Manual de Procedimientos de Micología Médica

Código
MP.GM.DDSS.ARSDT.LC.261125
Versión 01

Caja Costarricense de Seguro Social
Gerencia Médica
Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud
Área de Regulación y Sistematización al Diagnóstico y Tratamiento

2025

Elaborado por:	**Equipo de Especialistas en Micología, CCSS.** • Dra. Yósselin Morales Rodríguez. Micología, Hospital México • Dra. Andrea Ruiz Mayorga. Micología, Hospital San Juan de Dios • Dr. Cristian Mata Delgado. Micología, Hospital Nacional de Niños • Dra. Leana Quirós Rojas. Bacteriología, Hospital de Guápiles • Dra. Karla Solís Fallas, Área de Salud de Acosta	**Equipo de Especialistas en Micología, CCSS.** Dirección Desarrollo Servicios de Salud, Área Regulación y Sistematización Diagnóstico y Tratamiento, Laboratorios Clínicos.
Revisión/validación de pares expertos:	• Dra. Yenzie Robinson Mitchell • Dra. Mariel Solis Hernandez • Dr. Alejandro José Navarro Solís • Dra. Maylin Serrano Viquez, • Dr. Albert Ademar Pérez Arias • Dra. Sofía Vanessa Esquivel Montoya. • Óscar Emilio Guevara Sánchez. • Giselle Víquez Barquero.	• Dr. Adrián Fallas Mora • Dra. Evelyn González Villalobos • Dra. Daniela Jaikel Víquez • Dra. Ingrid Salas Campos • Dra. Lilliana Sandoval Carpio
Revisado por:	Dra. Angie Cervantes Rodríguez Dra. Ana Lorena Torres Rosales	Coordinación Nacional de Laboratorios Clínicos
Aprobado por:	Dr. Mario Mora Ulloa Dra. Ana Jéssica Navarro Ramírez	Jefe, Área de Regulación y Sistematización del Diagnóstico y Tratamiento Directora, Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud
Avalado por:	Dr. Alexander Sánchez Cabo	Gerente, Gerencia Médica
Fecha de revisión y aprobación:	26 de noviembre de 2025	
Próxima revisión:	26 de noviembre de 2027	
Observaciones		

Índice

Contenido

Introducción 5

Definiciones abreviaturas y símbolos 7

Referencias normativas 14

Alcance 15

Objetivo General 15

Metodología 15

Responsable del cumplimiento 16

Responsable de verificar el cumplimiento 16

Módulo 1: Técnicas básicas de micología 17

Módulo 2: Diagnóstico micológico de muestras de cabello 33

Módulo 3: Diagnóstico micológico de muestras del estrato córneo (lesiones superficiales de la piel) 58

Módulo 4: Diagnóstico micológico de infecciones de uñas 69

Módulo 5: Diagnóstico micológico de otomicosis 79

Módulo 6: Diagnóstico micológico de oculares: úlceras corneales y otros 88

Módulo 7: Diagnóstico micológico de muestras de mucosas 100

Módulo 8: Diagnóstico micológico de infecciones subcutáneas 111

Módulo 9: Diagnóstico micológico de infecciones en muestras de tejido nasal y senos paranasales 136

Módulo 10: Diagnóstico micológico de las infecciones respiratorias 157

Módulo 11: Diagnóstico micológico de infecciones del Sistema Nervioso Central . 183

Módulo 12: Diagnóstico micológico de otros fluidos estériles (Líquido peritoneal o ascítico, Líquido de diálisis peritoneal, Líquido articular o sinovial, Líquido pericárdico, Líquido pleural) 195

Módulo 13: Diagnóstico micológico de muestras de médula ósea 207

Módulo 14: Diagnóstico micológico de muestras de tracto urinario 219

Módulo 15: Diagnóstico micológico de muestras de heces..... 229

Módulo 16: Diagnóstico micológico de infecciones poco frecuentes 235

Módulo 17: Diagnóstico micológico de infecciones en sangre total (fungemia)..... 243

Anexos 257

Declaración de intereses 264

Contacto para consultas 264

Introducción

La micología médica es una rama de la microbiología, dedicada al estudio de los hongos que afectan la salud humana. Estos microorganismos, pueden convertirse en agentes patógenos capaces de causar infecciones como cuadros superficiales, enfermedades invasivas graves e inclusive otras asociadas a la producción de toxinas (micotoxicosis). En los últimos años, el incremento de condiciones como inmunosupresión, enfermedades crónicas y el uso de terapias antimicrobianas prolongadas ha favorecido el aumento de las infecciones fúngicas, destacando su importancia en el ámbito de la salud pública.

La Caja Costarricense del Seguro Social, cuenta con una red de laboratorios clínicos aptos para el manejo de muestras para el diagnóstico de estas infecciones, por lo cual se hace de suma importancia estandarizar los procedimientos para su manejo y diagnóstico basado en normas internacionales. Esto en especial, porque el diagnóstico preciso de las micosis es un desafío en la práctica clínica, ya que los síntomas suelen ser inespecíficos y las técnicas de laboratorio requieren experiencia. En este contexto, los laboratorios clínicos desempeñan un papel crucial en la identificación de los hongos patógenos y en la guía para la elección de tratamientos antifúngicos adecuados.

Tener un manual de micología médica brinda la oportunidad de que los profesionales del laboratorio tengan acceso a un recurso integral que aborde el manejo de las muestras, aislamiento del hongo, identificación y pruebas complementarias basadas en evidencia, que permita un mejor diagnóstico y abordaje clínico, garantizando así la calidad de los análisis realizados en los laboratorios de la CCSS. Gracias a esto, se puede asegurar un manejo oportuno y preciso de los pacientes, promoviendo así la optimización de recursos de la institución.

El presente manual consta de 17 módulos los cuales van a cubrir las diversas muestras que se solicitan al laboratorio clínico para procesar por hongos, tanto en áreas de salud como en hospitales periféricos, regionales, nacionales y especializados. En éste, se describen los procedimientos para el transporte, procesamiento e interpretación de los resultados de los análisis micológicos. Además, se describen los insumos básicos que un laboratorio de micología debería de tener para el análisis de las muestras.

Este manual es resultado del apoyo de la Coordinación Nacional de Laboratorios Clínicos de la Caja Costarricense del Seguro Social y fue elaborado mediante el consenso de especialistas en Micología médica de la institución, con una revisión de pares por parte de otros profesionales microbiólogos dedicados en la práctica clínica a la micología. Cuenta con el aval de las autoridades correspondientes de la CCSS y la validación de especialistas en el área de competencia.

Definiciones abreviaturas y símbolos

Absceso: acumulación de pus en espacios tisulares confinados en cualquier parte del cuerpo. Se forma por la disolución del tejido.

Aerobio: capacidad de crecer en presencia de oxígeno atmosférico.

Agar cromogénico/medio cromogénico: es un medio de cultivo sólido diferencial que contiene sustratos cromogénicos (un compuesto o sustancia que contiene un grupo formador de color), que permiten la diferenciación o selección de muchos microorganismos de importancia clínica e industrial, dando como resultado producción de color. Estos colores serán característicos de los microorganismos objetivo y permitirán una diferenciación fácil y precisa.

Anaerobio: capacidad de crecer en ausencia de oxígeno libre y atmosférico.

Antropofílico: se refiere al grupo de dermatofitos que tienen preferencia por colonizar e infectar a seres humanos.

Alopecia: pérdida parcial o total del cabello o vello en una o varias áreas del cuerpo

Antifúngico: Medicamento utilizado para tratar infecciones fúngicas. Se dividen en varias clases según su mecanismo de acción, como los azoles (inhibidores de la síntesis de ergosterol), los polienos (que alteran la membrana celular fúngica) y las equinocandinas (inhibidores de la síntesis de la pared celular fúngica).

Artefacto: cualquier estructura o elemento que aparece en una muestra biológica durante su procesamiento, que no es parte de la muestra original ni está relacionado con el organismo que se está investigando.

Balistospora: conidia que es descargada a la fuerza a partir de un conidióforo simple.

Blastospora: Organismo fúngico unicelular, generalmente de forma redonda u ovoide, con capacidad de gemar.

Cápsula: capa de mucopolisacáridos presentes en el exterior de la pared de hongos como en *Cryptococcus* spp.

Cintas de celulosa: material adhesivo formado por fibras de celulosa, utilizado en diversos campos, incluyendo la micología, para etiquetar, sellar o proteger muestras

en cultivos. Es biodegradable y tiene una amplia aplicación en el almacenamiento y manejo de muestras en laboratorio.

Clamidospora: espora asexual agrandada y redondeada que tiene paredes gruesas y contiene nutrientes almacenados en vacuolas, funcionando como una estructura de sobrevivencia. Puede ubicarse al final de la hifa (terminal) o insertarse a lo largo de la hifa (intercalar); además, puede ser individual o formar cadenas.

Conidio (conidia): un propágulo asexual que se forma en el lado o en el extremo de la hifa o conidióforo. Puede consistir en una o más células, y el tamaño, la forma y la disposición en grupos son generalmente característicos del organismo. Siempre se llevan de forma externa, es decir, no está encerrado dentro de una estructura similar a un saco como un esporangio (orden Mucorales). Los conidios pequeños, generalmente unicelulares se denominan microconidios, mientras que los macroconidios son más grandes y tienen dos o más segmentos.

Conidióforo: una estructura de neoformación, micelial caracterizada por tener un tallo en el cual se forman los conidios. La forma y disposición de los conidióforos y los conidios son características de un género. El sufijo “foro” significa llevar, así el conidióforo lleva conidias y el esporangióforo lleva esporangios.

Dematiáceo (fuliginoso, hongo negro): hongo con pigmento de tipo melánico en la pared celular.

Detritus: restos orgánicos descompuestos de materia biológica que provienen de la descomposición de organismos vivos. Pueden encontrarse como artefactos en las muestras clínicas.

Dimorfismo: se refiere a hongos que presentan dos morfologías distintas dependiendo de las condiciones de cultivo.

Distrofia: condición en la que los tejidos se desarrollan o funcionan de manera anormal debido a la falta de nutrientes, defectos genéticos o daño progresivo. Común en las onicomicosis.

Dixon (agar Dixon): agar enriquecido ácidos grasos especializado para el aislamiento y crecimiento de *Malassezia* spp**.**

Epidemiología local (microbiológica): análisis multifactorial de los agentes etiológicos aislados con su respectiva tendencia de sensibilidad a antimicrobianos (si se conoce) y es específico para cada centro de salud.

Espora: en micología médica se utiliza este término para referirse a una estructura de reproducción sexual producida por procesos meióticos como la ascospora, basidiospora y la zigospora. También se denominan esporas a las estructuras asexuales contenidas en el esporangio de los mucorales.

Examen directo: Técnica de microscopía utilizada para observar estructuras fúngicas en los especímenes clínicos o de cultivo.

Exudado: líquido que se filtra desde los vasos sanguíneos hacia los tejidos circundantes durante un proceso inflamatorio o infeccioso; contiene proteínas, células y otros componentes

Fluorescencia: fenómeno físico mediante el cual una sustancia absorbe luz de una longitud de onda específica y luego emite luz a una longitud de onda más larga. Se utiliza como una herramienta diagnóstica, ya que ciertos compuestos fúngicos pueden emitir fluorescencia cuando se exponen a luz ultravioleta (UV).

Foliculitis: inflamación de folículos pilosos

Frotis: preparación de una muestra biológica que se extiende finamente sobre una lámina de vidrio (portaobjetos) para su observación al microscopio.

Gastroenteritis: inflamación del revestimiento del estómago y los intestinos.

Gema: pequeña formación o brote que se desarrolla a partir de una célula madre en la reproducción de los hongos levaduriformes.

Geofílico: corresponde a los dermatofitos que crecen en el suelo.

Glucanas: polisacáridos formados por cadenas de moléculas de glucosa. Son componentes importantes en la pared celular de hongos, donde proporcionan estructura y rigidez.

Hifa: Término que tradicionalmente se refiere a la unidad estructural de los hongos filamentosos; consiste en una estructura tubular, cilíndrica, que contiene citoplasma y todas las organelas celulares.

Hisopo: instrumento de laboratorio alargado y fino, generalmente con un extremo de algodón, utilizado para tomar muestras, aplicar sustancias o transferir cultivos microbiológicos.

Hisopo flocado: La punta de este hisopo no es de algodón tradicional, sino que está recubierta por fibras sintéticas dispuestas de manera que crean una textura más suave y eficiente para la recolección de muestras

Inmunocromatografía: técnica de diagnóstico inmunológico que se basa en la migración de una muestra a través de una membrana de nitrocelulosa. La muestra se coloca en la zona de conjugado, el cual está formado por un anticuerpo específico contra uno de los epítopos del antígeno a detectar y un reactivo de detección. Si la muestra posee el antígeno a analizar la acumulación de complejos inmunes se evidencia en zonas específicas que posee anticuerpos de captura previamente fijados.

Levadura: tipo de hongo que se produce por gemación.

Mechero Bunsen: Es un instrumento productor de calor por combustión, utilizado en laboratorios para calentar muestras y sustancias químicas, así como generar campos estériles alrededor de la llama.

Medio de transporte: Es un medio de cultivo que es capaz de mantener la viabilidad de una muestra o una cepa, permitiendo que los microorganismos se mantengan viables en un período prolongado.

Meningitis: es la inflamación de las leptomeninges (las membranas que rodean el cerebro y la médula espinal).

Micelio: conjunto o masa de hifas (filamentos) que forma el cuerpo o talo de un hongo.

Micosis: enfermedad causada por hongos.

Microbiota: conjunto de microorganismos que habitan la piel y superficies mucosas.

Microbiota normal: conocida también como flora normal o flora nativa. Es el conjunto de microorganismos que se localizan de manera habitual en distintos sitios del cuerpo humano.

Onicomicosis: infección fúngica que afecta a las uñas, ya sea de las manos o de los pies. Es causada por hongos dermatofitos, blastosporas o mohos no dermatofitos

Parafilm: material plástico flexible y transparente, usado en laboratorios para sellar frascos, tubos y otros envases, evitando la contaminación o evaporación

Paroniquia: inflamación de los tejidos periungueales.

Paquioniquia: engrosamiento de la uña o plato ungueal.

