenedor estéril con solución salina, prestando atención a la recogida de gránulos, si los hubiese.
7. El raspado de lesiones de piel y mucosas puede realizarse con distintos materiales; los más utilizados son bisturí, moqueta o cepillo.
8. En situaciones que requieran un estudio epidemiológico, debe establecerse la necesidad de una recogida de muestras ambientales, familiares o animales.
9. El recipiente de recogida se identificará con los datos del enfermo (nombre y localización), y debe protegerse para que no se rompa en su transporte al laboratorio.
10. Las muestras deben ir acompañadas obligatoriamente de la orden de petición para Microbiología. En el cual, al menos, debe hacerse constar la siguiente información: datos del paciente (nombre y apellidos, número de historia clínica, fecha de nacimiento y sexo); datos clínicos (orientación diag-

nóstica, tratamiento antimicrobiano, enfermedad de base y antecedentes de interés); datos del médico solicitante.

11. Al laboratorio se le debe informar de la sospecha de presencia de hongos peligrosos. También si se sospecha la presencia de hongos con requerimientos especiales, *Malassezia* spp, por ejemplo, así como de viajes u origen de paciente.

Los envases para la recogida de las muestras pueden variar según el tipo de muestra a recoger y transportar:

- Tubos estériles con tapón de rosca: LCR y otros líquidos biológicos.
- Frascos estériles de boca ancha con tapón de rosca: orinas, esputos, heces, fragmentos de tejidos, etc.
- Torulas o hisopos de algodón estériles: Se usan para tomar muestras de superficies y orificios corporales (exudados, secreciones).
- Jeringas estériles: sólo se admiten cuando su volumen no permita transferir la muestra a un medio de transporte adecuado.
- Frascos de hemocultivo para líquidos biológicos.
- Placas de Petri estériles.

## TRANSPORTE

Todas las muestras deben enviarse al laboratorio rápidamente, sin conservantes. Las muestras deben transportarse en un recipiente estéril, humidificado y a prueba de vertidos; sin embargo, las muestras dermatológicas pueden transportarse en un recipiente seco (placa de Petri, papel de fotografía negro, entre dos portas). En general, no deben introducirse en medios de transporte, a no ser que sea fácil retirar la muestra del medio. Las muestras en que se sospeche la presencia de dermatofitos u hongos dimórficos se conservarán a temperatura ambiente, nunca refrigerados. Los raspados corneales y hemocultivos deben sembrarse directamente en el medio de cultivo adecuado. Si esto no fuera posible, se usarán medios de transporte adecuados o se conservaran a 4 °C.

## MANEJO

Todas las muestras deben manejarse como si tuvieran microorganismos potencialmente peligrosos. Cuando una muestra se recibe en el laboratorio, y antes de procesarse, debe someterse a una inspección previa para asegurarse que ha sido bien seleccionada, recogida y transportada. Se rechazará en los siguientes casos: a) muestra no identificada, b) transporte inadecuado o demasiado prolongado, c) muestra derramada, d) cantidad insuficiente o inadecuada. En todos estos casos se contactará con el médico solicitante para pedir nueva muestra o solucionar el problema de la misma.

## PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA

Para realizar un buen diagnóstico micológico es importante que la muestra se recoja y se transporte en condiciones idóneas y que no se demore su cultivo. Aunque hay pocos estudios sobre la disminución de la viabilidad de los hongos a temperatura ambiente o por la acción del hielo seco, es conocida la dificultad de recuperar *Rhizopus arrhizus* en muestras en las que se demora el cultivo, y también, la pérdida de viabilidad de algunos hongos por la desecación, temperatura elevada (>37 °C) o baja (<10 °C), sobrecrecimiento bacteriano, presencia leucocitos, etc. La refrigeración puede comprometer el aislamiento de hongos dermatofitos, *Malassezia* spp. e *H. capsulatum*. Las muestras que están potencialmente contaminadas con flora bacteriana (muestras de piel, aspirados trans-traqueales, aspirados de oído interno, muestras de conjuntiva) deben enviarse a tempe-

ratura ambiente.

En términos generales, los procedimientos utilizados en el laboratorio de bacteriología son adecuados para el cultivo de hongos, pero hay que tener en cuenta que, habitualmente, la carga microbiana es inferior en el caso de los hongos con respecto a las bacterias. Esto obliga a recoger mayor cantidad de muestra para obtener un rendimiento óptimo. Las muestras inaceptables no deben procesarse y el facultativo debe ser informado inmediatamente. Todo laboratorio debe distribuir por escrito las normas de rechazo de muestras.

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

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

## Examen con luz de Wood

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

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

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

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

- *T. shoenleinii*, causa una fluorescencia verde pálida.

En áreas geográficas donde *Microsporum* spp. y el favus son prevalentes, la luz Wood es una herramienta esencial tanto en el diagnóstico y el tratamiento del enfermo, como en el control de epidemias. Además, la lámpara es fácilmente transportable y puede ser usada en instituciones para el rápido examen de los contactos.

### **Limpieza del área afectada**

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

Tabla 1. Muestras más comunes, etiología más probable, recogida y transporte

Muestra	Hongo probable	Recogida y transporte	Tiempo y temperatura de transporte y conservación	Notas
<b>Abscesos sub-cutáneos</b>		Aspirar con jeringa y aguja. Transporte anaerobio o inoculación directa $\geq 1$ ml.	$\leq 24$ h, temperatura ambiente (TA).	Muestra de la base de la lesión y pared del absceso
<b>Biopsias</b>	Levaduras, hongos filamentosos. Siempre que se sospeche micosis profunda.	Usar estrictas condiciones de asepsia y tomar la muestra de la zona central de la lesión. Colocar la muestra en un tubo o frasco estéril con suero fisiológico estéril no bacteriostático para prevenir la desecación.	$\leq 24$ h, TA. Almacenar a 4 °C.	Sospecha de zigomicetos y hongos dimórficos, procesar inmediatamente. Biopsias obtenidas por Punch: pueden utilizarse para las lesiones de piel.
<b>Catéter</b>	<i>Candida spp.</i> <i>Malassezia spp.</i>	5 cm. distales colocarlos en contenedor estéril.		No estandarizado actualmente.
<b>Conjuntival y exudado lacrimonal</b>		Tomar la muestra con torula estéril de algodón o alginato cálcico, humedecida en medio de cultivo o suero fisiológico estéril, frotar la zona lesionada suavemente e introducir la torula en el medio de transporte.	Si se dispone de los medios de cultivo es preferible hacer la inoculación directamente.	
<b>Corneal, raspado</b>	<i>C. albicans</i> , <i>C. neoformans</i> . Hongos filamentosos muchas especies ( <i>Aspergillus spp.</i> , <i>Fusarium spp.</i> , <i>Paecilomyces spp.</i> , <i>Penicillium spp.</i> , hongos dermatiáceos)	Inocular directamente en el medio y en el porta, mediante raspado con espátula. Obtención de la muestra por el oftalmólogo en quirófano; después de raspar varias veces la córnea con un asa de Kimura o con bisturí, se debe sembrar en placa Petri en X o en C clavando el asa en el agar. Otra parte de la muestra se fija en portaobjetos para el estudio anatomopatológico	Se puede guardar a temperatura ambiente si se retrasa su envío al laboratorio.	Sembrar tocando con ambos lados de la espátula dibujando una C en el medio.
<b>Espacios interdigitales</b>	Dermatofitos	Limpieza de la zona con alcohol al 70%. Raspado con un bisturí estéril y depositar en placa de Petri estéril. En el caso de que haya exudado, tomar con torula.	El transporte de estas muestras debe ser inmediato. Conservación de estas muestras: a temperatura ambiente mejor que a 4°C, ya que algunos dermatofitos no sobreviven a la refrigeración.	No usar torulas, excepto cuando la lesión sea purulenta o se encuentre en zonas húmedas de la piel o en membranas mucosas. Si la toma se hace con torula, el examen directo no es válido y el cultivo no será todo lo óptimo que sería deseable.

