

ARCHIVO HISTÓRICO



El presente artículo corresponde a un archivo originalmente publicado en el **Boletín de la Escuela de Medicina**, actualmente incluido en el historial de **Ars Medica Revista de ciencias médicas**. El contenido del presente artículo, no necesariamente representa la actual línea editorial. Para mayor información visitar el siguiente

vínculo: <http://www.arsmedica.cl/index.php/MED/about/submissions#authorGuidelines>



Vol. 26 No. 3, 1997 [ver índice]

LABORATORIO DE MICOLOGIA

Dra. Teresa Lobos Miranda
Profesor Adjunto (Asociado)
Depto. de Medicina Interna
Pontificia Universidad Católica de Chile

Según los tejidos comprometidos, las micosis se clasifican en:

- Superficiales, que afectan piel y fanéreos. .
- Profundas, que comprometen tejido subcutáneo, osteoarticular y visceral. Estas últimas pueden ser producidas por hongos patógenos (*Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, etcétera) o por hongos oportunistas, que son inofensivos en el huésped inmunocompetente, pero que actúan como patógenos en el inmunocomprometido.

En los últimos años se ha observado un aumento importante de micosis oportunistas debido a la expansión de la población de pacientes inmunocomprometidos. Además de las infecciones fúngicas oportunista clásicas, como candidiasis, criptococosis, aspergilosis y mucormicosis, han emergido micosis por otros hongos que hasta hace poco tiempo se consideraban simples contaminantes, como por ejemplo *Fusarium*, *Trichosporon*, *Malassezia*, etcétera. Esto ha obligado a los microbiólogos a familiarizarse con la morfología macro y microscópica de estos agentes, ya que el diagnóstico micológico es eminentemente morfológico, especialmente en hongos filamentosos.

Las técnicas básicas de Bacteriología (aislamiento, identificación morfológica y bioquímica) son, en general aplicables a las levaduras de importancia médica (géneros: *Candida*, *Cryptococcus*, *Trichosporon*, *Rhodotorula*, *Pityrosporum* y *Torulopsis*). No obstante, hay diferencias con respecto a las bacterias que es necesario destacar. El período de generación es más largo, por lo tanto debe mantenerse en incubación durante un tiempo prolongado. Los demartofitos, por ejemplo, pueden demorar hasta 4 semanas. Los hongos oportunistas, en cambio, son de desarrollo más o menos rápido, como por ejemplo *Mcorales* 24-48 horas, *Apergillus* 48-72 horas; *Cryptococcus* 48-72 horas.

El diagnóstico de laboratorio de las infecciones fúngicas requiere:.

- Presunción diagnóstica por parte de los clínicos.
- Apropiaada recolección de muestras.
- Procedimientos especiales de Laboratorio.

El estudio micológico consta de:

1. Observación directa al fresco con líquidos clarificantes (KOH 10-20%, lactofenol) para pesquisa de levaduras e hifas.
2. Cultivos de hongos en agar Sabouraud glucosado, con sin antibióticos, con y sin ciclohexamida, en que se consideran tiempo de desarrollo, características macroscópicas y

- microscópicas (hifas y esporas), estudios de fermentación (zimograma) y utilización de carbono (auxonograma).
3. Estudio histológico: biopsias con tinciones especiales, como Gomori Grocott (impregnación argéntica).
 4. Inmunodiagnóstico.
 - Detección de antígenos capsulares, de pared fúngica, etcétera; son pruebas sensibles y una buena alternativa frente a cultivos que requieren períodos de incubación prolongados.
 - Detección de anticuerpos: IgG, IgM con técnicas de inmunodifusión o con técnicas de anticuerpos marcados: ELISA e inmunofluorescencia.
 5. Técnicas de biología molecular: hibridación de ADN, PCR,, etcétera.

Las micosis que se observan con mayor frecuencia en nuestro medio son, entre las micosis superficiales, pitiriasis versicolor y dermatofitosis y, entre las profundas oportunistas, candidiasis, criptococosis, aspergilosis y mucormicosis. A continuación se revisará el diagnóstico micológico de éstas.

Pitiriasis versicolor

Se caracteriza por máculas descamativas de aspecto farináceo hiper o hipocromas, localizadas de preferencia en el tronco.

El agente etiológico es *Malassezia furfur* y el diagnóstico se hace mediante examen directo, que muestra grupo de levaduras de doble pared y filamentos cortos. Los cultivos deben efectuarse en medios con aceite vegetal para obtener la forma cultivable de *M furfur*, que es una levadura lipofílica (*Pytirosporum*).

Dermatofitosis

Son lesiones de la piel y fanéreos producidas por dermatofitos (*Trichophyton*, *Microscoporum* y *Epidermophyton*), que son hongos filamentosos, septados y ramificados que tienen gran afinidad por la queratina de la capa córnea de la piel y fánereos.