Placa de Petri: recipiente plano y circular, generalmente de vidrio o plástico, utilizado en laboratorios para cultivar microorganismos

Polisacárido: carbohidrato complejo formado por la unión de muchos monosacáridos (azúcares simples) mediante enlaces glicosídicos. Forman parte de las paredes celulares de los hongos y están implicados en su capacidad para causar enfermedades.

Pseudohifa (pseudomicelio): cadenas de blastosporas que no tienen comunicación funcional entre sí, y que presentan una constricción en su punto de unión física.

Punción suprapúbica: introducción de una aguja estéril en la vejiga a través de la pared abdominal, con el objeto de obtener una muestra de orina mediante la aspiración con jeringa, para su análisis.

Torunda: algodón o material similar, enrollado o empacado en forma de pequeño rollo, utilizado en procedimientos médicos y de laboratorio. En micología, puede emplearse para recolectar muestras o para la aplicación de sustancias en cultivos

Sedimento: es la materia que, después de haber estado en suspensión en un líquido, termina en el fondo por su mayor gravedad, se puede obtener luego de procesos como la centrifugación.

Sistema MALDI-TOF: es un sistema de identificación microbiana basado en la espectrometría de masas MALDI-TOF (por sus siglas en inglés, Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight), que permite la identificación de microorganismos en pocos minutos hasta el nivel de especie. Este sistema determina la huella proteómica única de un microorganismo y combina patrones característicos con una extensa biblioteca de referencia para determinar la identidad del organismo. La expansión continua de la biblioteca de referencia garantiza que se pueda identificar fácilmente una amplia gama de microorganismos.

Sobrenadante: líquido que queda sobre un sedimento o precipitado, después de producido un proceso de sedimentación, como lo es la centrifugación.

Sonda Foley: tipo común de sonda permanente. Es una sonda suave de plástico o caucho que se introduce en la vejiga para vaciarla de orina.

Subungueal: que se encuentra debajo de la uña.

Vulvovaginitis: inflamación de la región genital femenina externa, vulva y vagina.

Zigospora: Estructura de reproducción sexual presente en los hongos del subphylum Mucoromycotina (antes clase Zygomicetes), del orden Mucorales.

Zoofílico: corresponde a los dermatofitos que colonizan e infectan principalmente animales

Abreviaturas:

API: índice de perfil analítico

ATS: agar tripticasa de soya

CCSS: Caja Costarricense del Seguro Social

CLSI: Clinical & Laboratory Standards Institute.

COS: agar sangre de caballo

CHO: agar chocolate

DTM: agar dermatofitos

DMSO: dimetil sulfóxido.

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético.

HNN: Hospital Nacional de Niños.

ID y PSA: Identificación y prueba de susceptibilidad a antimicrobianos.

INCIENSA: Instituto Costarricense de Investigación y Enseñanza en Nutrición y Salud.

ITU: Infección del tracto urinario.

KOH: hidróxido de potasio

LCR: líquido cefalorraquídeo.

LED: diodo emisor de luz.

MAC: complejo *Mycobacterium avium.*

MYC: agar Sabouraud con antibióticos y cicloheximida.

PCR: reacción en cadena polimerasa.

PDA: agar papa dextrosa.

SG: agar Sabouraud glucosado.

SGC: agar Sabouraud con antibióticos (gentamicina y cloranfenicol).

SNC: sistema nervioso central.

UFC: unidades formadoras de colonia.

UV: ultravioleta.

VIH: virus de la inmunodeficiencia humana.

Referencias normativas

Cuadro 1. Referencia normativa

Número	Nombre de normativa
Ley Nº 5395. 30 de octubre de 1973	Ley General de Salud
Ley Nº 5462. 24 de Diciembre de 1973	Reglamento Estatuto Servicios de Microbiología y Química Clínica
Ley Nº 8239. Marzo 2002	Derechos y Deberes de las personas usuarias de los servicios de salud públicos y privados
Ley Nº 7600. La Gaceta Nº 112 del 29 mayo 1996.	Igualdad de oportunidades para las personas con discapacidad
Ley 8279. La Gaceta, N˚ 96, Mayo 2002.	Sistema Nacional para la Calidad
Ley Nº 8292. Gaceta 169 del 04 Setiembre del 2002.	Ley General de Control Interno
Norma ISO 15189: 2007.	Laboratorios Clínicos: Requisitos particulares relativos a la calidad y la competencia
Artículo 2 sesión #8139 Junta Directiva CCSS, celebrada el 22 de marzo del 2007	Política de Calidad y Seguridad al Paciente de la CCSS
CCSS, 2006	Manual de Normas y Procedimientos Técnico-Administrativos de los Laboratorios.
CCSS, 2013	Manual de Bioseguridad Laboratorios Clínicos
CCSS, 2012	Manual de Apoyo para la Implementación de la Gestión de Calidad en los Laboratorios Clínicos
CCSS, 2002	Normas Institucionales Para La Prevención Y Control De Infecciones Intrahospitalarias
Manual IAAS - OPS, 2017	Prevención Y Control De Infecciones Asociadas A La Atención De La Salud
Manual de puestos CCSS, DAGP	Manual Descriptivo de Puestos, Febrero 2020

Alcance

Este manual está diseñado como una herramienta integral para los laboratorios clínicos que procesan muestras por hongos, el cual busca brindar recomendaciones basadas en evidencia sobre el procesamiento, transporte e interpretación de los resultados de los análisis de micología médica. Gracias a este manual, se permite la estandarización de los procesos de los laboratorios de la Caja Costarricense del Seguro Social.

Objetivo General

Proporcionar un recurso integral, estandarizado y actualizado que facilite el manejo de muestras clínicas por hongos y su diagnóstico en los laboratorios clínicos de la CCSS.

Metodología

Para el desarrollo del presente manual se consolidó un equipo de especialistas en Micología Médica en representación de áreas de salud y hospitales de la CCSS.

Se realizó un proceso de selección de temas para su revisión y desarrollo en el manual de procedimientos, basado en:

- Frecuencia de análisis solicitados.
- Capacidad de los laboratorios clínicos institucionales.
- Disponibilidad en el recurso humano.
- Tipos de muestra.

Se realizó una búsqueda de información actualizada sobre el manejo de estas muestras en el laboratorio clínico, basado en documentos, libros, revistas y guías, para estandarizar los procesos. Se adaptaron los procesos según los recursos disponibles en la CCSS.

Se tomó como base los procesos y procedimientos, que ya se realizan en la institución en los dos laboratorios dedicados exclusivamente a la micología como parte de la División de Microbiología.

Se realiza la primera redacción del “Manual de Procedimientos de Micología”, como versión inicial y se envía a una revisión de pares por especialistas en el tema y

microbiólogos dedicados al quehacer micológico. Se realizan las correcciones correspondientes.

Responsable del cumplimiento

Microbiólogo encargado y personal a su cargo designado para las diferentes tareas microbiológicas del Laboratorio Clínico.

Responsable de verificar el cumplimiento

Microbiólogo director de Laboratorio Clínico.

CONTENIDO

Módulo 1: Técnicas básicas de micología

1.1 Medios de montaje para examen directo de muestras y cultivos

1.1.1 Solución de Hidróxido de potasio (KOH)

Esta solución permite la degradación de los componentes proteicos y grasos de las células del huésped, dejando el material fúngico intacto apto para su visualización (1,2).

Esta solución básica puede prepararse a distintas concentraciones dependiendo de la consistencia del material a digerir. Para matrices delgadas como piel o cabello, puede usarse al 10 o 20 %; para uñas o tejidos gruesos (biopsias) puede usarse al 40 %.

Por lo general, estas soluciones se pueden obtener comercialmente en las distintas concentraciones. En caso contrario, se puede preparar a partir de reactivo sólido de KOH diluyendo en agua destilada, de acuerdo, a la concentración requerida (por ejemplo, 20 g del reactivo en 100 mL de agua destilada para obtener una solución al 20 %). Se puede almacenar en goteros plásticos simples a temperatura ambiente (2,3).

El procedimiento para la preparación de los exámenes directos con este reactivo es el siguiente:

1. Rotular un portaobjetos limpio con los números de identificación de la muestra.
2. Colocar una gota del reactivo a la concentración requerida en el portaobjetos
3. Agregar la muestra por analizar sobre la gota de KOH. Asegurarse de que sea suficiente cantidad de muestra.
4. Colocar un cubreobjetos limpio sobre la preparación (no presionar para evitar quebrar el vidrio) y calentar ligeramente sin permitir la ebullición ni la desecación (excepto cuando se esté procesando una muestra de cabello). Puede usarse para

estos efectos: una plancha a 70 °C, flameo levemente en la llama del mechero, tiempo prolongado en incubadora a 37 °C. El tiempo de aplicación de calor va a depender del tipo de muestra, este puede ir desde minutos hasta horas.

5. Presionar levemente la preparación para ayudar a deshacer el material humano en la muestra y la distribución del material en una capa fina, para permitir la observación de los elementos fúngicos. La preparación se encuentra correctamente digerida, por ejemplo, en muestras de uñas, cuando las células epiteliales ya no se observan íntegras.

6. Observar la preparación al microscopio de luz a bajo poder (100X o 200X) y luego alto poder (400X), con el diafragma cerrado para una mejor iluminación. Realizar la búsqueda de elementos fúngicos o fases parasitarias sugestivas de micosis.

Observaciones

- Las preparaciones deben visualizarse de 15 a 30 minutos luego de su preparación, dependiendo de la muestra y el método de calentamiento (2).
- El calentamiento suave a (35 - 37)°C ayuda a degradar las estructuras del huésped y acelerar el proceso de visualización de estructuras fúngicas (2).
- Mantener las preparaciones en cámara húmeda para evitar que se sequen si no pueden observarse prontamente. (2).
- Un método alternativo de montaje, que puede resultar en casos de muestras de uñas, es colocar la muestra previamente cortada en pedazos pequeños, en un tubo de ensayo con una gota de KOH y dejar la preparación en baño seco a 56 °C, baño maría u otra incubación con calor durante un tiempo aproximado de 15 minutos o hasta la digestión de la muestra. Posteriormente, una vez que el material de la muestra se haya destruido, realizar un montaje entre portaobjetos y cubreobjetos.

- Otro reactivo que se puede utilizar como medio de montaje es dimetilsulfóxido (DMSO) a distintas concentraciones (10 - 50 %) en combinación con el KOH para una mejor digestión de ciertos tejidos y aclarar el material. Esta preparación se puede realizar al 40 % de DMSO en agua destilada con 20 % KOH (40 mL DMSO + 20 g KOH + 60 mL agua destilada)
- Deben siempre mantenerse las indicaciones de bioseguridad que rigen los laboratorios con respecto al uso de sustancias químicas y materiales biológicos.

1.1.2 Blanco de calcoflúor

Los hongos se pueden visualizar en microscopio de luz estándar, sin embargo, es importante tomar en cuenta que las células y detritus pueden generar falsos negativos, ya que pueden enmascarar la presencia de un hongo (2).

Las muestras siempre deben ser observadas en primera instancia en microscopio de luz, para observar si las estructuras fúngicas son de aspecto hialino o fuliginoso, ya que estos últimos no se observan en tinciones fluorescentes (1,2).

Esta es una tinción que se une a los enlaces 1-3 y 1-4 de los polisacáridos de la pared del hongo, como quitina y celulosa, que al exponerse a luz UV emite fluorescencia, lo cual permite realizar exámenes directos a muestras clínicas (2).

Su principal beneficio es que permite identificar estructuras fúngicas cuando los elementos fúngicos son escasos. Además, es importante mencionar que se pueden formar artefactos en el KOH, en especial la formación de estructuras que simulan las blastosporas, por lo que las tinciones fluorescentes ayudan a confirmar estos hallazgos (1,2).

El procedimiento para la preparación de los exámenes directos con este reactivo es el siguiente:

1. Rotular un portaobjetos limpio con los números de identificación de la muestra.
2. Colocar sobre el portaobjetos una gota de blanco de calcoflúor.
3. Colocar una gota de la muestra líquida (como sedimento de lavado bronquial, por ejemplo) y mezclar con la gota del reactivo. En muestras como uñas o piel, hacer digestión previa con KOH y luego aplicar el blanco de calcoflúor.
4. Colocar un cubreobjetos limpio sobre la preparación. Si tiene exceso de reactivo fuera del cubreobjetos, puede limpiar con toalla de papel.
5. Observar a 200X y 400X en microscopio de fluorescencia, con el filtro adecuado las estructuras fúngicas fluorescen en color azul o celeste (para micología, se prefiere filtro de excitación λ 300 - 410 nm y filtro de emisión λ 500 nm) (4)

Observaciones:

- Se requiere microscopio de fluorescencia con lámpara de mercurio o luz LED y los filtros adecuados.
- Se recomienda en casos sugestivos de micosis con KOH negativo el uso de tinciones fluorescentes para evitar falsos negativos en el examen directo como la utilización de blanco de calcoflúor con microscopio de fluorescencia.
- Existen algunos hongos que presentan baja fluorescencia como *Cryptococcus* spp. y los Mucorales (1,2).
- En los casos que se usa el KOH en combinación con el blanco de calcoflúor el color de la fluorescencia de las estructuras fúngicas puede cambiar ligeramente a un tono amarillento.
- Esta tinción no es útil en infecciones por hongos fuliginosos, pues la melanina de la pared no permite la penetración del colorante. Atención en casos sospechosos de cromoblastomicosis o feohifomicosis.

1.1.3 Lactofenol azul y Lactofenol claro

Permite la visualización de características microscópicas de los hongos en cultivo. El lactofenol claro se usa para el estudio de hongos negros y el lactofenol azul para hongos hialinos, ya que este tiñe el citoplasma de los hongos (1). Ambos reactivos pueden conseguirse de forma comercial.