<b>Gránulos sub-cutáneos</b>	Gránulo blanco: <i>Acremonium falci-forme</i> , <i>Acremonium recifei</i> , <i>Aspergillus nidulans</i> , <i>Neotestudina rosatii</i> , <i>Pseudoallesheria boydii</i> ; Gránulo negro: <i>Exophiala jeanselmei</i> , <i>Leptosphaeria senegalensis</i> , <i>Madorella grisea</i> , <i>Madorella mycetomatis</i> , <i>Pyrenochaeta romeroi</i>	Recoger pus, exudado, biopsia, y drenaje de tractos sinuosos. Lavar los gránulos con solución salina que contenga antibióticos.	≤ 24 h, TA.	Granos o gránulos en eumicetoma.
<b>Heces</b>	Sólo se recomienda en caso de candidiasis diseminada.	Si las heces son formadas, homogenizar con suero fisiológico estéril. Para el diagnóstico de infecciones fúngicas del tracto gastrointestinal es más útil tomar muestras de biopsia.	Transporte inmediato. Almacenamiento a 4 °C.	
<b>Herida</b>	Levaduras, micetomas, actinomicosis y esporotricosis	Muestra aspirada de la parte profunda y transporte en jeringa sin aguja. Remitir en contenedor estéril Si se utiliza hisopo, deberían remitirse varios.	Transporte inmediato.	Muestra del margen activo. Si la muestra se recoge por cirugía, remitir también una porción de la pared del absceso.
<b>Lentes de contacto:</b>		Siempre que sea posible enviar la lente al laboratorio, si no es posible prescindir de la lente, frotar con torula la superficie de contacto corneal.	Almacenamiento a 4 °C.	
<b>Líquido intra-ocular</b>	Endoftalmitis y celulitis orbitaria	Las muestras tienen que recogerse por el oftalmólogo en el quirófano, mediante punción y aspiración del fluido. Si la muestra es muy densa se recoge con bisturí y se coloca en contenedor de boca ancha estéril. También se recomienda inoculación directa en los medios de cultivo y la preparación de dos o más preparaciones para tinción.	≤ 24 h TA.	Si es lavado intra-ocular, centrifugar antes de sembrar.
<b>Líquidos estériles (LCR, pleural, peritoneal...)</b>	<i>Candida spp.</i> <i>H. capsulatum</i> , <i>C. neoformans</i>	Tras la preparación adecuada de la zona, obtener el líquido con jeringa en condiciones de esterilidad. Transferir a tubo estéril. Recoger como para bacterias, al menos 2 ml en contenedor estéril.	Procesamiento inmediato. ≤ 24h, TA. Nunca refrigerar.	El aspirado o biopsia cerebral pueden ser necesarios
<b>Médula ósea</b>	Histoplasmosis, candidosis, criptococosis. ( <i>C. neoformans</i> , <i>H. capsulatum</i> )	Preparar para incisión quirúrgica. Lisis centrifugación. Medio apropiado en la cabecera del enfermo	Como la sangre.	Si se usa un sistema automatizado, revisar las normas del fabricante.

<b>Oído externo</b>	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Aspergillus flavus</i>	Girar con firmeza el hisopo en el canal externo.	<2 h, TA <24 h, 4°C	
<b>Oral</b>	<i>Candida</i> spp., <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	Tomar con hisopo de la lesión activa; enjuagar con solución salina para <i>Candida</i> . Medio de transporte para el hisopo o contenedor estéril.	≤ 24 h, TA	Medio selectivo para levaduras.
<b>Orina</b>	Sospecha de candidosis urinaria, candidosis diseminada y criptococosis. Levaduras <i>C. neoformans</i> , <i>C. immitis</i> , <i>H. capsulatum</i> , <i>B. dermatitidis</i> .	Primera orina de la mañana en contenedor estéril. Orina obtenida por sondaje. Orina postmasaje prostático. Volumen necesario entre 10 y 50 ml.	≤ 15 min, TA ≤ 24 h, 4 °C	Usar la orina de la parte media de la micción. Puede utilizarse para detección de antígeno de <i>Histoplasma</i> .
<b>Pelos</b>	Sospecha de tiña de la cabeza: <i>Trichophyton</i> spp. <i>Microsporum</i> spp. (tinea capitis)	Limpiar la lesión con alcohol al 70% o con agua destilada estéril. Seleccionar el área, arrancar con pinzas al menos 10-12 pelos frágiles que estén fragmentados, o que presenten fluorescencia a la lámpara de Wood y recoger escamas. En niños con exudado puede ser útil frotar con un hisopo.	Contenedor seco. Si se hace con hisopo sembrar directamente. ≤ 72 h, TA.	Depositar en una placa Petri estéril. Para el transporte no usar tubos que mantengan la humedad, favorece el sobrecrecimiento bacteriano.
<b>Piel lampiña</b>	Sospecha de infección por dermatofitos y candidiasis cutánea  <i>Trichophyton</i> spp. <i>E. floccosum</i> <i>Microsporum</i> spp. <i>Candida</i> spp. <i>Sporothrix schenckii</i>	Desinfectar con alcohol de 70%. Raspar el borde de la lesión con un escarpelo, bisturí o porta. La muestra debe tomarse de la parte periférica de la lesión que va a ser donde van a estar los hongos en su fase proliferativa, mientras que en el centro de la lesión la mayoría de estos hongos pueden ser no viables.	Colocar una gota de agua sobre la lesión para evitar que las escamas "vuelen". Directamente sobre el medio o en contenedor estéril o entre dos portas. ≤ 72 h, TA.	La humedad, favorece el sobrecrecimiento bacteriano.
<b>Piel lampiña, pitiriasis versicolor</b>	<i>Malassezia</i> spp.	Adherir cinta adhesiva (scotch) de varias zonas de la piel para observación directa al microscopio.	Raspar varias lesiones de la piel sobre placa Petri.	
<b>Respiratorias: esputo, aspirado traqueal, aspirado bronquial, lavado broncoalveolar</b>	Micosis profundas (blastomicosis, candidosis, coccidiomicosis, histoplasmosis, aspergilosis, mucormicosis...) y actinomicosis (actinomicosis, nocardiosis) de localización pulmonar. Levaduras, hongos filamentosos.	Recoger 3 esputos en 3 días consecutivos. La utilidad de esta muestra viene condicionada por su "calidad" en función del número de leucocitos polimorfonucleares e histiocitos en la muestra, Cuando sea posible lavado broncoalveolar, cepillado bronquial.	Contenedor estéril >1 ml. ≤ 2 h, TA / ≤ 24 h, 4 °C	Esputo de 24 h no es aceptable. Los hongos dimórficos sobreviven poco tiempo. Requieren procesamiento inmediato. Hacer las extensiones para tinciones de Gram, Giemsa.