En la piel, la muestra debe ser abundante, obtenida de las zonas periféricas de la lesión que son los sitios activos, previa limpieza de la superficie cutánea para disminuir la contaminación bacteriana. Es importante suspender los tratamientos antifúngicos que pudieran estarse efectuando: locales 4-5 días, generales 2-3 semanas.

Las tiñas del cuero cabelludo, requieren la extracción de 5 o más pelos, los cuales deben ser cortados aproximadamente a 1-2 cm de la base. Además es necesario raspar las escamas de la placa micótica. Es necesario consignar en la orden antecedentes como edad, contacto con animales, tiempo de evolución de la lesión, ubicación geográfica y tratamientos previos.

El diagnóstico de laboratorio se efectúa mediante examen directo con líquidos clarificantes (KOH al 10-20% o lactofenol) que muestra filamentos septados.

Es importante la realización de cultivos, porque es el único método que permite llegar a diagnóstico del agente, lo que conlleva la detección de reservorios y duración de terapia antimicótica. Los cultivos se efectúan en medio de Sabouraud con gentamicina o cloramfenicol, que eliminan la contaminación bacteriana, y ciclohexamida, que inhibe los hongos contaminantes. La incubación debe efectuarse durante 4 semanas, ya que los dermatofitos son de lento desarrollo.

La identificación se basa en velocidad de crecimiento y en las características macroscópicas de las colonias: forma, aspecto de la superficie, textura color, producción de pigmentos difusibles, así como por las características microscópicas de hifas y esporas.

Candidiasis

Son infecciones producidas por levaduras del género *Candida*. La especie más frecuentemente aislada de muestras clínicas es *Candida albicans*; otras especies son *Candida krusei*, *C. guilliermondii*, etcétera.

La candidiasis se presenta bajo diversas formas clínicas, como digestiva, neumonías, fungemias, endocarditis. Merece consideración especial la llamada candidiasis invasiva, definida como invasión de varios órganos viscerales por diseminación hematogena, que no tiene un cuadro clínicamente característico.

Los cultivos de mucosas no son específicos, porque frecuentemente *Candida albicans* es aislada de mucosa digestiva de sujetos sanos.

Los hemocultivos tienen baja sensibilidad diagnóstica (20-30%) y muchas veces son positivos tardíamente, dificultando el manejo del paciente. Además, los pacientes inmunocompetentes con catéteres pueden presentar candidemias transitorias, sin significado patológico, lo que hace que los hemocultivos sean poco específicos para candidiasis invasiva en estas condiciones. No obstante, es necesario destacar que en pacientes neutrópenicos una candidemia se relaciona en más del 90% a candidiasis invasiva; a su vez el 50% de pacientes neutropénicos tienen hemocultivos falsos negativos.

Otro aspecto importante es el lento crecimiento de candidas en los hemocultivos convencionales, lo que determina la positividad de éstos sea reconocida tardíamente durante el curso clínico. Otras técnicas, como lisiscentrifugación, aumentan el número de aislamientos y bajan el tiempo requerido para la detección de hemocultivos positivos. Actualmente se cuenta con métodos automatizados, radiométricos y colorimétricos. No obstante, los hemocultivos de hongos estándar pueden ser perfeccionados por ventilación de los frascos, tomando precauciones para evitar su contaminación.

Para detectar candiduria como índice de compromiso hematógeno renal, en pacientes sin catéter urinario, necesario una recolección cuidadosa de una muestra de orina de segunda micción. Esto es especialmente importante en mujeres, en que puede observarse contaminación vaginal con *Candida*. Se considera positivo un recuento de mayor o igual a 10 en dos muestras sucesivas de orina. Los cultivos de catéteres deben hacerse con técnica

semicuantitativa de Maki concomitantemente con cultivo de sangre aspirada a través de catéter y cultivos de sangre periférica, en lo posible con cuantificación de levaduras. Además de los cultivos, es necesario consignar, en los exámenes directos, si hay o no filamentación de las levaduras.

Se han hecho grandes esfuerzos para mejorar el inmunodiagnóstico de Candidiasis, en especial la detección de antígenos, cuyos resultados han sido controversiales. A continuación se revisan los antígenos de Candida determinados en laboratorios asistenciales.

Antígeno manana. Es el antígeno de superficie de Candida más abundante. El método usado para su detección es aglutinación por látex, que tiene una sensibilidad entre 47 y 99%, y una especificidad de 95%, lo que significa que hay pocos pacientes que muestran antígeno manana y están sólo colonizados o con candidiasis superficial.

La sensibilidad es variable, porque en muchos pacientes la manana circula a concentraciones que van entre 1-10 ng/ml, lo cual está en el límite de detección por técnica de látex. Además, la antigenemia puede darse intermitentemente en infecciones graves, por lo que se requiere de múltiples muestras.