El procedimiento para la preparación de los exámenes directos con este reactivo es el siguiente:

1. Rotular un portaobjetos limpio con los números de identificación de la muestra.
2. Colocar una gota de reactivo en un portaobjetos limpio y luego colocar una porción de la colonia de hongo de cualquiera de las siguientes maneras:
    a. Si es un hongo micelial, con un trozo doblado en forma de bucle de cinta transparente, tocar la superficie de la colonia suavemente y colocar la cinta con el hongo sobre la gota de azul de lactofenol o lactofenol claro sin dejar burbujas
    b. Si es un micelial, con el asa micológica tomar suavemente la colonia del hongo y colocarlo sobre el lactofenol y poner el cubreobjetos.
    c. Si es un hongo levaduriforme, con el asa bacteriológica tomar suavemente una porción de la colonia y colocarlo sobre el lactofenol y poner el cubreobjetos.
3. Observar la preparación al microscopio de luz a bajo poder (100X o 200X) y luego alto poder (400X). Realizar la búsqueda de estructuras para la identificación del agente fúngico correspondiente.

Observaciones:

- Las preparaciones con azul de lactofenol pueden calentarse ligeramente para que penetre mejor el colorante en las estructuras fúngicas (3).
- La idea de usar cinta adhesiva es mantener la estructura morfológica microscópica del hongo (micelio y estructuras de reproducción) para realizar la identificación. Por

eso se debe procurar tomar una parte de la colonia que incluya tanto micelio como esporas.

- Las técnicas son sencillas, pero requieren destreza manual. Se debe realizar la cantidad de preparaciones necesarias para alcanzar el objetivo de observar adecuadamente las estructuras de esporulación. En hongos levaduriformes la técnica de montaje resulta más fácil que en miceliales.
- Estas preparaciones tienen la ventaja que pueden guardarse para posterior material de referencia en el laboratorio, ya que el fenol inactiva el hongo, el azul de algodón tiñe el citoplasma y la glicerina evita la desecación. En ese caso deben hacerse los montajes entre portaobjetos y cubreobjetos, por la orilla del cubreobjetos realizar un sellante siliconado (por ejemplo, el esmalte para uñas transparente) dejar secar y guardar en una caja de almacenaje para estos efectos. (3).

1.2 Tinciones

1.2.1 Tinción Ziehl-Neelsen

La tinción de Ziehl-Neelsen es un método útil para la observación de actinomicetes como *Nocardia* sp., tanto para granos como cultivos, ya que presenta resistencia parcial a la decoloración con ácido. En el caso de *Actinomyces* sp. no es resistente al ácido (1,4).

El procedimiento para realizar la tinción de Ziehl-Neelsen es el siguiente:

1. Realizar un extendido y fijar con metanol de 5 a 10 minutos.
2. Cubrir 5 minutos con fucsina fenicada y calentar la preparación con el mechero sin hervir, hasta producir vapores sin llevar a la desecación.
3. Lavar con agua.
4. Realizar una decoloración con alcohol ácido durante 1 minuto.
5. Lavar con agua.
6. Cubrir con azul de metileno 1 minuto.
7. Lavar con agua

8. Dejar secar y observar en el microscopio con aceite de inmersión a 1000X.
9. Al microscopio de luz pueden ver bacterias filamentosas ramificadas parcialmente alcohol-ácido resistentes teñidas de color fucsia indicativas de *Nocardia* sp. O bacterias filamentosas no ácido resistentes que se tiñen de color azul y corresponden a *Actinomyces* sp., aunque en ocasiones *Nocardia* sp puede teñirse muy débilmente en color azul.

1.2.2 Tinción de Kinyoun

Esta es una variante de la tinción de Ziehl-Neelsen que permite la coloración en frío de la fucsina, sin necesidad de calor. Como colorante de contraste se utiliza verde brillante o azul de metileno (1).

El procedimiento para la tinción de Kinyoun es el siguiente:

1. Realizar un extendido y fijar con metanol de 5 a 10 minutos.
2. Cubrir 5 minutos con fucsina de Kinyoun.
3. Lavar con agua.
4. Realizar decoloración con alcohol ácido durante 1 minuto.
5. Lavar con agua.
6. Cubrir con colorante de contraste durante 1 minuto.
7. Lavar con agua.
8. Dejar secar y observar en el microscopio con aceite de inmersión a 1000X.
9. Al microscopio de luz pueden ver bacterias filamentosas ramificadas parcialmente alcohol-ácido resistentes teñidas de color fucsia indicativas de *Nocardia* ssp. O bacterias filamentosas no ácido resistentes que se tiñen de color azul y corresponden a *Actinomyces* sp., aunque en ocasiones *Nocardia* sp. puede teñirse muy débilmente en color azul.

1.2.3 Tinción de Gram

Esta es una tinción que se utiliza comúnmente en bacteriología para poder clasificar las bacterias en Gram negativas y Gram positivas. A pesar de que esta tinción no es tan útil ya que muchos hongos varían su coloración, esta funciona para poder determinar la presencia de un agente fúngico en una muestra (1,2).

El procedimiento para la tinción de Gram es el siguiente:

1. Realizar el extendido y fijar con metanol de 5 a 10 minutos.
2. Cubrir 1 minuto con cristal violeta.
3. Lavar la lámina con agua.
4. Cubrir 2 minutos con lugol.
5. Lavar la lámina con agua.
6. Decolorar con alcohol acetona.
7. Lavar la lámina con agua.
8. Cubrir la lámina con safranina durante 2 minutos.
9. Dejar secar y observar en el microscopio con aceite de inmersión a 1000X.

1.2.4 Tinción de Giemsa

Esta es una tinción que se utiliza para la demostración de hongos a partir de muestras clínicas. Se utiliza la solución de Giemsa que contiene Azur II-Eosina y Azur II. La pared de los hongos no se tiñe con esta tinción, lo que se observa es un halo claro alrededor, que resulta útil para la búsqueda de hongos intracelulares (1).

El procedimiento para la tinción de Giemsa es el siguiente:

1. Preparar el frotis y fijar con metanol de 5 a 10 minutos.
2. Secar al aire el frotis.
3. Preparar el colorante de Giemsa 1:10 con buffer o agua tamponada al 7 de pH, utilizar la solución en los 15 minutos siguientes a su preparación.
4. Teñir durante 20 minutos cubriendo por completo el portaobjetos.

5. Lavar con agua.
6. Dejar secar la preparación y observar en el microscopio con aceite de inmersión a 1000X.

Observaciones:

- Se recomienda limpiar las láminas antes de realizar el frotis (1).
- Se debe de realizar tinción una vez que el frotis esté completamente seco al aire, en esta tinción se prefiere no calentar la preparación para evitar la lisis de las células (1).

1.2.5 Tinta China

La tinta china permite realizar una tinción negativa que funciona para evidenciar la presencia de elementos fúngicos como la cápsula, útil principalmente en la identificación de *Cryptococcus* spp. Esto ocurre debido a que los mucopolisacáridos que componen esta cápsula dispersan las partículas de la tinta china y entonces se observa un halo claro alrededor del microorganismo. Su observación se puede realizar en muestras clínicas tales como sedimento de LCR, biopsias, muestras respiratorias, pus y otros fluidos biológicos (1,2). La tinta china se puede comprar comercialmente, en presentación de grado laboratorio e incluso puede adquirirse tinta negra de papelería.

El procedimiento para realizar el montaje de la tinta china es el siguiente:

1. Los LCR al ser muestras líquidas que no siempre presentan abundancia de microorganismos, deben concentrarse y trabajar a partir del sedimento (3000 rpm por 15 minutos).
2. Colocar una gota del sedimento sobre el portaobjetos limpio.
3. Agregar una gota de tinta china.
4. Colocar un cubreobjetos.

5. Observar al microscopio de luz. Ajustar el diafragma para la iluminación adecuada de la muestra.

6. Para la determinación de cápsula a partir de cultivo puro, se recomienda tomar una asada del cultivo, utilizar agua destilada para hacer una suspensión y mezclar con una gota de tinta china sobre el portaobjeto. Realizar la observación.

Observaciones:

- Se debe tener especial cuidado en el uso de esta técnica, ya que algunos leucocitos presentan halos alrededor que se pueden confundir con la cápsula del hongo (1,2).
- Las láminas en tinta china deben descartarse en recipiente de bioseguridad porque la preparación no se encuentra inactivada (1,2).
- Falsos negativos pueden ocurrir si la cantidad de tinta china que se coloca es mucha, y se dejan zonas muy densas donde no se permite el paso de luz (1,2).
- Falsos negativos pueden ocurrir en presencia de blastosporas de *Cryptococcus* spp. con poca cápsula o del todo con cepas no encapsuladas.
- Es importante tener controles positivos y negativos, *Candida albicans* como control negativo y *Cryptococcus neoformans* como control positivo, por ejemplo. Sobretodo para personal en fase de entrenamiento (1,2).

1.2.6 Tinción de Weber

Esta tinción permite la observación de las esporas de microsporidios, ya que favorece un buen contraste con blastosporas y otros elementos que se pueden encontrar en las heces. Las esporas de los microsporidios se tiñen de color rojo violeta y en algunas es posible observar la zona vacuolar. La visualización es más fácil cuando se encuentran grupos de esporas (1,2).

El procedimiento para la tinción de Weber es el siguiente:

1. Realizar un extendido delgado del material en un portaobjetos limpio.
2. Fijar las extensiones con metanol por 5 minutos.
3. Teñir durante 90 minutos con la tinción de Weber.

4. Lavar las láminas en alcohol ácido durante 10 segundos.
5. Pasar las preparaciones por alcohol de 95°, brevemente.
6. Pasar las preparaciones sucesivamente en alcohol de 95° por 5 minutos, alcohol de 100° por 10 minutos y xilol por 10 minutos.
7. Revisar al microscopio bajo inmersión a 1000X.
8. Reportar número de esporas por campo de 1000X.

Observaciones:

- Las esporas son de difícil observación y requieren experiencia de parte del microscopista. Son de un tamaño entre los (1-4) µm (4).
- El reporte puede realizarse en número de esporas en 100 campos de 1000X o en cruces.
- Aunque esta es la tinción estándar para Microsporidios, es más sensible y práctica una preparación con blanco de calcoflúor, por lo que se sugiere su uso de preferencia. (descrito en el capítulo 15).

1.3 Otras técnicas para identificación de hongos

1.3.1 Cultivo en lámina

Este permite la preservación de estructuras reproductoras de los hongos, las cuales son muy frágiles y pueden perder su estructura con técnicas de montaje convencionales. Esta técnica preserva la disposición de los conidióforos, esporangióforos, esporas, características de crecimiento y ramificaciones. Si bien las técnicas de microcultivo son variadas y pueden tener muchas modificaciones, a continuación, se describe una técnica básica y útil en el trabajo rutinario en micología.

Insumos:

- Placas de Petri estériles.
- Triángulo de vidrio estéril o palitos de madera estéril.
- Portaobjetos estéril.
- Placas de Petri con medio de Sabouraud glucosado, agar papa dextrosa o agar avena.
- Cubreobjetos estériles.
- Tubos con 8 mL de agua destilada estéril.
- Lactofenol azul y lactofenol claro.
- Bisturí y pinzas estériles.

Procedimiento de inoculación

1. Preparar una placa de Petri estéril con un triángulo de vidrio estéril o palitos de madera esterilizados, sobre los que se colocará un portaobjetos también estéril.
2. Cortar con un bisturí esterilizado a la llama, cuadrados de 1 cm de lado del medio de elección.
3. Pasar con el mismo bisturí, dos de estos cuadros de agar al portaobjetos que se encuentra sobre el triángulo de vidrio, colocarlos a cada extremo.
4. De las cepas a estudiar, obtener inóculos pequeños con asa micológica estéril y colocarlos en el borde superior de cada lado del cuadrado de agar.
5. Cubrir cada cuadro de agar inoculado con un cubreobjetos estéril utilizando la pinza esterilizada previamente, haciendo una presión sobre el cubreobjetos para que se adhiera al medio de cultivo.
6. Colocar 8 mL de agua destilada estéril a la placa de Petri, esto para promover humedad.
7. Incubar a temperatura ambiente según sea necesario.

Procedimiento de lectura

1. Tras el periodo de incubación, tomar con una pinza estéril el cubreobjetos y colocarlo con el crecimiento hacia arriba sobre una superficie (por ejemplo, la tapa de caja de Petri).
2. Colocar una gota de lactofenol ya sea azul o claro en un portaobjetos, y colocar el portaobjetos sobre el cubreobjetos con suavidad, para evitar la destrucción de las estructuras.

1.3.2 Producción de tubo germinativo

La producción de tubo germinativo es una prueba utilizada para la identificación de especies de *C. albicans.* Se utiliza una suspensión de levaduras a partir de un cultivo puro de una colonia micelio-levadurifome (3).

Insumos:

- Tubos de ensayo estériles
- Plasma o suero humano
- Asa bacteriológica
- Incubadora a 37 °C
- Microscopio de luz
- Portaobjetos estériles
- Cubreobjetos estériles

Procedimiento

1. Realizar una suspensión de blastosporas tomadas de la parte superior de la colonia en 1 mL de plasma o suero humano, en un tubo de ensayo estéril.
2. Incubar tres horas exactas a 37 °C.
3. Tras la incubación, montar una porción entre portaobjetos y cubreobjetos y revisar al microscopio 400X la producción de tubos germinativos.

4. El tubo germinativo es un promicelio que se forma antes de cuatro horas a 37 ºC y que dará inicio a micelio verdadero, el cual no presenta una constricción en el punto de unión con la célula madre. Con respecto al pseudomicelio, éste se distingue por la presencia de constricciones que se observan tanto en el punto de unión con la célula madre como a nivel de los septos.

Observaciones:

- Por ningún motivo la incubación puede exceder las 3 horas ni tampoco ser por menos tiempo.
- Esta prueba es positiva para las especies *C. albicans* y *Candida dubliniensis.* Debe realizarse la identificación hasta especie, debido a la resistencia a fluconazol de *C. dubliniensis.*
- Si esta prueba es negativa, se debe identificar la levadura utilizando pruebas bioquímicas disponibles según el centro de salud.

1.4 Preparación de medios de cultivo

El agar papa y el agar avena son medios que promueven la inducción de la esporulación de los hongos, lo cual es necesario para su identificación (1). No se recomienda su uso para aislamiento primario (2). Recordar que al preparar los medios de cultivo de forma casera se debe realizar control de calidad de esterilidad y control de calidad de crecimiento, y evaluar las características esperadas para el medio de cultivo elaborado. Sin embargo, ambos medios se encuentran actualmente de manera comercial, por lo que se prefiere la compra ya que se encuentran debidamente estandarizados y controlados.