<b>Sangre</b>	<p>Cuando se sospecha criptococosis, candidosis, histoplasmosis diseminada y otras fungemias (<i>Fusarium</i> spp., <i>Scedosporium</i> spp., <i>Paecilomyces</i> spp., <i>Aspergillus</i> spp.).</p> <p><i>Candida</i> spp., <i>Malassezia</i> spp., <i>C. neoformans</i>, <i>H. capsulatum</i>.</p>	<p>Desinfectar la zona con compuesto iodado.</p> <p>Sistemas automatizados.</p> <p>Medios bifásicos de infusión cerebro-corazón.</p> <p>Extraer la máxima cantidad de sangre recomendada.</p>	≤ 24 h, TA.	<p>La mayoría de las <i>Candida</i> spp. se puede recuperar en los hemocultivos. Si se usa un sistema automatizado determinar qué hongos se pueden detectar.</p> <p>Para los hongos dimórficos: lisis centrifugación.</p> <p>Puede detectarse antígeno criptocócico, de <i>Histoplasma</i> o <i>Aspergillus</i>.</p>
<b>Seno nasal</b>		<p>Recoger el contenido del seno quirúrgicamente. Inocular directamente o transportar en una gasa estéril húmeda.</p>	≤ 24 h, TA.	
<b>Uñas</b>	<p>Sospecha de onicomicosis.</p> <p><i>Trichophyton</i> spp.</p> <p><i>Epidermophyton floccosum</i></p> <p><i>Microsporum</i> spp.</p> <p><i>Candida</i> spp.</p> <p><i>Scopulariopsis brevicaulis</i></p> <p>Otros hongos filamentosos de más difícil interpretación.</p>	<p>Desinfectar con alcohol 70%.</p> <p>Lesiones dorsales: raspar la superficie y desecharla, recoger la parte profunda.</p> <p>Lesiones subungueales o distales: recoger los residuos de debajo de la uña con bisturí, eliminando las primeras porciones y cortar la uña con unas tijeras estériles y posteriormente raspar con un bisturí estéril la parte inferior de la uña.</p> <p>Lesiones periungueales: tomar escamas o exudado.</p>	<p>Depositar la muestra en placa Petri estéril o en tubo.</p> <p>≤ 72 h, TA.</p>	<p>La humedad, favorece el sobrecrecimiento bacteriano.</p>
<b>Vaginal</b>	<p><i>C. albicans</i>, <i>C. glabrata</i>, <i>Candida</i> spp.</p>	<p>Como para bacterias.</p>	<p>Medio de transporte.</p> <p>&lt;24 h, TA o refrigerado</p>	

## EXAMEN DIRECTO

El diagnóstico definitivo de la mayoría de las micosis requiere el aislamiento e identificación del hongo a partir del cultivo, lo que supone con frecuencia, varios días o semanas de dilación. Las muestras para estudio micológico deben examinarse tanto macroscópica como microscópicamente. El método más rápido para la detección de estructuras fúngicas en una muestra clínica es el examen microscópico de la misma. Este examen puede aportar, en ocasiones, un diagnóstico definitivo (pitiriasis versicolor) y en otras, un diagnóstico de sospecha previo a la confirmación definitiva por cultivo. Por lo tanto, es un procedimiento que debería realizarse en todos los laboratorios ya que utiliza técnicas sencillas, permitiendo un cultivo mejor dirigido, seleccionando los medios más apropiados. Sin embargo, si la muestra es escasa, el cultivo debe ser prioritario. Las técnicas moleculares comienzan a ser una realidad y permitirán un diagnóstico más rápido que el cultivo, si bien están menos desarrolladas que para las bacterias o los virus.

**Observación macroscópica.** Las muestras, antes de ser procesadas, tienen que observarse macroscópicamente, en busca de material caseoso, purulento, hemorrágico, necrótico o gránulos.

**Observación microscópica.** El examen microscópico directo de una muestra clínica correctamente tomada es el medio más simple y rápido de detectar una infección fúngica. Cuando los elementos fúngicos están presentes en número suficiente se puede establecer una orientación diagnóstica presuntiva, en ocasiones definitiva, y en pocos minutos informar al clínico, lo cual permitirá la instauración temprana de una terapia antifúngica, siendo éste uno de los factores esenciales en el pronóstico de las micosis en los pacientes inmunocomprometidos.

La microscopía sigue siendo una de las herramientas más antiguas y útiles del micólogo clínico. Con frecuencia los hongos tardan en desarrollar las estructuras conidiógenas características para su identificación definitiva. Por lo tanto, es de gran utilidad que a la vez que se inoculan los medios de cultivo, se realicen las técnicas microscópicas que, en tiempo real (menos de 10 min), puedan orientar de forma preliminar la etiología del proceso.

El examen microscópico directo proporciona un diagnóstico definitivo si se observan elementos fúngicos patognomónicos: cápsula de *Cryptococcus neoformans*, células fumagoides en cromoblastomycosis, levaduras pequeñas intracelulares de *Histoplasma capsulatum*, quistes/ascas típicos de *P. jiroveci*, levaduras con brotes de base ancha de *Blastomyces dermatitidis*, levaduras con gemación multipolar en rueda de timón de *Paracoccidioides brasiliensis* o las esférulas de *Coccidioides immitis*. En algunos casos, el diagnóstico microscópico puede ser la única evidencia de infección fúngica y, en otros, su negatividad puede sustentar la interpretación de aislamientos como contaminantes. La escasez de la muestra es, en la práctica, la única razón para no efectuar la observación microscópica en beneficio del cultivo. El examen microscópico puede también orientar la técnica de cultivo (medios, temperatura, tiempo de incubación, precauciones especiales de bioseguridad) e, incluso, su inutilidad por tratarse de patógenos enigmáticos no cultivables como *Rhinosporidium seeberi*, *Lacazia loboi* o *Pneumocystis jiroveci*.

Los métodos usados para la visualización fúngica difieren en algunos aspectos de los de las bacterias; el mayor tamaño de los hongos hace, generalmente, innecesarios la tinción de frotis secos; en su lugar son más utilizadas las preparaciones directas en fresco con o sin líquidos de montaje y clarificación. La observación microscópica se realiza con bajo aumento, seguida de alto aumento en seco y, si es necesario, con aceite de inmersión. Las dos formas observadas habitualmente son

