

DIAGNÓSTICO POR LABORATORIO DE LAS INFECCIONES POR HONGOS

Fabiola Eugenia González Cuellar*

RESUMEN

El propósito de la siguiente revisión es informar al personal médico de la existencia de técnicas de laboratorio para el diagnóstico micológico de gran sensibilidad y especificidad que permitirá un diagnóstico rápido según se ilustra en algunos de los trabajos de investigación referidos. La velocidad en la obtención de un resultado de laboratorio es un aspecto fundamental en la medicina actual, ya que un diagnóstico rápido posibilitará la prescripción y el uso racional de un tratamiento específico, y en el caso de micosis limitará el desarrollo de resistencias de los hongos a los antimicóticos de uso común.

Día a día, la situación clínica de los pacientes exige una mayor precisión y rapidez diagnóstica, por lo cual es muy importante la estrecha comunicación entre el médico y el personal del laboratorio.

Palabras clave: *Diagnóstico micológico, hongos, micología, Cauca.*

INTRODUCCIÓN

En el diagnóstico micológico se están produciendo avances importantes que permiten un diagnóstico más rápido y eficiente, como la detección de antígenos y/o anticuerpos y las técnicas de biología molecular, algunos de las cuales ya se están implementando en nuestro medio. No se deja de lado los métodos convencionales que tienen gran utilidad y aportan información importante a la sospecha clínica, teniendo en cuenta factores básicos como una adecuada obtención de la muestra, un pronto envío y el procesamiento de la misma.

CLASIFICACIÓN DE LAS MICOSIS

Una forma frecuente de clasificar las micosis ha sido según su localización anatomoclínica¹, así se tienen las micosis superficiales, que a la vez pueden clasificarse en cosméticas y cutáneas, las micosis profundas que son las subcutáneas y las sistémicas, y las micosis oportunistas, que afectan pacientes con algún tipo de inmunodeficiencia o inmunosupresión.

Recibido para evaluación: Enero 30 de 2005. **Aprobado para publicación:** febrero 24 de 2005.

* Docente Departamento de Medicina Interna. Coordinadora grupo de Investigación BIOINESMI, integrante grupo de investigación CEMPA. Facultad Ciencias de la Salud, Universidad del Cauca, Popayán.

Correspondencia: Carrera 6 No. 13N-50 Popayán, Colombia.
Email: fegonza@unicauca.edu.co

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. beigeli/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, ectrothrix 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 queriom de celso y tiña fávica. Las otras, dependiendo del lugar del cuerpo comprometido son: Tiña barbae, Tiña córporis, Tiña manum, Tiña unguum 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 corneo 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.¹

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 *Fonsecae pedrosoi*, *Fonsecae compactum*, *Phialophora verrucosa*, *Cladosporium carrionii* y *Rhinochrysiella 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 dematiaceos, 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) **Blastomicosis.** 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) **Coccidioidomicosis.** 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) **Paracoccidioidomicosis.** 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 ulcero-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.

DIAGNÓSTICO DE LAS MICOSIS

El diagnóstico y manejo de las infecciones por hongos se basa en la combinación de la investigación clínica y de la investigación por parte del laboratorio.

Diagnóstico clínico:

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 malignas². 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.³
 - 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 hospedo o elementos clínico-radiológicos.
 - b) Infección probable: Es aquella en que existen factores predisponentes en el hospedero, elementos clínicos sugerentes y un estudio micológico positivo, pero no definitivo, como podría ser una serología de galactomanano 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.

Para lograr este objetivo se requiere realizar adecuadamente la recogida de la muestra, su transporte y procesamiento, además de contar con los detalles sobre el cuadro clínico y los antecedentes epidemiológicos. Es importante disponer de la siguiente información:

- 1) Historia clínica del paciente.
- 2) Tratamientos antimicrobianos, citotóxicos o fármacos inmunosupresores.
- 3) Ocupación del paciente.
- 4) Historia de residencia o viajes al exterior.
- 5) Contacto con animales.
- 6) Tipo de muestra a analizar.
- 7) En qué condiciones fue recolectada la muestra.

Es muy importante que las muestras sean enviadas al laboratorio una vez recolectadas, y en forma adecuada para su rápido procesamiento; de esta forma se minimiza la pérdida de viabilidad de los hongos, reduce el desarrollo de bacterias y asegura la obtención por cultivo del agente etiológico.