1.4.1 Agar papa dextrosa

Fórmula

- Papas 200 g.
- Agar 15 g.
- Glucosa 20 g.

- Agua destilada 1 L.
- pH final 5.4 - 5.8.

Preparación

1. Lavar, pelar y cortar en tiras delgadas 200 g de papas.
2. Colocar en un beaker con 500 mL de agua destilada.
3. Calentar de 70 a 80 °C durante 30 minutos.
4. Llevar a ebullición por 5 minutos.
5. Filtrar a través de una gasa.
6. Agregar el agar y la glucosa.
7. Ajustar volumen a 1 L con agua.
8. Calentar hasta ebullición.
9. Autoclavar a 121 °C por 15 minutos.
10. Preparar las placas o tubos y refrigerar de (4 - 8) °C hasta su uso.

Observación: si se cuenta con medio comercial seguir con las instrucciones del fabricante.

1.4.2 Agar avena

Fórmula

- Avena en polvo 60 g.
- Agar 12.5 g.
- Agua destilada 1 L.
- pH final 5.8-6.2.

Preparación

1. Mezclar la avena y el agar con el agua destilada.
2. Llevar a ebullición hasta que se disuelva.
3. Agitar el medio para obtener una suspensión uniforme.

4. Autoclavar a 121 °C por 15 minutos.
5. Preparar las placas o tubos y refrigerar de (4 - 8) °C hasta su uso.

NOTA: se incluye en el presente manual la preparación de estos medios de cultivo, pues no son de fácil acceso comercialmente y su consumo es bajo. Además son de gran utilidad para la identificación de hongos miceliales, por lo que contar con estos medios es fundamental. Otros medios de cultivo utilizados en micología (SDA, SGC, MYC) generalmente son adquiridos por compras a nivel local y se pueden adquirir preparados y listos para el uso o en polvo de manera comercial. En este último caso, la preparación depende de las indicaciones del fabricante.

REFERENCIAS

1. Bonifaz A. Micología Médica Básica. 6ta ed. Ciudad de México: McGraw-Hill interamericana editores; 2020.
2. Wengenack NL. CLSI M54 Principles and Procedures for Detection and Culture of Fungi in Clinical Specimens. 2da ed. Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI); 2021.
3. Gross N, Salas Campos I. Métodos diagnósticos en Micología Médica. 1ra ed. 2da reimpresión. San José, Costa Rica: Editorial UCR; 2015.
4. Leber AL (Ed.). Clinical Microbiology Procedures Handbook. 4ta ed. Washington, D.C.: American Society for Microbiology (ASM); 2024.

Módulo 2: Diagnóstico micológico de muestras de cabello

I. PIEDRA BLANCA

FASE PREANALÍTICA

Solicitud de análisis: Cuadros clínicos asociados

Micosis cosmopolita poco frecuente, es una infección crónica y asintomática, que afecta el pelo a nivel del tallo, en forma de nódulos blandos de aproximadamente 0.5 mm. Se pueden observar blancos, amarillentos, beige o verdosos, dada por hongos del género *Trichosporon* spp. Especialmente afecta el pelo del cuero cabelludo y, en menor proporción vello de: barba, bigote, axilas y pubis, y rara vez cejas y pestañas. Al contacto dan sensación de rugosidad y pueden desprenderse con facilidad (1). Estos nódulos no constituyen un motivo de consulta, pues por lo general no causan molestia y en muchos casos se encuentran durante la exploración médica por otras causas. Los nódulos pueden ser discretos o, con mayor frecuencia, unirse y formar una vaina transparente irregular. La infección se presenta esporádicamente en América del Norte y Europa y, con mayor frecuencia, en América del Sur, África y partes de Asia (2,3).

Diagnóstico diferencial

Pediculosis capitis y pubis (liendres), tricomicosis axilar, variedad flava, tricorrexis nodosa, moniletrix. (1).

Muestras clínicas, transporte y conservación

Tabla Resumen. Información requerida para el procesamiento	
Datos del paciente	-Nombre completo, número de identificación, sexo y fecha de nacimiento. -Posible diagnóstico o cuadro clínico. -Fecha de inicio de síntomas. -Terapia recibida. -Lugar de procedencia.
Datos de la muestra	-Fecha y hora de la toma de muestra. -Técnica de obtención de la muestra. -Sitio de la toma de muestra. -Tipo de muestra. -Servicio que envía la muestra. -Responsable de la toma de muestra.
Muestras clínicas indicadas	
-Hebras de cabello o vello que tiene los nódulos.	
Criterios de rechazo	
-Muestras que su rotulación sea inadecuada o no coincida con los datos de la orden médica. -Paciente que haya consumido antifúngico en los últimos 15 días. -Muestras que no estén rotuladas. -Paciente que esté tomando tratamiento antifúngico. -Paciente que se haya colocado antifúngicos tópicos.	
Observaciones	
-En aquellos casos donde el paciente no cumpla con las condiciones preanalíticas para la toma de muestra se debe de reprogramar la cita para una fecha en la cual se cumplan los criterios de toma de muestra (15 días sin tratamiento). -Siempre que sea posible, para aumentar la probabilidad de recuperación de un organismo fúngico, la muestra debe recolectarse antes de administrar un agente antimicótico.	
Recipiente indicado para la recolección	
-Placa de Petri estéril.	
Condiciones de transporte	
-Las muestras deben transportarse inmediatamente al Laboratorio Clínico en el contenedor en el cual se recolectó, a temperatura ambiente donde se permita mantenerla en condiciones adecuadas de humedad. -La muestra no debe ser refrigerada ni congelada.	

FASE ANALÍTICA

Consideraciones generales de procesamiento muestras de pelo

Es importante trabajar las muestras en un ambiente aséptico para evitar la contaminación con hongos ambientales. Se recomienda el procesamiento en cámara de flujo laminar o con mechero, de ser posible utilizar cubrebocas y no hablar encima de las muestras para no contaminarlas.

Equipos e insumos requeridos

Cuadro 2.1 Equipos e insumos requeridos para realizar análisis de Piedra blanca		
Activos base	**Analizadores base**	**Activos adicionales**
Incubadora a 30 °C (o caja en un cuarto a temperatura ambiente en su defecto)	Microscopio de luz, con objetivos de 10X o 20X, 40X y 100X Sistema automatizado para ID.	Cámara de bioseguridad Sistema MALDI-TOF[1]
Medios de cultivo	**Insumos**	**Pruebas complementarias**
Agar Sabouraud glucosado (SDA) Agar Sabouraud con antibióticos[2] (SGC) Agar Sabouraud con antibióticos y cicloheximida (MYC)	Portaobjetos Cubreobjetos KOH 10 - 20 % Mechero Bunsen o Lámpara de alcohol[3] Pinza estéril Tijera estéril Bisturí Hojas de bisturí Placas de Petri estériles Azul de Lactofenol Asa bacteriológica	Luz de Wood[1]

1. Según la disponibilidad en el centro de salud.
2. Se recomienda la utilización de este medio sobre el SDA ya que evita el crecimiento de bacterias que pueden afectar la recuperación del hongo, esto aplica a zonas no estériles.
3. Si no cuenta con cámara de bioseguridad, puede utilizar un mechero Bunsen o una lámpara de alcohol.

Recolección de la muestra para diagnóstico micológico

1. Llamar al paciente por nombre y apellidos al lugar asignado para la toma de muestra, verificar con este que los datos personales correspondan.

2. Preguntar al paciente sobre: fecha de aparición del cuadro, aplicación de tratamientos, exámenes previos, cuadros similares en la familia y cualquier otra información que se considere relevante para poder realizar el diagnóstico.

3. Revisar las lesiones bajo la luz de Wood (si se cuenta con esta herramienta, si no pasar al punto 4), ésta dará fluorescencia de color blanco amarillento o amarillo

verdoso en aquellos pelos afectados. Puede ser que la luz de Wood no emita fluorescencia, aun así se debe tomar la muestra.

4. Cortar de 15 a 20 cabellos o vellos con nódulos adheridos de aproximadamente 1 cm de longitud con un bisturí o tijeras estériles.

5. Guardar el material recolectado en una placa de Petri o recipiente estéril a temperatura ambiente, para su posterior procesamiento. Si la muestra se almacena a temperatura ambiente, son estables hasta una semana.

Procesamiento de la muestra para diagnóstico microbiológico

Examen directo

KOH

En este caso el examen directo es de valor diagnóstico.

1. Poner sobre el portaobjetos una gota de KOH 10 a 20 %
2. Colocar varios de los cabellos o vellos con nódulos sobre la gota. Usar pinzas estériles.
3. Colocar un cubreobjetos.
4. Examinar la muestra pasados 15 a 30 minutos luego del montaje, dependiendo de la cantidad de muestra colocada. No dejar secar la preparación. El montaje se puede dejar hasta 24 horas para revisar y poder emitir un resultado, si el material no se ha digerido por completo. Puede utilizarse en ese caso una cámara húmeda para evitar que se seque la preparación.
5. Observar al microscopio de luz primero en bajo aumento (100X o 200X) y luego con alto aumento (400X). Se pueden obtener los siguientes resultados:

Cuadro 2.2 Resultados que se pueden obtener al visualizar KOH	
Estructura observada KOH	**Cuadro clínico asociado (Esperar al resultado del cultivo para confirmar diagnóstico)**
Se observa un nódulo formado por micelio artroblastosporado hialino. (4)	Piedra blanca

Nota: En las muestras de pelo, son las únicas en las que el examen directo con KOH **no se calienta**. Ya que esto destruye la hebra de pelo y no permite la observación de ubicación de las estructuras fúngicas en la hebra.

Cultivo de las muestras:

Inoculación

1. Dejar que el medio alcance la temperatura ambiente, secar para eliminar el exceso de humedad de la superficie previo a la inoculación de las muestras.
2. Rotular las placas en la base (y no en la tapa) con el número asignado a esa muestra.
3. Colocar los cabellos previamente recolectados en la parte central del medio de cultivo alejados uno del otro, utilizar pinzas estériles.
4. Sellar las placas con cinta permeable de celulosa o Parafilm (una sola vuelta alrededor de la placa es suficiente) para evitar la desecación del agar o una infestación de ácaros.
5. Incubar de 25 a 30 °C en un ambiente aerobio durante 4 semanas.

Tiempo de incubación

Las placas se deben incubar por cuatro semanas (5).

Lectura de placas

Cuadro 2.3 Tiempos de lectura de placas de cultivo por hongos	
Lectura (5)	**Observaciones**
● Dos veces a la semana la primera semana ● Una vez por semana durante 4 semanas	Para que un aislamiento sea considerado de importancia debe mostrar crecimiento sobre el sitio de inoculación en el agar. *Trichosporon* sp., crecerá dentro de los primeros 7 días, sin embargo, por la posible existencia de otros hongos (dermatofitos), se puede prolongar el tiempo de incubación.

FASE POSTANALÍTICA

Interpretación del cultivo

Es importante determinar qué es lo que está crecimiento en la placa, diferenciar entre contaminantes y patógenos. Es importante tomar en cuenta la clínica del paciente y el resultado del examen directo al momento de analizar los cultivos.

Para la identificación morfológica de los hongos se deben de buscar las características tanto macroscópicas como microscópicas del hongo.

- Para la identificación de la especie de *Trichosporon* se debe de hacer uso del sistema automatizado para ID disponible en el centro de salud.

Características macroscópicas

Tomar en consideración:

1. Producción de pigmento en la placa.
2. Color de la colonia.
3. Aspecto de la colonia (algodonosa, pulverulenta, harinosa, entre otros).
4. Tiempo de incubación.

En este caso se espera el crecimiento de una colonia de aspecto levaduriforme cremosa, húmeda, con pliegues arrugados hacia la periferia. Al reverso de color blanco o crema. *Trichosporon* spp. suele ser sensible a la cicloheximida, por lo que su crecimiento en MYC es limitado (6).

Características microscópicas

Una vez que se tenga una colonia sospechosa realizar el montaje en azul de lactofenol para proceder a la identificación microscópica.

Se puede realizar el montaje utilizando cinta adhesiva o con el asa bacteriológica entre porta y cubreobjetos, intentando no alterar las estructuras fúngicas, para poder visualizar las características microscópicas.

En estos casos se espera observar micelio artroblastosporado hialino (6).

En los casos de piedra blanca el cultivo posee un valor confirmatorio. El crecimiento es rápido de 4 a 7 días (4).

Cuadro 2.4 Principales microorganismos aislados que producen Piedra blanca

Grupo	Microorganismo
Trichosporon spp.	*Trichosporon ovoides, Trichosporon asteroides y Trichosporon cutaneum* (piedra blanca del cuero cabelludo) (2). *Trichosporon inkin* (piedra blanca púbica) (2) *Trichosporon asahii.* *La diferenciación de especie se hace con base en pruebas bioquímicas, pero es limitada. *Si se realiza identificación por métodos bioquímicos y la especie es diferente de *T. asahii*, requiere confirmación por espectrometría de masas. Enviar al centro correspondiente de la red de laboratorios de la CCSS.

Reporte de resultados

Reporte de examen directo

1. El examen directo se debe reportar según las características observadas:
    a. **"Se observa nódulo formado por micelio artroblastosporado hialino."**

2. Si no se observa el nódulo formado por micelio artroblastosporado hialino ni ningún otro elemento fúngico, reportar:
    a. **"No se observan estructuras fúngicas."**

Reporte de cultivo

1. Si el cultivo está negativo y el examen directo está negativo, reportar:
    . "**Cultivo negativo por hongos".**
2. Si se logra aislar el agente causal e identificarlo, reportar:
    . **"Cultivo positivo por (género y especie) o sólo género".**
3. Si el cultivo está negativo y el examen directo está positivo, reportar:

. **“No se obtuvo crecimiento del agente causal”.**

4. Si se observa crecimiento de 1 o más microorganismos que se consideran que no son de importancia clínica, reportar:

. **“Cultivo negativo por hongos”.**

II. PIEDRA NEGRA

FASE PREANALÍTICA

Solicitud de análisis: Cuadros clínicos asociados

Este estudio se realiza cuando el paciente consulta porque al cepillarse el cabello tiene una sensación de dureza (1), y se observa en el cabello nódulos discretos, duros, arenosos, de color pardo a negro a lo largo de la hebra, dando un aspecto de “arenitas” o pequeñas piedras. Los nódulos pueden ser únicos o múltiples con intervalos de pelo sano. La enfermedad suele cursar de forma asintomática y se puede presentar en pelos de piel cabelluda, con menos frecuencia en la barba o el bigote y de manera esporádica en vellos axilares y púbicos (2,3).