Tabla 2: Agentes etiológicos de micosis superficiales cutáneas y mucocutáneas

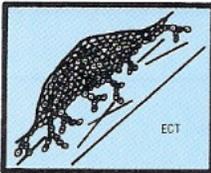
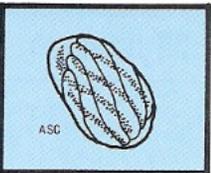
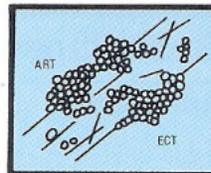
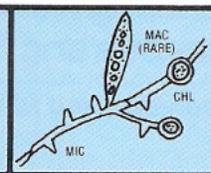
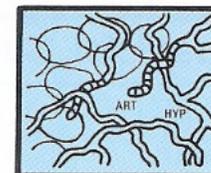
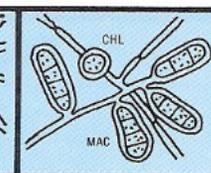
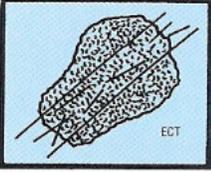
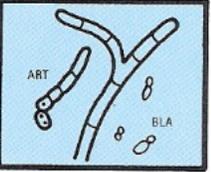
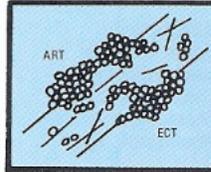
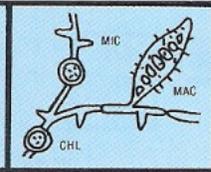
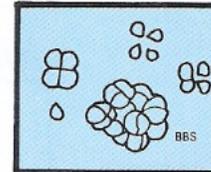
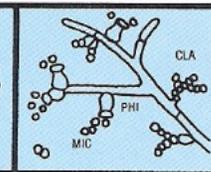
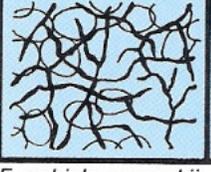
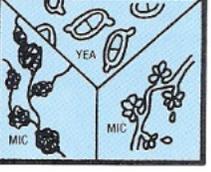
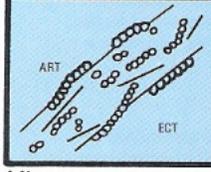
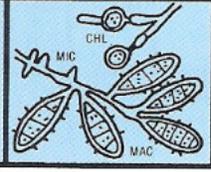
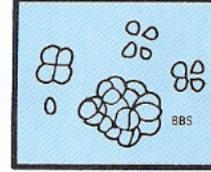
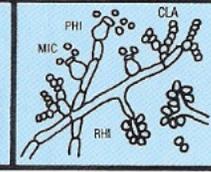
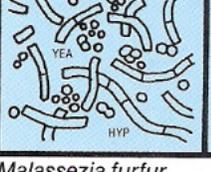
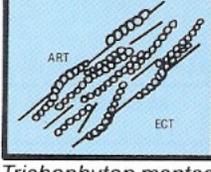
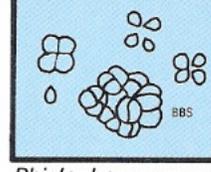
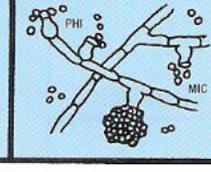
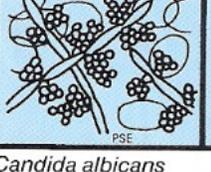
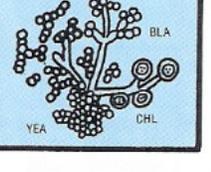
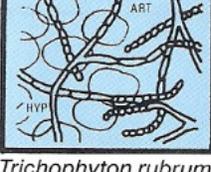
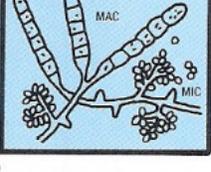
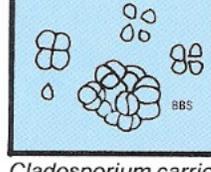
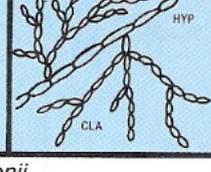
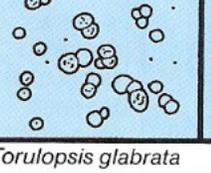
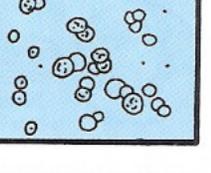
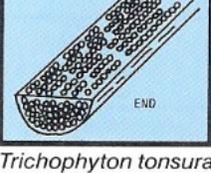
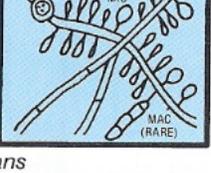
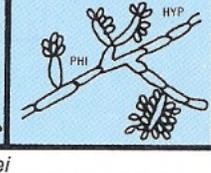
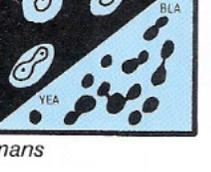
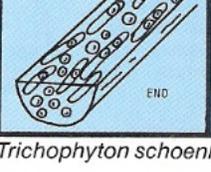
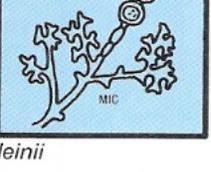
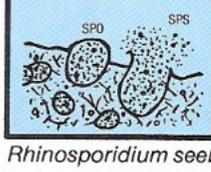
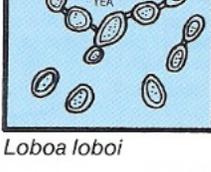
IN VIVO	IN VITRO	IN VIVO	IN VITRO	IN VIVO	IN VITRO
					
<i>Piedraia hortai</i>		<i>Microsporum audouinii</i>		<i>Epidermophyton floccosum</i>	
					
<i>Trichosporon beigeli</i>		<i>Microsporum canis</i>		<i>Fonsecaea compacta</i>	
					
<i>Exophiala werneckii</i>		<i>Microsporum gypsum</i>		<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	
	<p>CULTURE NOT NECESSARY</p>				
<i>Malassezia furfur</i>		<i>Trichophyton mentagrophytes</i>		<i>Phialophora verrucosa</i>	
					
<i>Candida albicans</i>		<i>Trichophyton rubrum</i>		<i>Cladosporium carrionii</i>	
					
<i>Torulopsis glabrata</i>		<i>Trichophyton tonsurans</i>		<i>Exophiala jeanselmei</i>	
					<p>NOT CULTIVABLE</p>
<i>Cryptococcus neoformans</i>		<i>Trichophyton schoenleinii</i>		<i>Rhinosporidium seeberi</i>	
					<p>NOT CULTIVABLE</p>
				<i>Lobaia loboii</i>	

Tabla mostrando las características morfológicas de las diferentes especies de hongos patógenos y su morfología

**in vivo** : tal como se observa la morfología en una tinción al fresco y al directo de la muestra;

**In vitro**: tal como se observa la morfología de un frotis al fresco del cultivo de la misma muestra.

**Tabla 3 : Agentes etiológicos de micosis profundas , subcutáneas y sistémicas**

IN VIVO	IN VITRO	IN VIVO	IN VITRO	IN VIVO	IN VITRO
<i>Actinomyces</i> spp.		<i>Acremonium</i> spp.		<i>Cunninghamella</i> spp.	
<i>Nocardia</i> spp.		<i>Aspergillus fumigatus</i>		<i>Syncephalastrum</i> spp.	
<i>Cryptococcus neoformans</i>		<i>Fusarium</i> spp.		<i>Blastomyces dermatitidis</i>	
<i>Candida albicans</i>		<i>Paecilomyces</i> spp.		<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	
<i>Geotrichum candidum</i>		<i>Penicillium</i> spp.		<i>Coccidioides immitis</i>	
<i>Torulopsis glabrata</i>		<i>Pseudallescheria boydii</i>		<i>Histoplasma capsulatum</i>	
<i>Trichosporon beigelii</i>		<i>Rhizopus</i> spp.		<i>Histoplasma duboisii</i>	
<i>Prototheca</i> spp.		<i>Absidia</i> spp.		<i>Sporothrix schenckii</i>	
<i>Pneumocystis carinii</i>		<i>Mucor</i> spp.			

Tabla mostrando las características morfológicas de las diferentes especies de hongos patógenos y su morfología

**in vivo** : tal como se observa la morfología en una tinción al fresco y al directo de la muestra ;  
**In vitro**: tal como se observa la morfología de un frotis al fresco del cultivo de la misma muestra.

levaduras y/o elementos miceliares. La mayoría de los hongos se pueden detectar sin tinción, en la mayor parte de las muestras clínicas como esputos, orinas, exudados y LCR, usando siempre que sea posible microscopia de contraste de fases. No obstante, se han desarrollado una serie de tinciones (tinta china, Giemsa, argénticas, agentes quimiofluorescentes, etc.) para mejorar la sensibilidad de la técnica. Las técnicas microscópicas directas son de gran utilidad en el estudio de muestras clínicas de pacientes con micosis que afectan a la piel y mucosas, pero también son muy útiles en el diagnóstico de micosis subcutáneas y profundas.

Son múltiples las técnicas de observación microscópica para el diagnóstico de las micosis. Se utilizan montajes húmedos, tinciones fijas y diversas técnicas histológicas para las muestras de tejidos. En los montajes húmedos, la adición de KOH y dimetil-sulfóxido (DMSO) permiten la clarificación de la muestra, mientras que la adición de glicerol, mejora la conservación de las estructuras fúngicas. La sensibilidad de las diferentes técnicas en montaje húmedo es semejante, aunque la observación requiere menos experiencia en el caso de las tinciones basadas en métodos fluorescentes. De entre las tinciones fijas e histológicas, las tinciones argénticas y el PAS son las más adecuadas para la observación de estructuras fúngicas. En la tabla 2 se resumen las técnicas que se pueden utilizar.