Antígeno proteico termolábil. Es un antígeno no bien caracterizado, probablemente una glicoproteína. Existe un test comercial disponible que emplea aglutinación de látex (Cand-Tec), que es fácil de realizar, pero requiere cuantificación, ya que títulos de 1:2 ó 1:4 podrían indicar sólo colonización, mientras que títulos iguales o mayores de 1:8 son sugerentes de candidiasis invasiva, aunque no existe una correlación absoluta entre títulos y candidiasis invasiva.

Antígeno proteico termoestable citoplásmico, Enolasa. Es producida por todas las especies de candida y es un marcador de invasión tisular profunda, detectable incluso en ausencia de candidemia. Se aconseja tomar muestras seriadas para maximizar su detección. Empleando como goldstandard hemocultivos o biopsia de tejidos profundos, la sensibilidad es de 75% y la especificidad de 96%.

Determinación de metabolitos: Se detecta arabinitol y manosa, en suero mediante técnica de cromatografía gaseosa. Es empleado sólo en laboratorios de referencia.

Determinación de anticuerpos (somáticos y metabólicos). Se ha empleado una amplia variedad de técnicas. La determinación de precipitinas anti-Candida por contraelectroforesis tiene una especificidad 85% y una sensibilidad mayor de 80% en pacientes con respuesta inmune intacta; en cambio, en pacientes inmunocomprometidos los falsos negativos varían entre 27 y 70%, lo que se debe a la incapacidad de estos pacientes para producir anticuerpos, así como a que la detección suele efectuarse demasiado precozmente (menos de 10 días de iniciada la infección), a lo cual se agrega el hecho de que generalmente no se conoce el inicio y duración de la infección. Los falsos positivos se deben a la limitada capacidad para discriminar entre colonización e invasión tisular profunda.

Estudio histológico. Es empleado en el diagnóstico de candidiasis invasiva, pero su utilidad es limitada, debido a que se necesitan métodos invasivos para recolectar muestras, que

muchas veces están contraindicados en estos pacientes debido a la gravedad de la enfermedad de base.

Criptococosis

Es una infección generalmente subaguda, cuyo agente causal es una levadura capsulada, *Cryptococcus neoformans*, que se presenta clínicamente como neumonía o, más frecuentemente, como meningoencefalitis. El diagnóstico de laboratorio se efectúa mediante estudio micológico, que comprende examen directo al fresco con tinta china, que permite visualizar las levaduras capsuladas. Además, se emplean cultivos en medio de Sabouraud sin ciclohexamida. Se observa desarrollo de levaduras a las 48-72 horas; son mucosas brillantes, ocreas y generalmente ureasa positivas. También es posible confirmar el diagnóstico mediante estudios histológicos de biopsias, con tinciones especiales de azul de toluidina, impregnación argéntica, etcétera.

Detección de antígenos. La cápsula polisacárida consiste en glucoraxilmanana y galactoxilmanana, antígenos capsulares solubles que se distribuyen ampliamente en los líquidos corporales, tales como sangre, orina y LCR. Por lo tanto, es posible establecer el diagnóstico de criptococosis por demostración del antígeno circulante, por técnica de aglutinación con partículas de látex unidas a anticuerpos específicos. El examen es muy sensible, pues detecta el 99% en LCR y 66% en el suero de los pacientes con meningitis criptocócica, aunque sólo en el 10% en el suero de pacientes con infección pulmonar. Es una de las pruebas más confiables del inmunodiagnóstico fúngico. Los falsos positivos pueden deberse a factor reumatoideo u otros factores que interfieren con la detección. No obstante, hay métodos simples que permiten eliminar esta interferencia, como tratamiento con Pronasa (Proteasa) o por inactivación por el calor, que aumenta la sensibilidad por disociación del complejo antígeno-anticuerpo. Los falsos negativos resultan ocasionalmente por efecto prozona y puede ser corregido por dilución de la muestra.

Detección de anticuerpos. Los antígenos polisacáridos son malos productores de anticuerpos, por lo que la respuesta humoral no es detectada en la mayoría de los pacientes con criptococosis.

Aspergilosis

Los hongos del género *Aspergillus*, que excepcionalmente son responsables de patología en el paciente inmunocompetente, son agentes patógenos importantes en pacientes inmunocomprometidos. Los *Aspergillus* han emergido como la segunda causa de infección oportunista por hongos, en especial en su forma invasiva.

En el aspergiloma hay una respuesta específica humoral de tipo IgG. Las técnicas de inmunodifusión son las más ampliamente usadas. La demostración de precipitinas en agarosa es útil y emplea como antígenos extractos de micelio o filtrados de cultivos; sin embargo este examen no da una información cuantitativa de la concentración de anticuerpos.