Se encuentra principalmente en regiones tropicales de África, Asia y América, con climas tropicales y subtropicales con lluvias abundantes. En seres humanos el agente etiológico es *Piedraia hortae*, un ascomiceto (orden Dothideales) que forma un ascostroma que alberga las ascas y las ascosporas (2,5).

Diagnóstico diferencial

Tricomicosis axilar variedad negra, tricorrexis nodosa, moniletrix y pediculosis (1).

Muestras clínicas, transporte y conservación

Tabla Resumen. Información requerida para el procesamiento	
Datos del paciente	-Nombre completo, número de identificación, sexo y fecha de nacimiento. -Posible diagnóstico o cuadro clínico. -Fecha de inicio de síntomas. -Terapia recibida. -Lugar de procedencia.
Datos de la muestra	-Fecha y hora de la toma de muestra. -Técnica de obtención de la muestra. -Tipo de muestra. -Sitio de la toma de muestra. -Servicio que envía la muestra. -Responsable de la toma de muestra.
Muestras clínicas indicadas	
-Hebras de cabello o vellos que tienen nódulos.	
Criterios de rechazo	
-Muestras que no estén rotuladas. -Muestras que su rotulación incorrecta o no coincida con los datos de la orden médica. -Paciente que haya consumido tratamiento antifúngico en los últimos 15 días. -Paciente que esté tomando tratamiento antifúngico. -Paciente que se haya colocado antifúngicos tópicos.	
Observaciones	
-En aquellos casos donde el paciente no cumpla con las condiciones preanalíticas para la toma de muestra se debe de reprogramar la cita para una fecha en la cual se cumplan los criterios de toma de muestra (15 días sin tratamiento). -Siempre que sea posible, para aumentar la probabilidad de recuperación de un organismo fúngico, la muestra debe recolectarse antes de administrar un agente antimicótico.	
Recipiente indicado para la recolección	
-Placa de Petri estéril.	
Condiciones de transporte	
-Las muestras deben transportarse inmediatamente al Laboratorio Clínico en el contenedor en el cual se recolectó, a temperatura ambiente donde se permita mantenerla en condiciones adecuadas de humedad. -La muestra no debe ser refrigerada ni congelada.	

FASE ANALÍTICA

Consideraciones generales de procesamiento muestras de pelo

Es importante trabajar las muestras en un ambiente aséptico para evitar la contaminación con hongos ambientales. Se recomienda el procesamiento en cámara de flujo laminar o con mechero, de ser posible utilizar cubrebocas y no hablar encima de las muestras para no contaminarlas.

Equipos e insumos requeridos

Cuadro 2.5 Equipos e insumos requeridos para realizar análisis de Piedra negra

Activos base	Analizadores base	Activos adicionales
Incubadora a 30 °C (o caja en un cuarto a temperatura ambiente en su defecto)	Microscopio de luz, con objetivos de 10X o 20X, 40X y 100X	Cámara de bioseguridad Sistema MALDI-TOF[1]
Medios de cultivo	**Insumos**	**Pruebas complementarias**
Agar Sabouraud glucosado (SDA) Agar Sabouraud con antibiótico[2] (SGC) Agar Sabouraud con antibióticos y cicloheximida (MYC)	Portaobjetos Cubreobjetos KOH 10 a 20 % Mechero Bunsen, Lámpara de alcohol[3] Pinza estéril Tijera estéril Bisturí Hojas de bisturí Placas de Petri estériles Lactofenol claro Asa micológica	Luz de Wood

1. Según la disponibilidad en el centro de salud.
2. Se recomienda la utilización de este medio sobre el SDA ya que evita el crecimiento de bacterias que pueden afectar la recuperación del hongo, esto aplica a zonas no estériles.
3. Si no cuenta con cámara de bioseguridad, puede utilizar un mechero bunsen o una lámpara de alcohol para reducir la contaminación ambiental.

Recolección de la muestra para diagnóstico micológico

1. Llamar al paciente por nombre y apellidos al lugar asignado para la toma de muestra, verificar con este que los datos personales correspondan.
2. Preguntar al paciente sobre: fecha de aparición del cuadro, aplicación de tratamientos, exámenes previos, cuadros similares en la familia y cualquier otra información que se considere relevante para poder realizar el diagnóstico.
3. Cortar de 15 a 20 cabellos y/o vellos con nódulos adheridos de aproximadamente 1 cm de longitud con un bisturí o tijeras estériles.
4. Guardar en una placa de Petri o recipiente estéril a temperatura ambiente todo el material recolectado, para su posterior procesamiento. Si se almacenan a temperatura ambiente, son estables hasta una semana.

Procesamiento de la muestra para diagnóstico microbiológico

Examen directo:

En este caso el examen directo es de valor diagnóstico.

1. Poner sobre el portaobjetos una gota de KOH 10 a 20%.
2. Colocar varios de los cabellos recortados y que presentan el nódulo sobre la gota. Usar pinzas estériles
3. Colocar un cubreobjetos sobre la preparación.
4. Examinar la muestra pasados 15 a 30 minutos luego del montaje, dependiendo de la cantidad de muestra colocada. No dejar secar la preparación. El montaje se puede dejar hasta 24 horas para revisar y poder emitir un resultado, si el material no se ha digerido por completo. Aplastar con cuidado la muestra para no romper el cubreobjetos, ya que los nódulos son muy duros.
5. Revisar el montaje al microscopio de luz, la preparación debe observarse primero con un objetivo de bajo aumento (10X o 20X) para revelar la masa oscura alrededor de la superficie del pelo y luego examinarse con el objetivo de alto aumento (40X). Se pueden obtener los siguientes resultados:

Cuadro 2.6 Resultados que se pueden obtener al visualizar KOH

Estructura observada KOH	Cuadro clínico sugestivo
Con bajo aumento (100X o 200X) se observará el micelio fuliginoso alrededor de la superficie del pelo que corresponde al ascostroma. Al examinarse a alto aumento (400X) se va a observar que en su interior el ascostroma contiene ascas con ascosporas fusiformes.	Piedra negra

Nota: En las muestras de pelo, son las únicas en las que el examen directo con KOH **no se calienta**. Ya que esto destruye la hebra de pelo y no permite la observación de ubicación de las estructuras fúngicas en la hebra.

Cultivo de las muestras:

Inoculación

1. Dejar que el medio alcance la temperatura ambiente, secar para eliminar el exceso de humedad de la superficie previo a la inoculación de las muestras.
2. Rotular las placas en la base (no en la tapa) con el número asignado a esa muestra.
3. Colocar los cabellos previamente recolectados en la parte central del medio de cultivo alejados uno del otro. Usar pinzas estériles.
4. Sellar las placas con cinta permeable de celulosa o Parafilm (una sola vuelta alrededor de la placa es suficiente) para evitar la desecación del agar o una infestación de ácaros.
5. Incubar de 25 a 30 °C en un ambiente aerobio durante 4 semanas.

Tiempo de incubación

Las placas se deben incubar por cuatro semanas (5).

Lectura de placas

Cuadro 2.7 Tiempos de lectura de placas de cultivo por hongos

Lectura (5)	**Observaciones**
● Dos veces a la semana la primera semana. ● Una vez por semana durante 4 semanas	Para que un aislamiento sea considerado de importancia debe mostrar crecimiento sobre el sitio de inoculación en el agar.

FASE POSTANALÍTICA

Interpretación del cultivo

Es importante determinar qué es lo que está creciendo en la placa, diferenciar entre hongos contaminantes y patógenos. Es importante tomar en cuenta la clínica del paciente y el resultado del examen directo al momento de analizar los cultivos.

Para la identificación morfológica de los hongos se deben de buscar las características tanto macroscópicas como microscópicas del hongo.

Características macroscópicas

Tomar en consideración:

- Producción de pigmento en la placa
- Color de la colonia
- Aspecto de la colonia (algodonosa, pulverulenta, harinosa, entre otros)
- Tiempo de incubación.

En este caso se espera crecimiento de una colonia compacta de bordes irregulares de color café a gris intenso. Se observa micelio aéreo corto y aspecto aterciopelado. Crece lentamente, después de los 10 días de incubación (3).

Características microscópicas

Una vez que se tenga una colonia sospechosa realizar el montaje en lactofenol claro para proceder a la identificación microscópica.

Se puede realizar el montaje utilizando cinta adhesiva o con el asa micológica entre portaobjetos y cubreojetos, intentando no alterar las estructuras fúngicas, para poder visualizar las características microscópicas.

En el examen microscópico se observa micelio fuliginoso irregular, delgado o grueso, con septos seguidos o espaciados, con ramificaciones variadas, ocasionalmente se pueden observar esporas intercalares gruesas semejantes a clamidosporas (3).

En los casos de piedra negra el cultivo posee un valor confirmatorio.

Cuadro 2.8 Características Macroscópicas y microscópicas del agente causal más común que produce piedra negra

Grupo	Microorganismo
Hongos fuliginosos	*Piedraia hortae*

Reporte de resultados

Reporte de examen directo

1. El examen directo se debe reportar según las características observadas:
    a. **"Se observa ascostroma con ascas y ascosporas fusiformes."**

2. Si no se observa el ascostroma con ascas y ascosporas fusiformes, ni ningún otro elemento fúngico, reportar:
    a. **"No se observan estructuras fúngicas."**

Reporte de cultivo

1. Si el cultivo está negativo y el examen directo está negativo, reportar:
    a. "**Cultivo negativo por hongos".**
2. Si se logra aislar el agente causal e identificarlo, reportar:
    a. **"Cultivo positivo por (género y especie) o sólo género".**
2. Si el cultivo está negativo y el examen directo está positivo, reportar:
    a. **"No se obtuvo crecimiento del agente causal".**
2. Si se observa crecimiento de 1 o más microorganismos que se consideran que no son de importancia clínica, reportar:
    a. **"Cultivo negativo por hongos".**

III. TINEA CAPITIS

FASE PREANALÍTICA

Solicitud de análisis: Cuadros clínicos asociados

En los seres humanos las dermatofitosis o tiñas se manifiestan como infecciones en los tejidos queratinizados, se puede observar como una infección/parasitación del pelo, piel cabelluda y anexos (cejas y pestañas). Se encuentra micelio artrosporado hialino como forma parasitaria o simplemente hialino septado (1,2,3).

Los dermatofitos se encuentran entre las pocas especies de hongos que causan enfermedades contagiosas y de transmisión directa de hospedero a hospedero en seres humanos y animales. La transmisión de estos hongos se lleva a cabo generalmente por artrosporas que pueden propagarse por contacto directo de piel a piel (contacto con animales infectados) o a través de fomites (sombreros, instrumentos de peluquería contaminados) que contienen artrosporas libres, escamas de piel desprendidas o pelos. Además, la fase saprofítica es infectante, esta se encuentra en el ambiente y en animales como perros, gatos, caballos, entre otros (1,2).

En términos generales, según aspectos epidemiológicos y ecológicos de los dermatofitos estos pueden clasificarse de la siguiente manera:

Dermatofitos de distribución cosmopolita

Antropofílicos: *Epidermophyton floccosum*, *Trichophyton interdigitale*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton tonsurans.*

Zoofílicos: *Microsporum canis*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Nannizzia nana (Microsporum nanum)*.

Geofílicos: *Nannizzia gypsea (Microsporum gypseum).*

Dermatofitos de distribución limitada

Antropofílicos: *Trichophyton concentricum, Microsporum ferrugineum, Trichophyton schoenleinii, Trichophyton soudanense.*

Zoofílicos: *Trichophyton mentagrophytes var erinacei, T. benhamiae,* entre otros.

Geofílicos: *Trichophyton vanbreuseghemii, Microsporum vanbreuseghemii,* entre otros.

Según algunos autores, para clasificar las tiñas de la cabeza se realiza una categorización con respecto a los aspectos clínicos que se observa a continuación (1):

Cuadro 2.9 Cuadros clínicos asociados a Tinea capitis

Enfermedad	Agente causal	Aspectos clínicos
Tiña seca de la cabeza	**Microspórica**: *M. canis* **Tricofítica**: *T. tonsurans*	Presenta 2 variedades morfológicas (1): **Microspórica**: Una sola placa grande, pseudoalopécica, circular, escamosa, y con abundantes pelos cortos. **Tricofítica**: Varias placas pequeñas, escamosas, con pocos pelos cortos que salen a la superficie; las placas pseudoalopécicas escamosas.
Tiña inflamatoria o Querión de Celso	Producida por especies zoofílicas: *M. canis y T. mentagrophytes.*	Inicia como tiña seca, con una o varias placas pseudoalopécicas, con descamación y pelos cortos; aumenta el eritema y la inflamación; formando una lesión de aspecto tumoral, dolorosa y cubierta de numerosas pústulas y costras melicéricas, de la que drena pus.
Tiña de la cabeza en adultos	*M. canis; T. tonsurans; T. rubrum, T. mentagrophytes*	Es una entidad poco frecuente. Es una tiña seca no clásica, tiene presencia de pocos pelos cortos que se entremezclan con pelos sanos y no existen lesiones escamosas.
Tiña fávica o favus	*T. schoenleinii*	Inicia como placas eritemato-escamosas con un puntilleo rojizo, que luego se convierten en costras elevadas. Tiene escudete que recubre la cabeza, costras melicéricas y elementos miceliales acumulados; esto da un olor a "ratón mojado". Pelos fávicos largos, deformados y sin brillo y francas zonas de alopecia. Es de muy rara presentación.

Diagnóstico diferencial

Tiña seca: alopecia areata, tricotilomanía, dermatitis seborreica (falsa tiña amiantácea), psoriasis, secundarismo sifilítico (1).

Tiña inflamatoria: foliculitis decalvante, perifoliculitis nodular o granulomatosa, lupus eritematoso sistémico, impétigo (1).

Tiña fávica: Foliculitis bacteriana, eccema seborreico, lupus eritematoso sistémico (1).