### Limitaciones del examen microscópico

- Un examen directo negativo nunca descarta una infección fúngica. La sensibilidad de la técnica puede estar entre 103-105 elementos fúngicos por ml y puede depender del lugar anatómico, tipo de paciente, tinción y experiencia del observador.
- El examen microscópico puede originar falsos positivos al confundirse ciertas estructuras con elementos fúngicos (linfocitos lisados que se confunden con *C. neoformans* en la tinción con tinta china, fibras de colágeno o del hisopo que se confunden con elementos fúngicos, gotas de grasa con levaduras en gemación, etc.). Estos posibles errores pueden minimizarse con un segundo examen o con la experiencia del observador.
- El examen microscópico debe realizarse, al menos, en todas las muestras con alta sospecha de micosis; aunque lo ideal sería realizarlo siempre que fuese posible.
- Posee una relativamente baja sensibilidad diagnóstica.
- En la mayoría de los casos, no es posible identificar la especie fúngica.
- No permite la realización de estudios de sensibilidad a los antifúngicos.

En fresco:	Tinciones:
-KOH -KOH + tinta Parker -KOH + blanco calcoflúor -Tinta china ( <i>Cryptococcus</i> )	-KOH, KOH + tinta Parker, KOH + blanco calcoflúor: uso general. -Giemsa: uso general. -PAS: uso general. -Tinciones argénticas: uso general. -Fontana Masson: <i>Pneumocystis</i> , dematiáceos.

### SELECCIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO

El objetivo fundamental de la utilización de los medios de cultivo es optimizar el crecimiento de los microorganismos. En los medios de cultivo micológicos, los antimicrobianos se utilizan tanto para inhibir el crecimiento bacteriano como el de otros hongos ambientales.

## CLASIFICACIÓN

Atendiendo a su composición, los medios de cultivo pueden ser generales, enriquecidos, selectivos, diferenciales y especiales.

**Generales:** El más característico y clásico es el agar Sabouraud con glucosa . Se utiliza como medio de cultivo general y fundamentalmente para la realización de la descripción de las características morfológicas de la mayoría de los hongos.

**Enriquecidos:** Se utilizan especialmente en micosis sistémicas endémicas (histoplasmosis, blastomycosis), para la recuperación de la fase levaduriforme. Un ejemplo de estos medios es el agar cerebro-corazón con sangre (BHI).

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

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

**Especiales:** Son aquellos medios que contienen algún componente (por ejemplo, ácido cafeico) destinado a aislar un agente concreto ( *C. neoformans*), favorecer la identificación de ciertas especies (por ejemplo, el medio de Czapeck), u obtener estructuras de reproducción sexual (por ejemplo, agar acetato, agar patata-zanahoria).

## ELECCIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

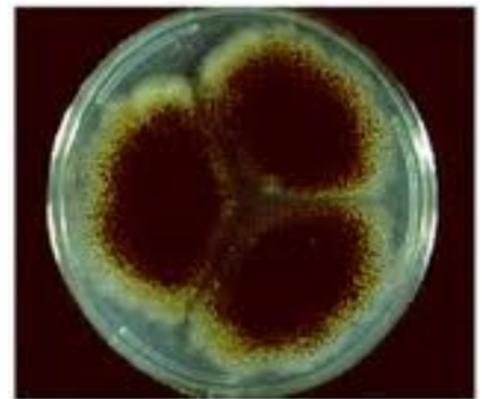
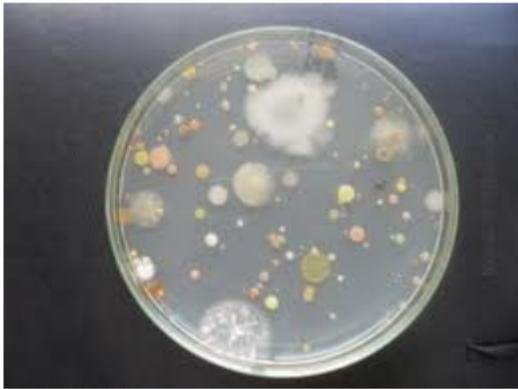
Los medios más utilizados en el cultivo de hongos son: agar Sabouraud glucosa (AGS), habitualmente con la modificación de Emmons, con cloranfenicol y con/sin actidiona; agar infusión cerebro corazón (BHI) con o sin sangre de cordero al 5%, con o sin antibacterianos; y agar papa dextrosa . Sin embargo, los hongos también pueden crecer en medios no selectivos, incluidos la mayoría de los medios bacteriológicos, si se incuban el tiempo suficiente. La elección y el número de medios a utilizar están condicionados por el costo, la disponibilidad y las preferencias personales, pero siempre se deben incluir medios con antibacterianos y sin ellos. La incorporación de cicloheximida (actidiona), inhibidor de muchos hongos considerados contaminantes, ayuda especialmente en las micosis de la piel, aunque pueda inhibir algunos patógenos fúngicos importantes; por ello, debe utilizarse siempre en combinación con otro medio sin cicloheximida.

Los medios de cultivo más empleados en micología pueden agruparse en dos categorías en función de su utilidad: aislamiento e identificación. Para el aislamiento, la utilización de 3-4 medios prácticamente cubre todas las necesidades: AGS con/sin antimicrobianos; un medio con cicloheximida y agar infusión cerebro corazón, para las micosis sistémicas endémicas. Para la identificación, puede ser necesario un número mayor de medios que dependerá del número de muestras, las etiologías más probables en la zona geográfica, las posibilidades del laboratorio y el nivel diagnóstico esperable según el tipo de centro.

**Agar Czapek Dox:** se utiliza en el cultivo de hongos saprofitos, especialmente *Aspergillus* spp. y *Penicillium* spp. Es el medio de referencia para la identificación de *Aspergillus* spp.

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

**Agar Dixon modificado:** utilizado en el cultivo de *Malassezia* spp. Puede modificarse añadiendo cloranfenicol o bien cloranfenicol y cicloheximida.



**Agar Sabouraud + Glucosa modificado por Emmons:** es el medio estándar para el aislamiento, esporulación y conservación de muchos hongos. Su pH y la concentración de glucosa favorecen la esporulación.

**Agar infusión de cerebro corazón:** puede utilizarse como medio enriquecido para facilitar el crecimiento de *C. neoformans* a partir de muestras estériles como el LCR y el mantenimiento de la fase levaduriforme de algunas micosis sistémicas, ya sea con sangre o sin ella. En general, está indicado para el aislamiento de una gran variedad de patógenos, incluyendo levaduras, mohos y bacterias como *Nocardia*. Enriquecido con sangre de carnero al 10%, se utiliza para el aislamiento de todos los hongos, incluyendo los hongos dimórficos. Pueden añadirse antibacterianos (cloranfenicol y/o gentamicina) para convertirlo en selectivo. En algunas ocasiones también puede completarse con cicloheximida (facilita el aislamiento de *Histoplasma capsulatum* y *Blastomyces dermatitidis*).

**Agar inhibidor de mohos:** es un medio enriquecido que contiene cloranfenicol o gentamicina, pero no actidiona. Se utiliza en el aislamiento de hongos sensibles a la cicloheximida (*Cryptococcus*, zigomicetos, etc.) a partir de muestras contaminadas. Permite el desarrollo de la mayoría de los mohos y de las levaduras.

**Agar Sabouraud con cicloheximida y cloranfenicol:** es un medio selectivo utilizado para el aislamiento de hongos patógenos a partir de muestras muy contaminadas con hongos saprofitos y bacterias. Se utiliza fundamentalmente en el aislamiento de dermatofitos y hongos dimórficos. Inhibe algunas especies de hongos de interés médico (*Candida no albicans*, *Aspergillus*, zigomicetos, *C. neoformans*, etc.).

**Agar urea de Christensen:** se utiliza en la identificación de algunos dermatofitos, especialmente *Trichophyton rubrum* de *Trichophyton mentagrophytes* y de algunas levaduras (*C. neoformans*).