RECOGIDA DE MUESTRAS

Cuando la muestra es recolectada por el personal médico o de enfermería, por ejemplo en Líquido Cefalorraquídeo (LCR), biopsias, lavado bronquio alveolar (LBA) o esputo, es importante no olvidar etiquetar la muestra y llenar adecuadamente el formato de solicitud, de forma que refleje claramente la sospecha clínica y los datos anteriormente anotados.

1. Consejos generales para optimizar la recogida de muestras.⁴
 - a) Debe disponerse de un protocolo de recogida de muestras actualizado periódicamente.
 - b) Es necesario recoger las muestras asépticamente, utilizando frascos estériles y remitirlas al laboratorio antes de 2 horas.

- c) Las muestras deben recogerse antes de instaurar el tratamiento, o después de su suspensión (1-2 semanas para piel o pelo y varios meses para las uñas). En el caso de lesiones cutáneas, debe recolectarse de la parte activa de la lesión.
- d) Los hisopos deben ser evitados, pero hay muestras que lo requieren, como por ejemplo las de conducto auditivo, vagina y cérvix.
- e) En el caso de heridas abiertas, drenajes o lesiones superficiales, debe limpiarse la zona previamente con etanol (70%) para evitar contaminaciones.
- f) Las muestras de lesiones cerradas y abscesos deben ser aspiradas con jeringa y transferidas a un frasco estéril.
- g) El raspado de lesiones de piel y faneras (pelos y uñas) pueden recolectarse con distintos materiales; los más utilizados son bisturí, moqueta o cepillo.
- h) En situaciones que requieran un estudio epidemiológico, debe establecerse la necesidad de una recogida ambiental, familiar o de animales.

En un estudio realizado en los consultorios de dermatología y el laboratorio del Hospital Nacional de Clínicas “Pedro Vella” de la Facultad de Ciencias Médicas en la Universidad Nacional de Córdoba, Argentina, se analizaron 88 muestras clínicas de pacientes con diagnóstico presuntivo de micosis superficiales, las muestras se recolectaron en dos etapas.⁵

1. Extracción de material sin preparación previa.
2. Extracción post-preparación:
 - a) Se suspendió todo medicamento sistémico o tópico con acción antifúngica 10 a 15 días antes de la extracción.
 - b) Tres a cinco días antes de la toma de muestra no se aplicaron pomadas, cremas o polvos sobre la piel, así como esmalte de uñas.
 - c) La zona debió ser higienizada con agua y jabón de tocador, así mismo se aconsejó realizar por lo menos tres lavados con infusión de manzanilla o agua hervida y sal tres días antes de acudir al laboratorio.
 - d) En el caso de extracción de material de uñas, se recomendó no cortarlas en la semana anterior a la obtención y además de los lavados fue necesario el cepillado de las mismas.
 - e) Si la zona afectada eran los pies, se recomendó usar calzado cerrado y medias después del último baño, cuidando que los zapatos no tuvieran restos de talco.

Recolección de las muestras:

- Raspado con bisturí para las lesiones de piel y uñas.
- Extracción de pelos con pinzas.
- Hisopos o bisturí para las lesiones mucosas y semimucosas.
- Todos los materiales fueron recogidos en materiales estériles.

Exámenes:

1. Examen directo con KOH al 40% y calor.
2. Coloraciones de Gram y Kinyoun.
3. Cultivos en agar Lactrimel y glucosado de Sabouraud con AB (ampicilina 100 mg/ml y gentamicina 80 mg/ml), incubados hasta 20 días a 28°C

Tabla 1. Resultados obtenidos en pacientes con y sin preparación

	Sin preparación				Con preparación			
	Positivos		Negativos		Positivos		Negativos	
	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%
Examen directo	40	45	48	55	70	79	18	21
Cultivo	26	29	65	75	55	63	33	37

Total de pacientes: 88

Se observa que la preparación del paciente es una etapa muy importante del estudio, ya que aumentó el porcentaje de exámenes directos y cultivos positivos, además de reducir al máximo la presencia de microorganismos contaminantes y colonizantes.