Muestras clínicas, transporte y conservación

Tabla Resumen. Información requerida para el procesamiento	
Datos del paciente	-Nombre completo, número de identificación, sexo y fecha de nacimiento. -Posible diagnóstico o cuadro clínico. -Fecha de inicio de síntomas. -Terapia recibida. -Lugar de procedencia. -Viajes recientes, actividades al aire libre, pasatiempos o contacto con animales.
Datos de la muestra	-Fecha y hora de la toma de muestra. -Técnica de obtención de la muestra. -Sitio de la toma de muestra. -Tipo de muestra. -Servicio que envía la muestra. -Responsable de la toma de muestra.
Muestras clínicas indicadas	
-Cabellos que presentan fundas o vainas blancas y escamas que rodean el tallo piloso. -Escamas de la piel cabelluda.	
Criterios de rechazo	
-Muestras que no estén rotuladas. -Muestras que su rotulación incorrecta o no coincida con los datos de la orden médica. -Paciente que esté tomando tratamiento antifúngico. -Paciente que haya consumido antifúngico en los últimos 15 días. -Paciente que se haya colocado crema antifúngica en los últimos 15 días. -Paciente que se haya colocado cremas no antifúngicas el mismo día.	
Observaciones	
-En aquellos casos donde el paciente no cumpla con las condiciones preanalíticas para la toma de muestra se debe de reprogramar la cita para una fecha en la cual se cumplan los criterios de toma de muestra (15 días sin tratamiento). -Siempre que sea posible, para aumentar la probabilidad de recuperación de un organismo fúngico, la muestra debe recolectarse antes de administrar un agente antimicótico.	
Recipiente indicado para la recolección	
-Placa de Petri estéril.	
Condiciones de transporte	
-Las muestras deben transportarse inmediatamente al Laboratorio Clínico en el contenedor en el cual se recolectó, a temperatura ambiente donde se permita mantenerla en condiciones adecuadas de humedad. -La muestra no debe ser refrigerada ni congelada.	

FASE ANALÍTICA

Consideraciones generales de procesamiento muestras de pelo

Es importante trabajar las muestras en un ambiente aséptico para evitar la contaminación con hongos ambientales. Se recomienda el procesamiento en cámara de flujo laminar o con mechero, de ser posible utilizar cubrebocas y no hablar encima de las muestras para no contaminarlas. Es buena práctica colocar toallas de papel con hipoclorito de sodio 1% en el sitio de trabajo.

Equipos e insumos requeridos

Cuadro 2.10 Equipos e insumos requeridos para realizar análisis de Tinea capitis

Activos base	Analizadores base	Activos adicionales
Incubadora a 30 °C (o caja en un cuarto a temperatura ambiente en su defecto)	Microscopio de luz, con objetivos de 10X, 20X, 40X y 100X	Cámara de bioseguridad Sistema MALDI-TOF[1]
Medios de cultivo	**Insumos**	**Pruebas complementarias**
Agar Sabouraud glucosado (SDA) Agar Sabouraud con antibiótico[2] (SGC) Agar Sabouraud con antibióticos y cicloheximida (MYC) Agar papa dextrosa[1] (PDA) Agar dermatofitos[3] (DTM)	Portaobjetos Cubreobjetos KOH 10 a 20 % Mechero Bunsen, Lámpara de alcohol[4] Pinza estéril Tijera estéril Hojas de bisturí Cuadros de gasa estéril Alcohol al 70 % Placas de Petri estériles Azul de lactofenol	Lámpara de Wood

1. Según la disponibilidad en el centro de salud.
2. Se recomienda la utilización de este medio (SGC) sobre el SDA ya que evita el crecimiento de bacterias que pueden afectar la recuperación del hongo, esto aplica a zonas no estériles.
3. Se recomienda el uso de este agar para el aislamiento de hongos dermatofitos.
4. Si no cuenta con Cámara de bioseguridad, puede utilizar un Mechero Bunsen o una lámpara de alcohol para reducir la contaminación ambiental.

Recolección de la muestra para diagnóstico micológico

1. Llamar al paciente por nombre y apellidos al lugar asignado para la toma de muestra, verificar con este que los datos personales correspondan.

2. Preguntar al paciente sobre: fecha de aparición del cuadro, aplicación de tratamientos, exámenes previos, cuadros similares en la familia, viajes recientes, actividades al aire libre, pasatiempos o contacto con animales y cualquier otra información que se considere relevante para poder realizar el diagnóstico.

3. Realizar la examinación de la zona afectada con luz de Wood en una habitación oscura, buscar la presencia de pelos fluorescentes en el paciente. En el caso de tiña capitis causadas por *M. canis, M. audouinii y M. ferrugineum*, los pelos colonizados emiten fluorescencia de color verde brillante. Los pelos infectados con *T. schoenleinii* pueden mostrar un color verde opaco. Es negativa para *N. gypsea, T. tonsurans y T. mentagrophytes*. En el caso de infecciones por *T. verrucosum*, es positiva en ganado vacuno pero negativa en el ser humano. Si no se cuenta con este recurso pasar al punto 4 (1,4).

4. Arrancar con pinza estéril pelos de la cabeza, procurar obtener parte de la vaina que recubre la raíz del pelo dentro del folículo piloso (en la tiña de la cabeza, la parte proximal del pelo es lo más importante). Obtener al menos 10 cabellos que presenten fundas blancas y escamas a su alrededor con su respectiva raíz (3). Si son cabellos difíciles de agarrar con la pinza estéril porque se rompen a nivel de la piel cabelluda, pasar al punto 6.

5. Colocar los cabellos recolectados en una placa de Petri estéril. Los pelos infectados pueden verse opacos, rotos y descoloridos. El cabello que emite fluorescencia bajo la luz de Wood también debe seleccionarse para el cultivo.

6. Para recolectar las escamas o pelos que no pueden arrancarse con pinzas: limpiar la zona con cuadros de gasa estériles y alcohol de 70 % y dejar secar.

7. Seleccionar la zona infectada y raspar la lesión de la piel cabelluda usando un bisturí sin filo o el borde de un portaobjetos de vidrio estéril
8. Colocar el material recolectado en una placa de Petri estéril.
9. Almacenar a temperatura ambiente hasta su procesamiento. Bajo estas condiciones la muestra es estable hasta por una semana. La placa se puede sellar para evitar infestación por ácaros.
10. Si las formas de toma de muestra anteriores son insuficientes, hacer recolección con cepillo de dientes. Utilizar un cepillo de dientes de cerdas suaves estéril y frotar con movimientos circulares sobre los márgenes o parches de la zona alopécica. Posteriormente, inocular las placas poniendo el cepillo con muestra sobre la superficie del agar (inoculación directa).

Procesamiento de la muestra para diagnóstico microbiológico

Examen directo

KOH:

1. Poner sobre el portaobjetos una gota de KOH 10 a 20 %,
2. Colocar varios cabellos de la muestra obtenida sobre la gota. Usar pinzas estériles.
3. Colocar un cubreobjetos sobre la preparación. Si también se recolectaron escamas de la lesión realizar un segundo montaje de KOH.
4. Examinar la muestra 15 a 30 minutos después del montaje, dependiendo de la cantidad de muestra colocada dar más tiempo de digestión. Se debe evitar que se seque la preparación.
5. Aplastar con cuidado la muestra y observar primero a bajo aumento (100X o 200X) y posterior a alto aumento (400X).
6. Las muestras de escamas de piel deben tratarse como lo descrito en el capítulo 1 de este Manual. Se pueden obtener los siguientes resultados:

Cuadro 2.11 Resultados que se pueden obtener al visualizar KOH	
Estructura observada KOH	**Cuadro clínico asociado (Esperar al resultado del cultivo para confirmar diagnóstico)**
Micelio artrosporado hialino o micelio hialino septado. El tipo de colonización se puede evidenciar en el examen directo, según la ubicación de las artrosporas: ● **Ectothrix**: artrosporas aparecen como una vaina de mosaico alrededor del cabello o como cadenas en la superficie del tallo del cabello. ● **Endothrix**: cadenas de artroconidias que llenan el interior del cabello. ● **Fávica**: infección causada por *T. schoenleinii*.	Tiña capitis

NOTA: las muestras de pelo son la única excepción donde **NO** se debe calentar la preparación de KOH, pues la hebra se desintegra y no es posible observar las características de las estructuras fúngicas en el pelo.

Cultivo de las muestras

Inoculación

1. Dejar que el medio alcance la temperatura ambiente, secar para eliminar el exceso de humedad de la superficie previo a la inoculación de las muestras.
2. Rotular en la base de la placa (no en la tapa) con el número asignado a esa muestra.
3. Colocar los cabellos recolectados en la parte central del medio de cultivo alejados uno del otro, usar pinzas estériles.
4. Si se recolectaron escamas, tomar el material con asa micológica y colocar suavemente sobre la superficie de los medios de cultivo, realizar en promedio 15 inóculos por cada agar. La cantidad de inóculos dependerá de la cantidad de material recolectado, pero para la buena recuperación de especímenes fúngicos, siempre se debe sembrar la mayor cantidad de muestra posible.

5. Sellar las placas con cinta permeable de celulosa o Parafilm (solo una vuelta alrededor de la placa) para evitar que las placas se sequen o sufran de una infestación de ácaros.
6. Incubar de 25 a 30 °C en un ambiente aerobio durante 4 semanas. Si se sospecha por epidemiología de *T. verrucosum* (importancia veterinaria) se debe incubar a 37 °C ya que tiene un mejor crecimiento a esta temperatura.

Tiempo de incubación

Las placas se deben incubar por cuatro semanas (4).

Lectura de placas

Cuadro 2.12 Tiempos de lectura de placas de cultivo por hongos

Lectura	Observaciones
• Dos veces a la semana la primera semana • Una vez por semana durante 3 semanas	Para que un aislamiento sea considerado de importancia debe mostrar crecimiento sobre el sitio de inoculación en el agar. Los cultivos mixtos deben subcultivarse para aislar el dermatofito, ya que hongos de crecimiento rápido (como *Aspergillus y Mucorales*) pueden sobrepasar rápidamente a los dermatofitos que crecen más lento.

FASE POSTANALÍTICA

Interpretación del cultivo

Es importante determinar qué es lo que está creciendo en la placa y diferenciar entre contaminantes y patógenos. Es importante tomar en cuenta la clínica del paciente y el resultado del examen directo al momento de analizar los cultivos.

Para la identificación morfológica de los hongos se deben de buscar las características tanto macroscópicas como microscópicas del hongo.

Características macroscópicas

Tomar en consideración:

- Producción de pigmento en la placa.
- Color de la colonia.
- Aspecto de la colonia (algodonosa, pulverulenta, harinosa, entre otros)
- Tiempo de incubación

Las colonias sospechosas de dermatofitos suelen ser lisas al reverso y de diferentes aspectos al anverso, desde algodonosas hasta pulverulentas. Su crecimiento puede durar hasta 3 semanas.

Características microscópicas

Una vez que se tenga una colonia sospechosa realizar el montaje en azul de lactofenol para proceder a la identificación microscópica.

Se puede realizar el montaje utilizando cinta adhesiva o con el asa micológica entre portaobjetos y cubreobjetos, intentando no alterar las estructuras fúngicas, para poder visualizar las características microscópicas.

El aislamiento en cultivo de dermatofitos provenientes del cabello se interpreta como diagnóstico, independientemente de si se observan o no elementos fúngicos en el examen microscópico directo inicial.

Cuadro 2.13 Agentes causales de Tiña capitis

Grupo	Microorganismo
Dermatofitos	*T. tonsurans, T. mentagrophytes/T. interdigitale, T. rubrum, M. canis, N. gypsea (M. gypseum), T. verrucosum*, *M. audouinii, T. schoenleinii.*

Reporte de resultados

Reporte de examen directo

1. En el examen directo se debe reportar según las características observadas:
    a. **"Se observa micelio hialino septado artrosporado o micelio hialino septado."**

2. Si no se observa el micelio hialino septado o artrosporado ni otras estructuras fúngicas en el examen directo, reportar:
    a. **"No se observan estructuras fúngicas."**

Reporte del cultivo

1. Si el cultivo está negativo y el examen directo está negativo, reportar:
    a. "**Cultivo negativo por hongos"**

2. Si se logra aislar el agente causal e identificarlo, reportar:
    a. **"Cultivo positivo por (género y especie) o sólo género"**

3. Si el cultivo está negativo y el examen directo está positivo, reportar:
    a. **"No se obtuvo crecimiento del agente causal"**

4. Si se observa crecimiento de 1 o más microorganismos que se consideran que no son de importancia clínica, reportar:
    a. **"Cultivo negativo por hongos"**

REFERENCIAS

1. Bonifaz A. Micología Médica Básica. 6ta ed. Ciudad de México: McGraw-Hill interamericana editores; 2020.

2. Arenas R. Micología Médica Ilustrada. 6ta ed. España: Mcgraw-Hill Interamericana de España S.L.; 2019.
3. Gross N, Salas Campos I. Métodos diagnósticos en Micología Médica. 1ra ed. 2da reimpresión. San José, Costa Rica: Editorial UCR; 2015.
4. Wengenack NL. CLSI M54 Principles and Procedures for Detection and Culture of Fungi in Clinical Specimens. 2da ed. Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI); 2021.
5. Carroll K, Pfaller M. Manual of Clinical Microbiology. Vol. 1. 13ra ed. Washington DC: ASM Press; 2023.
6. Westblade LF, Burd EM, Lockhart S, Procop GW. Larone´s Medically Important Fungi. 7ma ed. Washington DC: Wiley, ASM Press; 2023.