**Medios cromogénicos para levaduras: Cromocandida** contienen diversos sustratos enzimáticos que están unidos a compuestos cromogénicos. Muy útil para el estudio de levaduras.

**Dermatophyte test medium:** medio utilizado para el aislamiento de dermatofitos en muestras muy contaminadas, proporcionando una identificación presuntiva. Los dermatofitos producen alcalinización, virando el medio de amarillo a rojo. Algunas bacterias y algunos hongos también pueden producir alcalinización. Debido a que se trata de un medio coloreado, no es un medio útil para la caracterización de los pigmentos producidos por los dermatofitos. La cicloheximida inhibe muchos de los hongos saprofitos.

**Agar harina de maíz con/sin Tween 80:** se utiliza en el cultivo y diferenciación de especies de *Candida* basándose en las características miceliales. El Tween 80 se incorpora para demostrar la formación de clamidoconidias. Si se le añaden 10 g de glucosa puede utilizarse en la diferenciación de *T. rubrum* y *T. mentagrophytes* basándose en la producción de pigmento.

**Agar Lactrimel :** Medio conteniendo leche, harina de trigo, y miel. Además contiene inhibidores lo que impide el desarrollo de Bacterias :(E.Coli y cocáceas : S.aureus)

## INCUBACIÓN

La temperatura óptima de crecimiento de la mayoría de los hongos patógenos es 30 °C. Sin embargo, *Sporothrix schenckii* es una excepción, crece más rápido a 27–28 °C. Hay laboratorios que utilizan la temperatura ambiente en lugar de 30°C, pero no es recomendable, ya que los cambios de temperatura son notables entre el día y la noche en la mayoría de los laboratorios. La temperatura de 37°C no se recomienda por dos razones principales: 1) muchas muestras contienen abundantes bacterias que crecen muy bien a esta temperatura; 2) algunos hongos crecen mal a esta temperatura o no crecen, especialmente los hongos que infectan la piel. No hay ventaja en incubar simultáneamente a 30°C y a 37°C. La temperatura de 37°C debe reservarse para hongos dimórficos o algún

hongo que se desarrolle mejor a esta temperatura. Los cultivos de hongos deben incubarse durante 3-4 semanas antes de ser desechados, y no deben desecharse cuando se aísla un hongo, sino que debe completarse el periodo de incubación. Sin embargo, hay muestras que se pueden eliminar antes (por ejemplo, exudado vaginal), a los 7 días, cuando se realizan cultivos habituales.

## IDENTIFICACIÓN

### HONGOS FILAMENTOSOS

Cuando el crecimiento detectado corresponda a un hongo filamentoso, la identificación se debe hacer por el examen macroscópico de la colonia: forma, color, textura, velocidad de crecimiento y reverso. Si el hongo tiene abundantes formas de reproducción se emplea la técnica del scotch o papel de celofán, que consiste en tocar la superficie de la colonia con la cinta adhesiva y colocarla sobre un porta, en el que se ha depositado una gota de azul de lactofenol y observar al microscopio.

Cuando no se puede conseguir una buena observación de las formas de reproducción por las técnicas anteriores, es necesario hacer un microcultivo. Esta técnica consiste en depositar sobre un porta un trozo de agar de Sabouraud, o del medio recomendado según el género de hongo filamentoso que se presume, de 1 cm<sup>2</sup> de superficie aproximadamente, en cuyos extremos se inocula el hongo problema (en profundidad). Posteriormente se le coloca un cubre encima y se incuba en cámara húmeda a 25°C hasta observar crecimiento; entonces se toma el cubre, que es donde se han depositado las formas de reproducción, y se coloca sobre un porta que lleva una gota de azul de lactofenol y se observa al microscopio.

Los criterios de identificación son fundamentalmente morfológicos basados en la presencia de estructuras de reproducción sexual, estructuras de reproducción asexual y características especiales de las hifas, cuya descripción pueden ser consultados en atlas micológicos. En ocasiones, la identificación se complementa con pruebas bioquímicas, como la investigación de la ureasa, que diferencia *T. mentagrophytes* (positivo) de *T. rubrum* (negativo).

Todavía limitada a determinados laboratorios especializados, pero en continuo desarrollo, está la identificación molecular de los aislamientos fúngicos, basada en los mapas de restricción de fragmentos del operón ribosomal, digeridos con un panel de enzimas de restricción, que permite la elaboración de árboles filogenéticos.

### LEVADURAS

La identificación de la especie de toda levadura aislada en sangre o en cualquier otro líquido corporal estéril está plenamente justificada. También es conveniente la identificación de las levaduras de otras procedencias, sobre todo cuando ocurre de forma reiterada en diferentes muestras clínicas del mismo paciente, y siempre que se asuma que se trata de un organismo responsable de patología.

La mayoría de los organismos levaduriformes crecen fácilmente en un gran número de medios de cultivo usados rutinariamente en el laboratorio de microbiología (agar sangre, agar chocolate, agar Cled, etc.). Sin embargo, el AGS, con o sin antibióticos añadidos, es el medio de aislamiento por excelencia para la identificación de levaduras. En el medio AGS las colonias de levaduras suelen ser completas, ligeramente abombadas o planas, de consistencia mantecosa, lisa o rugosa, con olor dulzón agradable, volviéndose más pastosas a medida que la colonia envejece. Por lo general, las colonias de levaduras no desarrollan micelio aéreo, aunque en ocasiones pueden aparecer prolongaciones aracneiformes en la periferia de las colonias.

Identificación convencional. Si se visualiza crecimiento en cualquier medio que sugiera posibilidad de levaduras, se realiza una extensión en fresco. Si en la misma se observan levaduras, se procede a la identificación mediante subcultivo a un medio cromogénico, Cromocandida. En el caso que

no se trate de ninguna de las especies que este medio identifica, se procede a hacer la identificación mediante auxonograma de carbono preparado en el propio laboratorio, o mediante alguno de los métodos comerciales basados en él. La identificación bioquímica debe completarse con una identificación morfológica mediante un subcultivo al medio agar harina de maíz con o sin Tween 80.

Si se observa un micelio aéreo definido, debe considerarse la posibilidad de que se trate de un hongo dimórfico o de ciertas especies de levaduras que pueden formar micelio verdadero como *Geotrichum*, *Dipodascus* o *Trichosporon*. Una colonia de aspecto y consistencia mucosoide sugiere la formación de cápsulas y puede ser el paso inicial para la identificación de *C. neoformans*. Las colonias de color rojo-anaranjado o naranja, de aspecto cremoso o rugoso son características de las especies del género *Rhodotorula* (rhodo: rojo), color que manifiesta esta levadura por su riqueza en carotenoides.

## Otros medios diagnósticos complementarios

- **Prueba del tubo germinal o filamentación precoz:** el tubo germinal es una extensión filamentosas de la levadura, sin estrechamiento en su origen, cuyo ancho suele ser la mitad de la célula progenitora y su longitud tres o cuatro veces mayor que la célula madre. Sólo *C. albicans*, y en menor medida *C. dubliniensis*, son capaces de producir verdaderos tubos germinales; sin embargo, otras especies como *C. tropicalis* pueden producir pseudohifas precoces de aspecto similar a los tubos germinales pero con una zona de constricción característica adyacente a la célula madre, por lo que esta prueba es útil para diferenciar *C. albicans* y *C. dubliniensis* del resto de las especies de *Candida*.

Falsos negativos: aproximadamente un 5% de cepas de *C. albicans* dan negativa la prueba de los tubos germinales. Si se utiliza un inóculo demasiado abundante de levaduras, también pueden obtenerse falsos resultados negativos.

Metodología: 1) emulsionar una porción de la colonia aislada en 0,5 ml de suero humano, de caballo o de conejo. 2) Incubar a 35°C durante 2 horas. 3) Depositar una gota de la emulsión sobre un portaobjetos limpio y desengrasado, colocar un cubre-objetos y visualizar a 100 X, 400 X ó 1000 X.