TRANSPORTE DE LAS MUESTRAS

Las muestras deben ser transportadas en un recipiente estéril, humidificado y a prueba de vertidos; sin embargo, las muestras dermatológicas pueden transportarse en un recipiente seco (placa de petri, papel de fotografía negro, frascos recolectores) o de forma ideal, sembrarla directamente sobre el medio de cultivo; no deben introducirse en medios de transporte, a no ser que sea fácil retirar la muestra del medio. Los raspados corneales y hemocultivos deben sembrarse directamente en el medio de cultivo adecuado. Las muestras cuyo transporte se prolongue más de 2 horas deben almacenarse a 4°C, excepto la sangre y los líquidos estériles (30-37°C) y las muestras dermatológicas (15-30°C).⁴

DIAGNÓSTICOS MICOLÓGICOS

Diagnóstico en tiempo real

La posibilidad de obtener resultados en menos de 10 minutos se centra en la observación directa de la muestra del paciente, utilizando tinciones de rápida realización como la tinta china, el blanco de calcoflúor y otros fluorocromos, o la tinción de gram y el KOH. Las principales desventajas de las técnicas microscópicas son su relativa baja sensibilidad, su incapacidad, en la mayor parte de los casos, para identificar el hongo a nivel de especie.⁶ Sin embargo, son de gran utilidad porque pueden aportar, en ocasiones, un diagnóstico definitivo (pitiriasis versicolor, paracoccidioidomycosis, criptococosis, etc), y en otras, un diagnóstico presuntivo previo a la confirmación definitiva por cultivo (candidiasis).

Un examen microscópico negativo no excluye la infección si la muestra es escasa; en estos casos el cultivo debe ser prioritario.

KOH: Digiere el material proteico, aclara pigmentos y disuelve el “cemento” que mantiene pegadas a las células queratinizadas y las de otros tejidos, ello permite observar los elementos fúngicos que estén presentes. Útil para muestras con raspados de piel, esputo, etc, que contengan células epiteliales.

Tinta china/ nigrosina: Es la técnica más ampliamente utilizada para poner de manifiesto la cápsula de *C. neoformans*. La cápsula aparece como un halo claro y nítido en torno a una levadura redonda, delimitada por las partículas de carbón en suspensión coloidal de la tinta china, exhibiendo un nítido contraste. La sensibilidad de la tinta china en los pacientes con meningitis criptocócica varía de 25% a 50% en los pacientes no-VIH y del 70% a 88% en pacientes con SIDA. Pueden producirse falsos positivos en presencia de levaduras de los géneros *Rhodotorula*, *Cándida* y otras especies de *Cryptococcus*, igual que por artefactos como leucocitos. Es importante diferenciar bien la levadura con doble pared refringente, con su cápsula, y siempre hay que confirmar el diagnóstico inicial con cultivo.⁷

Blanco de calcoflúor: La técnica se basa en la propiedad que tiene este fluorocromo de unirse de forma inespecífica a los residuos b-1,3 presentes en polisacáridos como la celulosa y la quitina de la pared celular de los hongos. Puede ser utilizado para observación de todo tipo de hongos, aunque es más utilizado para la visualización de *Pneumocystis jirovecii*, con una sensibilidad de 100%.

Diagnóstico rápido

La obtención de resultados cinco a ocho horas después de la toma de la muestra clínica⁶, es se logra por medio de estudios microscópicos utilizando tinciones como la plata metelamina y Giemsa. El rendimiento de estas técnicas es variable y depende de la concentración de los elementos fúngicos en la muestra; se puede obtener un aumento de la sensibilidad utilizando fluorocromos y anticuerpos.⁶

Pruebas serológicas. Se emplean generalmente en el diagnóstico de las micosis invasoras más importantes, permitiendo la detección tanto de antígenos fúngicos como la respuesta de anticuerpos que se produce durante el desarrollo de la micosis. Es de gran utilidad la combinación de técnicas para detectar antígenos y anticuerpos, por ejemplo para el diagnóstico de candidiasis invasora.

La detección de anticuerpos es de utilidad en el diagnóstico de la candidiasis invasora, aspergilosis broncopulmonar alérgica, aspergiloma, blastomicosis, histoplasmosis y paracoccidioidomicosis, y requiere del funcionamiento adecuado de la respuesta humoral. Sin embargo, si se utilizan técnicas lo suficientemente sensibles, es posible detectar niveles de anticuerpos de utilidad diagnóstica en algunos grupos de pacientes inmunocomprometidos con candidiasis invasora.⁸