Módulo 3: Diagnóstico micológico de muestras del estrato córneo (lesiones superficiales de la piel)

FASE PREANALÍTICA

Solicitud de análisis: Cuadros clínicos asociados

Este análisis se envía a pacientes que presenten lesiones a nivel superficial en la piel sugestivas de hongos. Los tipos de lesiones pueden variar dependiendo del agente causal, generando desde hipo o hiperpigmentación hasta descamación y prurito (1). A continuación, se detallan los cuadros clínicos asociados a micosis superficiales:

Cuadro 3.1 Cuadros clínicos asociados a micosis superficiales de la piel (1,2)

Enfermedad	Agente causal	Aspectos clínicos
Pitiriasis versicolor	*Malassezia* spp.	Se presentan lesiones tipo mácula en especial en tronco espalda, cuello y regiones proximales de los brazos. Existe la variedad hipocrómica, que genera escamas finas con manchas de bordes irregulares iniciando pequeñas, que terminan generando grandes placas. Además, la variedad hiperpigmentada, se presenta con manchas color café claro con escamas en la superficie. Incluso, se pueden presentar las dos variantes en un mismo paciente, presentando así un cuadro mixto. Además, con menos frecuencia se puede presentar la variedad rubra, que genera manchas eritematosas. En cualquiera de las variantes es común la aparición de lesiones confluentes con el tiempo.
Tiña por dermatofitos	*Trichophyton* spp., *Nannizzia* spp. *y Epidermophyton* spp.	Generan placas descamativas, eritematosas, con borde activo y con prurito, pueden aumentar de tamaño si no se les trata. Es capaz de afectar varias regiones del estrato córneo: ● *Tinea capitis* (cabeza) ● *Tinea barbae* (barba o bigote) ● *Tinea corporis* (cuerpo) ● *Tinea cruris* (ingles) ● *Tinea manus* (manos) ● *Tinea pedis* (pies)
Cladosporidiosis epidérmica/Tiña nigra// tiña negra palmar, queratomicosis nigricans, feohifomicosis superficial	*Hortaea werneckii*	Afecta, sobre todo, las palmas de las manos y plantas de los pies, y de forma excepcional los interdigitales. Se presentan placas hiperpigmentadas de color marrón claro a café oscuro a negro, irregulares y cubiertas con escama. No presenta eritema.

Candidiasis	Levaduras del género *Candida* spp. y géneros asociados a *Candida*	Afecta, sobre todo, los pliegues de la piel como, submamarios, axilares, inguinales, glúteos y región umbilical, además puede generar pañalitis. Genera placas eritematosas escamosas con fisuras vesículas, pústulas y lesiones satelitales.
Presentaciones cutáneas primarias y secundarias de agentes causales de infecciones sistémicas.[1]	*Coccidioides* spp2., *Histoplasma capsulatum*., *Cryptococcus* spp., *Blastomyces* spp.,[2]*Talaromyces* spp.[2]	Histoplasmosis ● Lesiones especialmente en cara y cuello, palmas, plantas. Sin embargo, pueden presentarse en cualquier lugar. ● Pápulas con aspecto moluscoide ● Ocasionalmente úlceras, celulitis, lesiones purpúricas y paniculitis. Criptococosis ● Lesiones especialmente en miembros superiores e inferiores. Aunque también cara y cuello. ● Nódulo gomosas, con linfangitis y adenitis. ● Ocasionalmente lesiones solitarias o múltiples, con aspecto papular, moluscoide, pueden ulcerarse y generar abscesos. Blastomicosis ● Chancros, con linfangitis y adenitis que puede generar lesiones nódulo gomosas. ● Ocasionalmente pápulas, con nódulos eritemato-violáceos, que pueden generar úlceras y lesiones verrucosas. Coccidiomicosis ● Lesiones especialmente en cuello, axilas e ingles. Abscesos y lesiones gomosas ulceradas. ● Generan máculas, pápulas y fístulas en las piernas. Talaromicosis ● Pápulas con necrosis central.

1. Refiérase a los módulos siguientes para complementar infecciones sistémicas
2. No se han reportado casos en el país, sin embargo, es importante tomarlo en cuenta debido a las migraciones y los viajes de las personas, lo cual puede hacer que se presenten casos en el país.

Diagnóstico diferencial

Psoriasis, eritrasma, melanoma, nevus, pediculosis, foliculitis e impétigo bacteriano (1).

Muestras clínicas, transporte y conservación

Tabla Resumen. Información requerida para el procesamiento	
Datos del paciente	-Nombre completo -Número de identificación -Edad -Sexo -Diagnóstico de base o cuadro clínico -Fecha de inicio de síntomas. -Terapia recibida.
Datos de la muestra	-Fecha y hora de la toma de muestra. -Técnica de obtención de la muestra. -Sitio de la toma de muestra. -Tipo de muestra. -Servicio que envía la muestra. -Responsable de la toma de muestra.
Muestras clínicas indicadas	
-Raspado de la lesión de la piel con bisturí sin filo, obtención de escamas de la lesión, sin provocar sangrado de la lesión.	
Criterios de rechazo	
-Paciente que esté tomando tratamiento antifúngico. -Paciente que haya consumido antifúngico en los últimos 15 días. -Paciente que se haya colocado crema antifúngica en los últimos 15 días. -Paciente que se haya colocado cremas no antifúngicas el mismo día.	
Observaciones	
-En aquellos casos donde el paciente no cumpla con las condiciones preanalíticas para la toma de muestra se debe de reprogramar la cita para una fecha en la cual se cumplan los criterios de toma de muestra	
Recipiente indicado para la recolección	
-Placa de Petri estéril	
Condiciones de transporte	
-Las muestras deben transportarse inmediatamente al Laboratorio Clínico en el contenedor en el cual se tomó la muestra y que permitan mantenerlas en condiciones adecuadas de humedad. -La muestra no debe ser refrigerada ni congelada.	

FASE ANALÍTICA

Consideraciones generales de procesamiento muestras superficiales de piel

Es importante trabajar las muestras en un ambiente aséptico para evitar la contaminación con hongos ambientales. Se recomienda el procesamiento en cámara de flujo laminar o con mechero, de ser posible utilizar cubrebocas y no hablar encima de las muestras para no contaminarlas (2).

Equipos e insumos requeridos

Cuadro 3.3 Equipos e insumos requeridos

Activos base	Analizadores base	Activos adicionales
Incubadora a 30 °C (o caja en un cuarto a temperatura ambiente en su defecto)	Microscopio de luz, con objetivos de 10X o 20X, 40X y 10X Sistema automatizado para ID	Cámara de bioseguridad Sistema MALDI-TOF[1] Microscopio de fluorescencia[1]
Medios de cultivo	**Insumos**	**Pruebas complementarias**
Agar Sabouraud glucosado (SDA) Agar Sabouraud con antibióticos y cicloheximida (MYC) Agar Sabouraud con antibiótico[2] (SGC) Agar papa dextrosa[3] (PDA) Agar dermatofitos[4] (DTM)	Asa micológica Portaobjetos Cubreobjetos KOH 10%-40% Bisturí Hojas de bisturí Placa de Petri estéril Mechero Bunsen, Lámpara de alcohol[5]	Luz de Wood[1] Blanco de calcofluor[1]

1. Según la disponibilidad en el centro de salud
2. Se recomienda la utilización de este medio sobre el SDA, ya que evita el crecimiento de bacterias que pueden afectar la recuperación del hongo, esto aplica a zonas no estériles.
3. Se recomienda la utilización de este medio de cultivo para favorecer la esporulación de los hongos y poder realizar la identificación de los aislamientos obtenidos mediante morfología. Pero no como medio de aislamiento primario.
4. Se recomienda el uso de este agar para el aislamiento de hongos dermatofitos.
5. Si no cuenta con Cámara de bioseguridad, puede utilizar un Mechero Bunsen o una lámpara de alcohol para reducir la contaminación ambiental.

Recolección de la muestra para diagnóstico micológico:

1. Llamar al paciente por nombre y apellidos al lugar asignado para la toma de muestra, verificar con este que los datos personales correspondan.
2. Preguntar al paciente sobre: fecha de aparición del cuadro, aplicación de tratamientos, exámenes previos, cuadros similares en la familia y cualquier otra información que se considere relevante para poder realizar el diagnóstico.
3. Limpiar la lesión con alcohol de 70 ° y esperar a que seque.
4. Tomar un raspado de la lesión de la piel con bisturí estéril sin filo, con el fin de obtención de escamas de la lesión, sin provocar sangrado de la lesión.
5. Raspar de los bordes activos de la lesión, ya que hay más posibilidad de recuperar el agente etiológico. Recolectar la mayor cantidad de material posible.
6. Guardar el material recolectado en una placa de Petri o recipiente estéril a temperatura ambiente, para su posterior procesamiento.
7. Si se almacenan las muestras a temperatura ambiente, son estables hasta una semana.
8. Revisar las lesiones bajo la luz de Wood, colocar al paciente en una zona oscura para poder observar la fluorescencia de las lesiones (si se cuenta con esta herramienta). Puede ser que la luz de Wood no emita fluorescencia, aun así se debe tomar la muestra.

Cuadro 3.2 Interpretación de resultados de luz de Wood	
Color de lesión con Luz de Wood	**Cuadro Clínico**
Amarillo Verdoso	Pitiriasis versicolor
Rojo coral	Eritrasma

NOTA: dependiendo del tipo de lesión que se observe, donde los métodos convencionales de raspado superficial son insuficientes, se recomienda tomar una biopsia. Esto en coordinación con el personal médico encargado.

Procesamiento de la muestra para diagnóstico micológico

Examen directo:

Colocar una gota de KOH 10 al 20 % en el portaobjetos y colocar la muestra sobre el KOH y cubrirla con un cubreobjetos. Calentar, presionar la preparación ligeramente y observar.

Nota: la descripción detallada de la técnica se encuentra en el módulo 1 de este manual.

Se pueden obtener los siguientes resultados:

Cuadro 3.4 Resultados que se pueden obtener al visualizar KOH

Estructura observada KOH	Cuadro clínico sugestivo (Esperar al resultado del cultivo para confirmar diagnóstico)
Micelio artrosporado	Tiña
Micelio hialino septado	Tiña, hialohifomicosis
Pseudomicelio hialino, micelio hialino septado y/o blastosporas de 2.5 - 7.5 µm	Candidiasis
Blastosporas de 3 - 8 µm, uniformes, base de implantación ancha y/o micelio acodado hialino	Pitiriasis
Micelio fuliginoso septado	Cladosporidiosis epidérmica
Blastosporas esféricas, 2 - 15 µm, base de implantación estrecha, con cápsula o poco encapsuladas, con variación de tamaños	Criptococosis cutánea
Blastosporas intracelulares y/o extracelulares de 2 - 5 µm, con forma de lenteja	Histoplasmosis cutánea
Blastosporas de 8 - 15 µm, uniformes, con base de implantación ancha	Blastomicosis cutánea
Blastosporas con un tabique central intracelulares, redondas u ovaladas	Talaromicosis cutánea
Esférulas de 10 - 80 µm, con o sin endosporas 2 - 5 µm	Coccidioidomicosis cutánea

Cultivo de las muestras:

Inoculación

Cultivar en placas ya que tienen mayor superficie lo cual permite más espacio para inocular y crecimiento.

1. Dejar que los medios SGC (SDA en caso de no contar con medios con antibióticos) y MYC alcancen la temperatura ambiente, secar para eliminar el exceso de

humedad de la superficie previo a la inoculación de las muestras. NOTA: si la lesión es sugestiva de dermatofitos utilizar preferiblemente agar MYC y DTM, si es sugestiva de candidiasis utilizar MYC y SGC (según la disponibilidad de agares del Centro de Salud)

2. Rotular las placas en la base (no en la tapa) con el número de identificación asignado a esa muestra.
3. Tomar las escamas de piel recolectadas y colocarlas suavemente (no cortar el agar) sobre la superficie del agar realizando 15-20 inóculos como mínimo. La cantidad de inóculos dependerá de la cantidad de material recolectado, sin embargo, para la buena recuperación de especímenes fúngicos, siempre debe sembrarse la mayor cantidad de muestra posible.
4. Incubar los medios a 30 ± 2 °C en un ambiente aerobio. La incubación a temperatura ambiente hace que el crecimiento sea más lento, por las variaciones de la temperatura (2).
5. Sellar las placas con cinta permeable de celulosa o Parafilm (una sola vuelta alrededor de la placa es suficiente) para evitar la desecación del agar o una infestación de ácaros.
6. Si en el examen directo se observa *Malassezia* spp. no es necesario cultivar, ya que este hongo no crece en los medios comunes, por lo que la observación en KOH 10 % es suficiente para su diagnóstico y tratamiento. (Existen medios comerciales como agar Dixon, para cultivar este tipo de levaduras, aunque no son de uso indispensable en la clínica).

Tiempo de incubación

Las placas se deben incubar por cuatro semanas.

En este caso los agentes causales más comunes de infecciones en la piel son los dermatofitos. Pero si el agente del que se sospecha es no dermatofito se puede extender el tiempo de incubación hasta seis semanas (2,3).

Lectura de placas

Cuadro 3.5 Tiempos de lectura de placas de cultivo por hongos (2).	
Lectura	**Observaciones**
● Dos veces a la semana la primera semana ● Una vez por semana durante 4 semanas	Se debe de realizar subcultivos a los cultivos mixtos, debido al crecimiento de mohos que puedan contaminar el medio y enmascarar los dermatofitos.

FASE POSTANALÍTICA

Análisis e interpretación de cultivos

- Es importante determinar qué es lo que está creciendo en la placa y diferenciar entre contaminantes y patógenos.
- En casos de muestras de piel se espera el crecimiento ya sea de dermatofitos, *Candida* spp. o *H. werneckii*, que son los más comunes. Sin embargo, se puede presentar el crecimiento de otros hongos que generan presentaciones clínicas sistémicas que diseminan en piel como *Cryptococcus* spp., *Blastomyces, spp. H. capsulatum, Coccidioides* spp., *Talaromyces* spp. Recordar que puede haber crecimiento de otros hongos filamentosos no dermatofitos de relevancia clínica como *Fusarium* spp., *Scopulariopsis* spp., *Neoscytalidium dimidiatum*, entre otros que pueden causar fungemias con manifestaciones a nivel cutáneo. Se debe priorizar el reporte de estos aislamientos al personal médico.
- Es importante tomar en cuenta la clínica del paciente y el resultado del KOH al momento de analizar los cultivos. En caso de duda ante el crecimiento que se observe en los medios de cultivo y los resultados del examen directo, se puede llamar al paciente para coordinar una segunda toma de muestra.
- Para la identificación de las blastosporas se debe de hacer uso del sistema automatizado para ID disponible en el centro de salud.

- Por su parte la identificación de los hongos filamentosos se basa en la observación de las características tanto macroscópicas como microscópicas del hongo.