Interpretación: La prueba es positiva si se visualizan tubos germinales.

- **Detección de ureasa:** una levadura con reacción positiva a la prueba de la ureasa es sugestiva de pertenecer al género *Cryptococcus*. Concretamente, las cepas de *C. neoformans* comienzan a provocar cambio de color a las 2 horas de incubación a 35°C en un tubo de urea de Christensen inoculado con una colonia del aislado sospechoso. Esta prueba también puede utilizarse para diferenciar *Trichosporon* (ureasa positiva) de *Geotrichum* (ureasa negativa).

- **Prueba de la enzima nitrato-reductasa:** la capacidad de *C. neoformans* de reducir nitratos a nitritos es una prueba de utilidad cuando se pretende identificar esta levadura.

Procedimiento: 1) pasar la punta de un hisopo por la superficie de 2-3 colonias aisladas de un cultivo de 48-72 horas de crecimiento en cualquiera de los medios habituales. 2) Incubar el tubo con el hisopo a 45°C durante 10 min. 3) Sacar el hisopo y agregar al tubo 2 gotas de alfa-naftilamida y 2 gotas de ácido sulfanílico. 4) Reintroducir el hisopo en el tubo para que absorba los reactivos.

Interpretación: el desarrollo inmediato de un color rojo indica una reacción positiva.

- **Prueba de la fenol-oxidasa:** *C. neoformans* produce fenol-oxidasa, una enzima necesaria para el metabolismo de la 3,4-dihidroxifenilalanina (DOPA) y otros compuestos fenólicos en la síntesis de la melanina. Esto se evidencia por la producción de un pigmento marrón oscuro o negro alrededor de la colonia de *C. neoformans* en el medio que contenga catecoles, como el ácido cafeico, o el medio preparado con semillas de niger (*Guizotia abyssinica*).

Interpretación: el desarrollo de una pigmentación marrón oscura alrededor del crecimiento es carac-

terístico de *C. neoformans*.

**-Detección de antígenos y Anticuerpos :** Se han descrito numerosas técnicas para la detección de antígenos fúngicos, algunas de ellas incluso disponibles comercialmente.

Látex para *Cryptococcus*: este método de aglutinación se utiliza para la detección del polisacárido capsular de *C. neoformans*, tanto en suero como en LCR, con fines diagnósticos y de monitoreo de la terapia. Tiene una sensibilidad cercana al 95% y una especificidad entre 93 y 100%<sup>15,16</sup>.

Inmunofluorescencia para *Pneumocystis jirovecii* (ex *carinii*): esta técnica utiliza anticuerpos monoclonales específicos contra determinantes antigénicos de la pared de los quistes y trofozoitos de *P. jirovecii*. Tiene una sensibilidad reportada cercana a 100% y una especificidad de alrededor de 96%<sup>17,18</sup>.

Antigenemia para búsqueda de *Aspergillus* spp: recientemente se ha incorporado un inmunoensayo tipo "sandwich" comercial que utiliza un anticuerpo monoclonal dirigido contra la cadena lateral 1,5 b-D galactofuranósido del galactomanano. El ensayo tiene un límite de detección entre 0,5 y 1,0 ng/ml de suero, superior a los 15 ng/ml de suero descrito para el látex existente previamente. En un estudio cuyo estándar de oro fue el cultivo y la histología, la sensibilidad fue de 92,6% y la especificidad de 95,4%. El test fue positivo en promedio 6 días antes que la sospecha clínica<sup>19</sup>. Actualmente se considera que un examen positivo debe ser confirmado con una segunda muestra y forma parte de los criterios usados por EORTC y NIAID para definir micosis invasoras.

Detección de antígenos de *Candida* spp: método de aglutinación con partículas de látex para un antígeno termolábil no bien caracterizado, que en los diferentes estudios ha mostrado valores desde 25 hasta 100% de sensibilidad para el diagnóstico de candidiasis invasora, y por lo tanto no existe consenso sobre su utilidad clínica. Otras moléculas blanco como por ejemplo manano, enolasa y D-arabinitol, han sido estudiadas para el diagnóstico de candidiasis invasora, pero lamentablemente todos estos ensayos han tenido una utilidad muy limitada..

### **-Biología molecular**

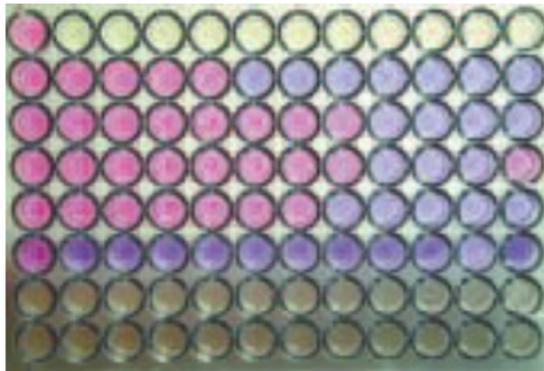
Debido a las dificultades tanto de sensibilidad, especificidad y retardo de las técnicas microbiológicas tradicionales, se han desarrollado durante la última década diversas técnicas en el campo de la biología molecular con gran potencial en el área del diagnóstico micológico, tanto para la pesquisa e identificación del agente causal como para la evaluación de clonalidad con distintos fines.

Entre las técnicas más difundidas está la amplificación por RPC, especialmente por su alta sensibilidad y rapidez. Esta técnica se ha implementado en diferentes aproximaciones: RPC con partidores especie o género -específicos, RPC y Southern blot, RPC y análisis con enzimas de restricción, RPC anidada, RPC en tiempo real, RPC con análisis de fragmentos y secuenciación.

## PRUEBAS DE SENSIBILIDAD

Los medios de cultivo necesarios para hacer las pruebas de sensibilidad dependerán del método que se siga. En general son medios sintéticos definidos, como el RPMI con o sin glucosa. Se deben hacer pruebas de esterilidad del medio así como de medida del pH, que debe situarse alrededor de  $7,0 \pm 0,3$ . En caso contrario, los antifúngicos pueden perder parte de su capacidad inhibitoria. Los antifúngicos deben obtenerse en forma de sustancia valorada solicitándolos al laboratorio que los produce o en aquellos casos en los que sea posible, adquiriéndolos a través de un distribuidor acreditado. Debe conocerse el número de lote, potencia, fecha de caducidad y condiciones de conservación. Las formulaciones preparadas para uso clínico no deben emplearse, pueden tener excipientes o formulaciones indeseables.

Los métodos de referencia describen con precisión todo el proceso de preparación de soluciones madre de los antimicrobianos, de las placas o tubos con concentraciones decrecientes, del inóculo, de la forma de inoculación y de lectura. Se aconseja realizar recuentos en placa a partir de las suspensiones inoculadas para comprobar que no se han cometido errores en la preparación del inóculo. Deben incluirse cepas control (ver PNT-MIC-05) en todas las pruebas para poder validar los resultados. Si se decide utilizar un método comercial deben seguirse fielmente las instrucciones del fabricante. Las condiciones de incubación no son especiales. Generalmente se cultivan en atmósfera normal, a 30 ó 35°C, durante 24-72 horas, dependiendo del método y de las especies fúngicas.