La detección de antígeno capsular en líquidos orgánicos, especialmente LCR, es de especial interés ante la sospecha de meningitis criptocócica, debido a la rapidez, sencillez técnica y especificidad de la prueba que permite el diagnóstico, en 10 a 15 minutos, de aproximadamente el 99% de las meningitis criptocócicas⁹ y el 67% de las criptocosis diseminadas¹⁰, con una sensibilidad del 93% al 100% en pacientes con SIDA. Sin embargo, en este tipo de enfermos se han descrito cepas de *C. neoformans* con poca cápsula, en los que la concentración de antígeno puede ser anormalmente baja. La cuantificación del antígeno de *C. neoformans* es útil para controlar la evolución de la enfermedad, ya que el título desciende si la respuesta terapéutica es buena y aumenta días

antes que se produzca una recaída, especialmente en LCR⁷. Se han descrito falsos positivos debido a la presencia de factor reumatoideo, *Trichosporum beigeli*, *Capnocytophaga canimorsus* y en el suero de enfermos con septicemia o neoplasias; las placas donde se realiza la prueba deben estar libres de restos de desinfectantes y detergentes.⁷

La detección de antígeno se considera la posibilidad más interesante para el diagnóstico de la aspergilosis invasora en pacientes inmunocomprometidos. La detección de galactomanano mediante un ELISA, según estudios de Maertens et al y Sulahian et al, en pacientes con neutropenia sostenida y pacientes con trasplante de médula ósea mostró una sensibilidad entre 91-93% y especificidad entre 95-98%. La cuantificación bisemanal de galactomanano se considera positiva cuando se obtienen al menos dos determinaciones positivas, siendo el punto de corte elegido de 1 ng/ml por Maertens et al y de 1,5 ng/ml por Sulahian et al.¹¹ Se ha demostrado que la prueba es positiva antes que aparezca la sintomatología clínica.

Una alternativa similar es la detección de antígeno manano de *Cándida*, que presenta una buena especificidad pero baja sensibilidad; también se cuenta con la detección de componentes no antigénicos como el D arabinitol, el (1-3)-B-D glucano y el ADN.

Diagnóstico en más de 24 horas

1. **El cultivo** de la muestra clínica es el método más utilizado en el diagnóstico de las micosis, ya que una vez aislado el hongo permite la identificación a nivel de especie, los estudios de sensibilidad in vitro a los antifúngicos y los estudios de caracterización.⁶

El tiempo de crecimiento de los hongos está determinado genéticamente y puede variar de unas pocas horas a varios días. En general, las levaduras pueden detectarse tras 24 a 72 horas de cultivo, mientras que los hongos filamentosos necesitan más de 48 horas, como en el caso de los mucorales, o 33 días como por ejemplo *Blastomyces dermatitidis*.

Para algunos hongos el cultivo se considera el método de referencia y establece el diagnóstico definitivo, por ejemplo en criptococosis, sin embargo en cultivo de uñas podemos tener cultivos negativos, así el examen directo sea positivo; esto es debido a que las células fúngicas no son viables en la queratina ungueal, por lo que la toma de muestras se debe repetir un mínimo de 3 a 4 veces para aislar el hongo.

Criterios para aislamiento significativo¹²

- 1) KOH positivo + Cultivo (dermatofitos): Aislamiento significativo.
- 2) KOH (Levadura con Pseudomicelio) + Biopsia (Levadura y Pseudomicelio) + Cultivo (*Cándida sp*): Aislamiento significativo

2. **Estudio de biopsias titulares.** Es una técnica alternativa muy empleada para el diagnóstico de las micosis invasoras; plata metenamina y PAS se considera una prueba definitiva de la invasión tisular. El patólogo, con una metodología sencilla y rápida, puede llegar a diagnosticar algunos tipos de micosis, pero no solo identifica el agente causante, sino el tipo de lesión que produce, la respuesta inflamatoria y el órgano u órganos

afectados, además puede clasificar el tipo de micosis en superficial, cutánea, subcutánea, profunda o sistémica, en virtud de la localización.¹³