Otros métodos usados son radioinmunoanálisis y ELISA. Este último tiene alta sensibilidad, confiabilidad y ha llegado a ser ampliamente usado. Sin embargo, la sensibilidad de la técnica de ELISA depende de muchas variables, como naturaleza y tipo de antígenos y su capacidad para unirse a superficies sólidas. La complejidad de los antígenos aspergilaes usados en estas técnicas y las variaciones inherentes a las preparaciones de antígenos, determinan discrepancias de los resultados en los diferentes laboratorios.

Se ha propuesto que se podrían eliminar tanto falsos positivos como falsos negativos considerando los resultados de diferentes antígenos y métodos serológicos, aunque son procedimientos que consumen tiempo y son de difícil manejo.

En la aspergilosis pulmonar invasora hay desarrollo miceliar en el parénquima pulmonar, con o sin angioinvasión, causando bronconeumonía, neumonía lobar, necrotizante e infarto hemorrágico. En la aspergilosis diseminada hay compromiso de dos o más órganos (microabscesos miliares). Esta enfermedad implica un riesgo importante en el paciente inmunocomprometido, ya que tiene altísima letalidad. La confirmación diagnóstica es frecuentemente difícil en ausencia de cultivo de muestras respiratorias, ya que el estudio histológico de biopsia implica un procedimiento invasivo, muchas veces peligroso para estos enfermos. Todo esto conduce frecuentemente a tratamientos empíricos frecuentemente poco reglados en cuanto a posología, duración de la terapia, reniciación de la quimioterapia, etcétera.

En los últimos años la neumonía aspergilar invasiva ha aumentado en aproximadamente 400%. El diagnóstico precoz es fundamental ya que experimentalmente se ha demostrado que si se inicia terapia antifúngica después de una semana del comienzo de la infección, los resultados son deplorables, con 100% de mortalidad. En cambio, un diagnóstico precoz puede mejorar este diagnóstico.

Por estas razones, se han hecho grandes esfuerzos para mejorar el inmunodiagnóstico de aspergilosis invasora. La determinación de anticuerpos es inoperante en el comienzo de la infección y en los pacientes inmunocomprometidos, que son incapaces de producir anticuerpos. Por esto se ha considerado que la detección de antígenos es el método diagnóstico que podría ser más útil en estos pacientes.

La detección del polisacárido de pared de *Aspergillus* (galactomanana) ha demostrado ser un indicador con una especificidad de aproximadamente 85%, pero poco sensible (40%). Actualmente existe un examen comercial, por técnica de aglutinación por látex.

Mucormicosis

Son micosis generalmente profundas (forma rinocraneal) de evolución aguda y alta letalidad, producida por hongos del orden Mucorales: *Mucor*, *Rhizopus* y *Absidia*.

El diagnóstico definitivo lo da el estudio histológico de biopsias de mucosa sinusal, especialmente con tinción de Gomori-Grocott, que evidencia filamentos no septados de diámetro variable y paredes delgadas.

Los cultivos sólo entregan un diagnóstico presuntivo, ya que los mucorales son los más frecuentes contaminantes de laboratorios, por lo que tienen poca validez. El diagnóstico serológico no está disponible para uso rutinario en laboratorios asistenciales, aunque en laboratorios de referencia hay técnicas con anticuerpos fluorescentes y ELISA.

Micosis endémicas o geográficas

Algunas micosis como histoplasmosis, coccidioidomicosis, blastomicosis y paracoccidioidomicosis, ocurren en residentes en zonas endémicas y en visitantes de esas áreas. Se caracterizan por la adquisición rápida de sensibilidad cutánea a los antígenos y fúngicos solubles: histoplasmina, coccidiodina y blastomicetina, sensibilidad que persiste en el tiempo.

La intradermoreacción a los antígenos fúngicos tiene interés diagnóstico en los países templados, como el nuestro en que estas micosis prácticamente no existen. No obstante, la intradermoreacciones tienen valor discutible en las formas graves, donde frecuentemente son negativas.

Referencias escogidas

1. Reiss E, and Morrison CJ. Nonculture methods for diagnosis of disseminated candidiasis. Clin Microbiol Rev 1993;311-323.
2. Kaufman L. Laboratory methods for the diagnosis and confirmation of systemic mycoses. Clin Infect Dis 1992,14:S23-
3. Swanin RC, Meis J, Rijs A, Donnelly J. Specificity of Enzyme-linked immuno-sorbent assay for detecting Aspergillus galactomannan. J. Clin Microbiol 1997; 35:257-260.
4. Corrado J, Martino P, De Bernardis F, Cassone A. Assessment of detection of Candida mannoproteinemia as a method to differentiate central venous catheter-related candidemia from invasive disease. J Clin Microbiol 1997; 35:906-909-