Panel Sensititre Yeast One

para el estudio de la sensibilidad in vitro

## BIBLIOGRAFÍA

- Diagnóstico microbiológico y de la micosis y estudios de sensibilidad a los antifúngicos. 2006 Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica Editores: Emilia Cercenado y Rafael Cantón
- DIAGNÓSTICO POR LABORATORIO DE LAS INFECCIONES POR HONGOS Fabiola Eugenia González Cuellar
- MANUAL DE PROCEDIMIENTOS Y TÉCNICAS DE LABORATORIO PARA LA IDENTIFICACIÓN DE LOS PRINCIPALES HONGOS OPORTUNISTAS CAUSANTES DE MICOSIS HUMANAS MINISTERIO DE SALUD INSTITUTO NACIONAL DE SALUD SERIE DE NORMAS TÉCNICAS Lima, 2007
- 1.-Clinical Laboratory Standards Institute. Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts. Approved Guideline, M44-A. Wayne, Pa. 2004.
  2. Clinical Laboratory Standards Institute Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Approved standard, M38-A. Wayne Pa. 2002.
  3. Clinical Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved Standard, M27-A2. Wayne, Pa. 2002.
  4. Cuenca-Estrella M. Infecciones por *Candida* spp. Infecciones superficiales y profundas, 8ª ed, vol. 68. Ediciones Doyma S.L., Barcelona. 2002.
  5. Cuenca-Estrella M. Infecciones profundas por otros hongos patógenos humanos, 8ª ed, vol. 68. Ediciones Doyma S.L., Barcelona. 2002.
  6. Cuenca-Estrella M, Moore CB, Barchiesi F, Bille J, Chryssanthou E, Denning DW, Donnelly JP, Dromer F, Dupont B, Rex JH, Richardson MD, Sancak B, Verweij PE, Rodríguez-Tudela JL. Multicenter evaluation of the reproducibility of the proposed antifungal susceptibility testing method for fermentative yeasts of the Antifungal Susceptibility Testing Subcommittee of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (AFST-EUCAST). *Clin Microbiol Infect* 2003; 9:467-474.
  7. Cuenca-Estrella M, Rodríguez-Tudela JL. ¿Pueden basarse las indicaciones de los antifúngicos en los estudios de sensibilidad? *Rev Iberoam Micol* 2002; 19:133-138.
  8. De Hoog GS, Guarro J. Atlas of clinical fungi. Centralbureau voor Schimmelcultures/ Universitat Rovira y Virgili. Baarn and Delf, The Netherlands, Universitat Rovira y Virgili, Reus, Spain. 2000.
  9. Edson RS, Fernandez-Guerrero ML, Roberts GD, Van Scoy RE. Clinical and laboratory features of cryptococcosis. A five-year experience. *Minn Med* 1987; 70:337-342.
  10. Espinel-Ingroff A, Barchiesi F, Cuenca-Estrella M, Pfaller MA, Rinaldi M, Rodríguez-Tudela JL, Verweij PE. International and multicenter comparison of EUCAST and CLSI M27-A2 broth microdilution methods for testing susceptibilities of *Candida* spp. to fluconazole, itraconazole, posaconazole, and voriconazole. *J Clin Microbiol* 2005; 43:3884-3889.
  11. Gadea I. DermatOMICOSIS y micosis tropicales, p. 47-56, MEDICINE, 8ª ed, vol. 68. Ediciones Doyma S.L., Barcelona. 2002
  12. Gavalda Santapau J, Ausina V. Infecciones por *Aspergillus*, 8ª ed, vol. 68. Ediciones Doyma S.L., Barcelona. 2002
  13. Gómez-López A, ABERKANE A, Petrikou E, Mellado E, Rodríguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M. Analysis of the influence of Tween concentration, inoculum size, assay medium, and reading time on susceptibility testing of *Aspergillus* spp. *J Clin Microbiol* 2005; 43:1251-1255.
  14. Isenberg HD. Clinical microbiology procedures handbook. American Society for Microbiology, Washington D.C. 1992.
  15. Kaufman L, Reiss E. Serodiagnosis of fungal diseases. In E. Lennette, A. Balows, W. J. J. Hausler, and H. J. Shadomy (ed.), *Manual of Clinical Microbiology*. American Society for Microbiology, Washington D.C. 1985.
  16. Lopez-Medrano R, Ovejero MC, Calera JA, Puente P, Leal F. An immunodominant 90-kilodalton *Aspergillus fumigatus* antigen is the subunit of a catalase. *Infect Immun* 1995 63: 4774-4780.
  17. Maertens J, Theunissen K, Verbeken E, Lagrou K, Verhaegen J, Boogaerts M, Eldere JV. Prospective clinical evaluation of lower cut-offs for galactomannan detection in adult neutropenic cancer patients and haematological stem cell transplant recipients. *Br J Haematol* 2004.126:852-860.
  18. Merz WG, Roberts GD. Detection and recovery of fungi from clinical specimens. En: P. R. Murray, E. J. Baron, M. A. Pfaller, F. C. Tenover, and R. H. Tenover (ed.), *Manual of Clinical Microbiology*. American Society for Microbiology, Washington D.C. 1999. p. 588-600.
  19. Odabasi Z, Mattiuzzi G, Estey E, Kantarjian H, Saeki F, Ridge RJ, Ketchum PA, Finkelman MA, Rex JH, Ostrosky-Zeichner L. Beta-D-glucan as a diagnostic adjunct for invasive fungal infections: validation, cutoff development, and performance in patients with acute myelogenous leukemia and myelodysplastic syndrome. *Clin Infect Dis* 2004; 39: 199-205.
  20. Pemán J, Martín-Mazuelos E, Rubio MC. Guía práctica de identificación y diagnóstico en Micología Clínica, 2 ed. Revista Iberoamericana de Micología, Bilbao. 2006.
  21. Pontón J, Moragues MD, Quindos G. Diagnóstico de la candidiasis invasora detectando anticuerpos anti-micelio. *Revista Iberoamericana de Micología*, Bilbao. 2004.
  22. Pontón J, Moragues MD, Quindos G.. Non-culture based diagnostics. En: R. Calderone (ed.), *Candida and Candidiasis*, vol. 1. American Society for Microbiology, Washington D.C. 2002 p. 395-425
  23. Prella M, Bille J, Pugnale M, Duvoisin B, Cavassini M, Calandra T, Marchetti O. Early diagnosis of invasive candidiasis with mannan antigenemia and antimannan antibodies. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2005; 51:95-101.
  24. Rex JH, Pfaller MA, Walsh TJ, Chaturvedi V, Espinel-Ingroff A, Ghannoum MA, Gosey LL, Odds FC, Rinaldi MG, Sheehan DJ, Warnock DW. Antifungal susceptibility testing: practical aspects and current challenges. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14: 643-658.
  25. Rodríguez-Tudela JL, Barchiesi F, Bille J, Chryssanthou E, Cuenca-Estrella M, Denning DW. Method for the determination of minimum inhibitory concentration (MIC) by broth dilution of fermentative yeasts. *Clinical Microbiology and Infection* 9:I-VIII. 2003.

26. Rodríguez-Tudela JL, Chryssanthou E, Petrikkou E, Mosquera J, Denning DW, Cuenca-Estrella M. Interlaboratory evaluation of hematocytometer method of inoculum preparation for testing antifungal susceptibilities of filamentous fungi. *J Clin Microbiol* 2003; 41:5236-5237.
27. Rodríguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M, Rodero L, Carpintero Y, Gorgojo B. Influence of shaking on antifungal susceptibility testing of *Cryptococcus neoformans*: a comparison of the NCCLS standard M27A medium, buffered yeast nitrogen base, and RPMI-2% glucose. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 44:400-404.
28. Röchel R, Behe M, Torp B, Laatsch H. Usefulness of optical brighteners in medical mycology. *Rev Iberoam Micol* 2001; 18:147-9.
29. Ruiz MP, Gadea I, Soriano F. 1993. [Utility of calcofluor white stain in the direct diagnosis of cutaneous fungal infections]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 11:109-10.
30. Sendid B, Tabouret M, Poirot JL, Mathieu D, Fruit J, Poulain D. New enzyme immunoassays for sensitive detection of circulating *Candida albicans* mannan and antimannan antibodies: useful combined test for diagnosis of systemic candidiasis. *J Clin Microbiol* 1999 ; 37:1510-7