En un trabajo de investigación¹⁴ efectuado en el departamento de dermatología del Hospital St Luke's Roosevelt de New York, se realizó un estudio comparativo de 3 métodos diagnósticos en onicomycosis. Fueron evaluados 105 enfermos con sospecha clínica de onicomycosis, en todos los casos se realizó estudio con KOH al 20%, cultivo en agar dextrosa de Saboreaud, Biopsia (Bx)/PAS y tinción con blanco de calcoflúor (CW); los preparados se obtuvieron del borde libre de la uña y de la región subungueal, los cultivos se mantuvieron 4 semanas y la tinción de blanco de calcoflúor fue tomada como prueba estándar en el análisis estadístico. Los resultados revelaron que 93/105 enfermos tuvieron evidencia de micosis ungueales en menos de 1 de los 4 procedimientos diagnósticos evaluados; la visualización con KOH al 20%, Bx/PAS y cultivo se asociaron con una sensibilidad diagnóstica del 80%, 92% y 59%, respectivamente (según resultados positivos o negativos de la tinción con CW), la especificidad fue de 72%, 72% y 82%, respectivamente, VPP 88%, 89.7% y 90%, VPN 58%, 77% y 43%. 37 tuvieron resultados positivos con los 4 procedimientos, 21 presentaron positividad con la tinción de CW, Bx/PAS y KOH; 8 con CW y Bx/PAS y 12 fueron negativos con los 4 métodos. En este estudio, la confiabilidad del KOH y cultivo varía entre 50% y 70%, según el método que se utilice en la toma y preparación de la muestra.

Un estudio australiano de 32.000 uñas reveló que el 45% era positivo con ambos métodos (KOH y cultivo), el 10% a 40% lo era solo en el estudio con KOH y otro 10 a 30% solo mostraba resultados positivos en el cultivo. Puede haber resultados falsos negativos en los cultivos cuando las muestras tienen solo hongos muertos y no viables, y lo mismo puede ocurrir si la muestra no es suficiente o si se toma material de una zona distante al crecimiento del hongo. El retraso diagnóstico se asocia con demora en el inicio del tratamiento apropiado.

En un estudio descriptivo¹⁵ realizado por estudiantes de la Facultad de Medicina de la Universidad Pontificia Bolivariana en el Hospital Universitario San Vicente de Paúl en Medellín, que tuvo entre sus objetivos caracterizar clínicamente la onicomycosis en un grupo de 37 pacientes inmunosuprimidos, según su etiología y localización anatómica, a través de cultivos y exámenes directos con KOH al 10%, se tomaron 45 muestras ungueales así: 19 a pacientes VIH positivos y 26 a pacientes trasplantados. El examen directo fue positivo en 45 casos (100%), el cultivo en 42 casos (93%) y la concordancia entre ambos fue de 92%. Estos resultados se comparan con dos trabajos realizados en Chile: Zaroe et al reportan un rendimiento del KOH del 70.5% y del cultivo del 61.5%, y Díaz et al del 59.9% y del 51.1% respectivamente con una concordancia del 65%. Se indica que la alta positividad de esta investigación podría explicarse por una buena correlación clínica, una mayor colonización de los hongos por tratarse de pacientes inmunosuprimidos y la observación en el KOH de hongos viejos o muertos que no crecieron al cultivo.

En un trabajo que se está realizando en el Laboratorio con estudiantes del programa de Biología de la Universidad del Cauca, en Popayán, Colombia, para caracterizar por técnica

de espectroscopia de luz infrarroja (FTIR) cepas de *Cándida spp*, aisladas de secreción vaginal, se han procesado 128 muestras de secreción vaginal hasta el momento. Se han detectado 36 frotis y cultivos positivos para *Cándida* y 15 cultivos positivos para *Cándida* en los cuales no se observó en el frotis la presencia de *Cándida*, con un 47.2% de pacientes sintomáticas para vaginitis (prurito, eritema y flujo vaginal) y 52.8% asintomáticas, lo cual indicaría que el cultivo es de utilidad para detectar mujeres colonizadas por *Cándida spp*, que en un momento determinado bajo factores de riesgo o enfermedad de base, podrían sufrir una candidiasis vaginal o recurrente (datos no publicados).

Cándida albicans es la especie más frecuentemente detectada en ginecología (80-90%), *Cándida glabrata* es la segunda especie más frecuente en las vulvovaginitis candidiasicas (5-15%), y otras con menos frecuencia son *C. tropicalis*, *C. pseudotropicalis* y *C. krusei*. De hecho, el aumento de especies no *albicans* ha sido observado fundamentalmente en los episodios de vaginitis recurrente, y ello ha sido relacionado con una generación de terapias inadecuadas y subdiagnósticos al no realizar el cultivo en búsqueda del agente etiológico. La erradicación de *C. albicans* puede causar una selección de especies como *C. glabrata* resistente a diferentes antimicóticos de uso común, como el fluconazol.¹⁶

NUEVAS TÉCNICAS

La detección de ADN fúngico en la muestra clínica es otra posibilidad para el diagnóstico de micosis invasora, como por ejemplo la amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de secuencia conservada para todos los hongos (PCR panfúngica) o de secuencias específicas de una especie concreta (PCR específica) y la utilización de sondas de ADN. La utilización de biochips, los cuales se basan en la hibridación de fragmentos de ácidos nucleicos presentes en la muestra clínica con miles de oligonucleótidos que se encuentran en el soporte de vidrio, permiten encontrar secuencias específicas para la identificación de los hongos patógenos y para la detección de mutaciones que confieran resistencia o factores de virulencia.⁶

Cada laboratorio de micología debe contar con protocolos sobre los procedimientos que deben manejarse según el tipo de muestra. Por ejemplo, el laboratorio del Centro de Investigaciones Biológicas de Medellín - Colombia, maneja el siguiente protocolo sobre la técnica del examen directo.

PROTOCOLO LABORATORIO DE MICOLOGIA CIB-MEDELLIN

MUESTRAS	F	KOH	NC	CA	TCH	GI	GRM	KI
Escamas		X	X	X				
Uñas, detritus		X	X	X				
Pelos								
Dermatofitos		X	X	X				
Piedras	X	X	X	X				
Ojos	X	X	X	X			X	
Oídos	X	X	X				X	
Mucosas	X	X	X	X			X	
Espustos	X	X	X	X	X	X		X
LBA	X	X	X	X	X	X		X
LCR	X				X	X		X
Sangre				X		X	X	
Orina	X			X	X	X	X	
Líquidos corporales	X			X	X	X	X	
Biopsias	X	X	X	X	X	X	X	X
Medula ósea	X			X		X	X	
Secreciones	X	X	X	X	X	X	X	X
Material purulento	X	X	X	X	X	X	X	X
Gránulos y esclerotes	X	X	X	X			X	X

F: Fresco, KOH: Hidróxido de potasio, NC: Negro de clorazol E, CA: Calcoflúor, TCH: Tinta china, GI: Giemsa, GRM: Gram, KI: Kinyoun

El diagnóstico micológico de laboratorio puede ser difícil debido al reducido número de microorganismos presentes en algunas lesiones, el lento crecimiento de algunos de estos y la dificultad en distinguir la colonización de las superficies mucosas de la infección. El riesgo de tratamiento empírico es mayor en la infección por hongos debido a la toxicidad de algunos antifúngicos, especialmente anfotericina B por su administración prolongada por vía parenteral y los limitados datos para elegir la mejor dosis.

Las claves en el diagnóstico micológico radican en una correcta anamnesis, un buen examen físico y una acertada sospecha epidemiológica, así como de la oportuna decisión de realizar el estudio micológico, la correcta toma y transporte de la muestra, su procesamiento oportuno, la siembra en medios de cultivos según protocolos de laboratorio estandarizados, la incubación a temperatura requeridas según el hongo sospechado, y la identificación e interpretación correcta de los aislamientos.¹⁷

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Rubio Calvo M, Gil Tomas J, Rueca R, Ramírez I, Navarro L.** Micosis más frecuentes en nuestro medio, *Revista Iberoamericana de Micología*, 2001;2: 1-15
2. **Guzmán AM.** Importancia del laboratorio en el diagnóstico de las micosis invasoras; *Rev chilena infect 20004; (1):39-47*
3. **S.Ascioglu, J.H.Rex, B de Paux et al.** Defining Oportunistic Invasive Fungal Infections in Inmunocompromised Patients with Cancer and Hematopoietic Stem Cell Transplantas: An International Consensus, *Clinical infectio Disease* 2002;34:7-14.
4. **Rezusta L A, Sánchez S A, Gil TK.** Fundamentos básicos para el diagnóstico micológico, *Revista Iberoamericana de Micología*, 2001; (3):1-17.
5. **Garzón R, Carballo M, Muñoz E, Cipitteli L.** La importancia de la preparación del paciente en el examen micológico de laboratorio, *Revista Iberoamericana de Micología* 1998; 15:307-308.
6. **Pontón J.** diagnóstico microbiológico de las micosis, *Revista Iberoamericana de Micología* 2002; 19:25-29.
7. **Mozuelos M, Valverde-Conde A.** Criptococosis: diagnóstico microbiológico y estudio de sensibilidad in vitro, Control Calidad SEIMC 2003.
8. **Ponton J, Moragues MD, Quindos G.** Non-cultures based diagnostic. *American Society for Microbiology*, 2002:395-425.
9. **Kaufman L, Reiiis E.** Serodiagnosis of fungal diseases, *Manual of Clinical Microbiology*, 1985:924-944.
10. **Edson RS, Fernández Guerrero M, Robets GD; Van Scoy RE.** Clinical and Laboratory features of cryptococosi, a five year experience. *Min Med* 1987;70:337-342)
11. **Del Palacio A, Cuetara MS, Pontón J.** El diagnóstico de laboratorio de la aspergilosis invasora. *Rev Iberoam Micol* 2003; 20:90-98.
12. **English MP.** Nails and fungi. *Br J Dermatol* 1976; 94:697-701.
13. **Mayayo E.** diagnóstico Histopatológico de las micosis, *Revista Iberoamericana de Micología*, 2004; 21:1-9.
14. **Weinberg JM, Koestenblatt EK, Tutrone WD.** Comparación de métodos diagnósticos en onicomycosis, Sociedad iberoamericana de información científica. 2003.
15. **Rúgeles MJ, Vásquez JL, Jaramillo E et al,** Etiología y características clínicas de la onicomycosis en un grupo de pacientes inmunosuprimidos, *Infectio* 2001; vol 5-1: 7-13.
16. **Barrenetxea G.** Vulvovaginitis candidiásica, *Revista Iberoamericana de Micología* 2002; 19:22-24).
17. **Kaufman L.** Laboratory methods for the diagnosis and confirmation of systemic mycoses. *Clinical Infections disease* 1992(suppl 1) S23-S29.
18. **Rueda R.** Micosis superficiales y dermatomycosis, *Colombia Medica* 2002;33:10-16.
19. **Reilly A, Salkin I, McGinniis Met al.** Evaluation of Mycology Laboratory Proficiency Testins. *Journal of Clinical Microbiology*, 1999 p 2297-2305.
20. **Castro LA, González LA.** Micosis en el Hospital Universitario del Valle, 1980-1992. *Colombia Médica* 1995; 1995: 150-53.
21. **Barenfanger J, Lawhord J, Drake C.** Nonvalue of Culturing Cerebrospinal Fluid for fungi. *Journal of Clinical Microbiology* 2004, 236-238.

22. **Bedout C, Ayabaca J, Vega R et al.** Evaluación de la susceptibilidad de especies de *Cándida* al fluconazol por el método de difusión de disco. *Biomédica* 2003;23:31-7.
23. **Gadea I, Cuenca-Estrella M.** Recomendaciones para el diagnóstico micológico y estudios de sensibilidad a los antifúngicos. *Enferm Infecc Microbiol clin* 2004; 22(1) 32-9.
24. **Moreno JC.** Nuevos aspectos clínicos de las dermatomicosis. *Revista Iberoamericana de Micología* 1999; 16:S22-S23.
25. **Silva V, Díaz MC, Febre N.** Vigilancia de la resistencia de levaduras a antifúngicos. *Revista Chilena de Infectología* 2002; 19(Suple 2):S149-156.
26. **Hernández F, Córdova E, Manzano P et al.** Frecuencia de micosis en pacientes inmunosuprimidos de un hospital regional de la Ciudad de México. *Salud publica de Mexico/Vol 45, N°6* 2003; pg 455-460.
27. **Quindos G.L** Micosis en el amanecer del siglo XXI. *Revista Iberoamericana de Micología* 2002; 19:1-4.
28. **Cuetara M S.** Procesamiento de las muestras superficiales. *Revista Iberoamericana de Micología* 2001.
29. **Sánchez Reus F.** Procesamiento de las muestras del tracto respiratorio inferior. *Revista Iberoamericana de Micología* 2001.
30. **Peman J, Ramos P, Iglesias I.** Procesamiento de las muestras de sangre, líquidos estériles y tejidos. *Revista Iberoamericana de Micología* 2001.
31. **Garcia_Martos P, Hernández Molina JM.** Procesamiento de las muestras genitourinarias. *Revista Iberoamericana de Micología* 2001.
32. **Quindos G, Alonso Vargas R.** Procesamiento de las muestras de cavidad oral y otorrinolaringológicas. *Revista Iberoamericana de Micología* 2001.
33. **Amor E, Gutiérrez MJ, Cutuli MT.** Procesamiento de las muestras gastrointestinales. *Revista Iberoamericana de Micología* 2001.