Nota: En algunas ocasiones la identificación mediante métodos bioquímicos o por observación de las características macroscópicas y microscópicas de un hongo no son suficientes para lograr una correcta identificación del microorganismo, ya sea blastospora u hongo filamentoso. En dichos casos se pueden usar otras metodologías como el sistema MALDI-TOF, que pueden ser útiles en casos de difícil identificación.

Características macroscópicas

Tomar en consideración:

1. Producción de pigmento en la placa.
2. Color de la colonia.
3. Aspecto de la colonia (algodonosa, pulverulenta, harinosa, entre otros).
4. Tiempo de incubación.

Las colonias sospechosas de dermatofitos suelen ser lisas al reverso y de diferentes aspectos al anverso, desde algodonosas hasta pulverulentas. Mientras que los demás agentes causales micosis en el estrato córneo presentan morfologías variadas.

Características microscópicas

Una vez que se tenga una colonia sospechosa realizar el montaje en azul de lactofenol o lactofenol claro para proceder a la identificación microscópica.

Se puede realizar el montaje utilizando cinta adhesiva o con el asa entre porta y cubreobjetos, intentando no alterar la estructura fúngica, así se podrán visualizar las características microscópicas. Se debe de tomar en cuenta:

- Tipo de esporulación.
- Características del micelio.

Recordar que es posible el aislamiento de agentes de micosis sistémicas que puedan estar causando infecciones cutáneas primarias o diseminadas. Para revisar las características morfológicas de estos agentes refiérase a los capítulos relacionados con las micosis sistémicas.

Cuadro 3.6 Principales microorganismos aislados de cultivos de piel (1,4,5)	
Grupo	**Microorganismo**
Dermatofito	*T. rubrum, T. tonsurans,* Complejo *T. interdigitale/ T. mentagrophytes, M. canis, N. gypsea* (*M. gypseum*), *E. floccosum.*
Blastosporas	*Candida* spp., *Cryptococcus* sp. (baja frecuencia)
Hongos fuliginosos	*H. werneckii* Otros hongos dematiáceos (referirse al módulo 8)
Hongos hialinos	*Histoplasma capsulatum* (epidemiológicamente importante, atención a medidas de bioseguridad) Otros hongos hialinos (referirse al módulo 8)

Reporte de resultados

Reporte de examen directo

1. El examen directo se debe reportar según las características observadas:
    a. **“Se observa micelio hialino septado y micelio artrosporado.”**
    b. **“Se observa micelio hialino septado.”**
    c. **“Se observa micelio fuliginoso septado.”**
    d. **“Se observan blastosporas.”**
    e. **“Se observa micelio hialino septado y pseudomicelio.”**
    f. **“Se observan blastosporas, micelio acodado y micelio hialino septado.”**

2. Si no se observa micelio ni otras estructuras fúngicas, reportar:
    a. **“No se observan estructuras fúngicas.”**

Reporte de cultivo

1. Si el cultivo está negativo y el examen directo está negativo, reportar:

a. "**Cultivo negativo por hongos"**

2. Si se logra aislar el agente causal e identificarlo, reportar:
   a. **"Positivo por (género y especie) o sólo género"**

3. Si se logra aislar varios agentes causales e identificarlos, reportar:
   a. **"Positivo por:**
      (género y especie) o sólo género
      (género y especie) o sólo género"

4. Si el cultivo está negativo y el examen directo está positivo, reportar:
   a. **"No se obtuvo crecimiento del agente causal"**

5. Si se observa crecimiento de 1 o más microorganismos que se consideran que no son de importancia clínica, reportar:
   a. **"Cultivo negativo por hongos"**

REFERENCIAS

1. Bonifaz A. Micología Médica Básica. 6ta ed. Ciudad de México: McGraw-Hill interamericana editores; 2020.
2. Wengenack NL. CLSI M54 Principles and Procedures for Detection and Culture of Fungi in Clinical Specimens. 2da ed. Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI); 2021.
3. Gross N, Salas Campos I. Métodos diagnósticos en Micología Médica. 1ra ed. 2da reimpresión. San José, Costa Rica: Editorial UCR; 2015.
4. Carroll K, Pfaller M. Manual of Clinical Microbiology. Vol. 1. 13ra ed. Washington DC: ASM Press; 2023.
5. Leber AL (Ed.). Clinical Microbiology Procedures Handbook. 4ta ed. Washington, D.C.: American Society for Microbiology (ASM); 2024.

Módulo 4: Diagnóstico micológico de infecciones de uñas

FASE PREANALÍTICA

Solicitud de análisis: Cuadros clínicos asociados

Este análisis se envía a pacientes que presenten lesiones en las uñas. Los tipos de lesiones pueden variar dependiendo del agente causal. A continuación, se detallan los cuadros clínicos asociados a onicomicosis (1,2):

Cuadro 4.1 Cuadros clínicos asociados a onicomicosis

Enfermedad	Agente causal	Aspectos clínicos
Tinea unguium	*Trichophyton* spp., *Microsporum* spp., *Nannizzia* spp. y *Epidermophyton* spp.	Principales agentes causales de onicomicosis. Suelen causar que la uña se engruese y se deforme, con formación de detritus en el lecho subungueal.
Onicomicosis por hongos levaduriformes	Blastosporas de *Candida*, spp., *Trichosporon* spp.	Se suele presentar de forma proximal con inflamación periungueal. Más común en uñas de las manos.
Onicomicosis por hongos filamentosos no dermatofitos	*Fusarium* spp., *Aspergillus* spp., *Acremonium* spp., *Scopulariopsis* spp., *Neoscytalidium dimidiatum, Trichoderma* spp., *Paecilomyces* spp.,	Se presenta de manera similar a la tinea ungium, con engrosamiento de la uña y distrofia de ésta.

Diagnóstico diferencial

Psoriasis, onicomicosis bacteriana, hiperqueratosis, distrofia (3).

Muestras clínicas, transporte y conservación

Con el fin de poder realizar un diagnóstico adecuado y brindar el tratamiento correcto, se debe de realizar una correcta toma de muestra.

Tabla Resumen. Información requerida para el procesamiento	
Datos del paciente	-Nombre completo -Número de identificación -Edad -Sexo -Diagnóstico de base o cuadro clínico -Fecha de inicio de síntomas. -Terapia recibida.
Datos de la muestra	-Fecha y hora de la toma de muestra. -Técnica de obtención de la muestra. -Sitio de la toma de muestra. -Tipo de muestra. -Servicio que envía la muestra. -Responsable de la toma de muestra.
Muestras clínicas indicadas	
-Uñas de las manos. -Uñas de los pies. -Detrito del lecho ungueal	
Criterios de rechazo	
-Paciente que esté tomando tratamiento antifúngico -Paciente que haya tomado algún antifúngico en los últimos 15 días -Paciente que se haya colocado antifúngicos tópicos -Paciente que se haya colocado crema antifúngica en los últimos 15 días -Paciente que se haya colocado cremas no antifúngicas, aceites o talcos el mismo día (2) -Paciente con uñas demasiado cortas. -Paciente con aplicación de esmalte. -Paciente con productos químicos (uñas acrílicas, etc) aplicados en las uñas.	
Observaciones	
-En aquellos casos donde el paciente no cumpla con las condiciones preanalíticas para la toma de muestra se debe de reprogramar la cita para una fecha en la cual se cumplan los criterios de toma de muestra. En casos de aplicación de sustancias tópicas (antifúngicos, lacas o esmaltes) retirar su uso y esperar 15 días para la toma de muestra.	
Recipiente indicado para la recolección	
-Placa de Petri estéril	
Condiciones de transporte	
-Las muestras deben transportarse inmediatamente al Laboratorio Clínico en el contenedor en el cual se tomó la muestra y que permitan mantenerlas en condiciones adecuadas de humedad. -La muestra no debe ser refrigerada, ni congelada.	

FASE ANALÍTICA

Consideraciones generales de procesamiento de muestras de uñas

Es importante trabajar las muestras en un ambiente aséptico para evitar la contaminación con hongos ambientales. Se recomienda el procesamiento en cámara de flujo laminar o con mechero, de ser posible utilizar cubrebocas y no hablar encima de las muestras para no contaminarlas.

Equipos e insumos requeridos

Cuadro 4.2 Equipos e insumos requeridos

Activos base	Analizadores base	Analizadores adicionales
Incubadora a 30 °C (o caja en un cuarto a temperatura ambiente en su defecto)	Microscopio de luz, con objetivos de 10X, 20X, 40X y 100X Sistema automatizado para ID	Cámara de bioseguridad Sistema MALDI-TOF[1] Microscopio de fluorescencia[1]
Medios de cultivo	**Insumos**	**Pruebas complementarias**
Agar Sabouraud glucosado (SDA) Agar Sabouraud con antibióticos y cicloheximida (MYC) Agar Sabouraud con antibiótico[2] (SGC) Agar dermatofitos[3] (DTM)	Cánula Nipper Asa micológica Asa bacteriológica Portaobjetos Cubreobjetos KOH 40 % Azul de lactofenol Lactofenol claro Mechero Bunsen, lámpara de alcohol[4] Placa de Petri estéril Alcohol 70 %	Blanco de calcoflúor[1]

1. Según la disponibilidad en el centro de salud.
2. Se recomienda la utilización de este medio sobre el SDA ya que evita el crecimiento de bacterias que pueden afectar la recuperación del hongo, esto aplica a zonas no estériles.
3. Se recomienda el uso de este agar para el aislamiento de hongos dermatofitos.
4. Si no cuenta con Cámara de bioseguridad, puede utilizar un Mechero Bunsen o una lámpara de alcohol para reducir la contaminación ambiental.

Recolección de la muestra para diagnóstico micológico:

1. Llamar al paciente por nombre y apellidos al lugar asignado para la toma de muestra, verificar con este que los datos personales correspondan.

2. Preguntar al paciente: fecha de aparición de la lesión, aplicación de tratamientos, exámenes previos, cuadros similares en la familia, traumatismos en la zona afectada y cualquier información que se considere relevante para poder realizar el diagnóstico.

3. Revisar las uñas del paciente y tomar muestra de aquellas uñas con lesiones sugestivas (cambio de color, engrosamiento, distrofia). También revisar espacios interdigitales, plantas del pie, talones, palmas en busca de lesiones causadas por hongos. En caso de encontrarse lesiones sugestivas de micosis en estos sitios, tomar muestra de las lesiones, siguiendo las instrucciones dadas en el capítulo de diagnóstico de micosis superficiales.

4. Limpiar la zona con alcohol al 70 %, dejar secar.

5. **Con nipper**: recolectar la zona de la uña que se vea afectada. (Esta es la mejor técnica) Si se trata de una lesión blanca superficial o proximal donde no pueda usarse nipper para la toma de muestra, realizar un raspado o corte de laminitas delgadas de la uña en la zona afectada con un bisturí sin filo. Para evitar la contaminación del cultivo con bacterias y otros hongos, desechar siempre la porción más distal de la uña y luego tomar material proximal que servirá de muestra.

6. Recolectar el detrito presente debajo y en las orillas de las uñas afectadas (lesión subungueal distrófica o distal), con la cánula o nipper.

7. Recolectar la mayor cantidad de material posible, las probabilidades de recuperar el agente etiológico aumentan si se recolecta el material del borde activo de la lesión y el detrito subungueal (4,5,6).

8. Guardar el material recolectado en una placa de Petri o recipiente estéril a temperatura ambiente, para su posterior procesamiento.

Procesamiento de la muestra para diagnóstico microbiológico

Examen directo

KOH:

Colocar una gota de KOH 40 % en el portaobjetos y colocar la muestra sobre el KOH y cubrirla con un cubreobjetos. Calentar, presionar la preparación ligeramente y observar.

Nota: la descripción detallada de la técnica se encuentra en el módulo 1 de este manual.

Cuadro 4.4 Resultados que se pueden obtener al visualizar KOH o examen directo (5)

Estructura observada KOH o examen directo	Cuadro clínico sugestivo (Esperar al resultado del cultivo para confirmar diagnóstico)
Micelio artrosporado	Onicomicosis por dermatofitos
Micelio hialino septado	Onicomicosis por dermatofitos o no dermatofitos
Pseudomicelio hialino, micelio y/o blastosporas	Onicomicosis por hongos levaduriformes (*Candida* spp., y/o otros)
Micelio fuliginoso septado	Onicomicosis por hongos negros

Cultivo de las muestras:

Inoculación

1. Dejar que los medios alcancen la temperatura ambiente (MYC y SGC, si se cuenta con disponibilidad de DTM también es posible utilizarlo en este tipo de muestra, pero no es indispensable), secar para eliminar el exceso de humedad de la superficie previo a la inoculación de las muestras.
2. Rotular las placas en la base (y no en la tapa) con el número asignado a esa muestra.
3. Recortar la muestra recolectada en fragmentos más pequeños, para realizar la inoculación. No se deben de inocular fragmentos más grandes que el tamaño de un grano de arroz (inoculando fragmentos pequeños se aumenta la exposición de la muestra al medio de cultivo y se favorece el crecimiento fúngico en las placas) (4).
4. Tomar los fragmentos de uñas y el detrito subungueal y colocarlos sobre la superficie del agar, realizando una incisión sobre este, de manera tal, que la muestra quede dentro del agar, realizando 15-20 inóculos como mínimo. La cantidad de

inóculos dependerá de la cantidad de material recolectado, pero para la buena recuperación de especímenes fúngicos, siempre debe sembrarse la mayor cantidad de muestra posible (4).

5. Sellar las placas con cinta permeable de celulosa o Parafilm para evitar que se sequen o sufran de una infestación de ácaros.

6. Incubar los medios a 30 ± 2 °C en un ambiente aerobio.

Tiempo de incubación

Las placas se deben incubar por tres semanas.

N. dimidiatum y las blastosporas, sin embargo, suelen crecer en menos tiempo. El tiempo de incubación puede extenderse hasta por seis semanas en casos particulares (4).

Lectura de placas

Cuadro 4.5 Tiempos de lectura de placas de cultivo por hongos

Lectura	Observaciones
-Dos veces a la semana la primera semana -Una vez por semana durante 4 semanas	Se deben de realizar subcultivos a los cultivos mixtos, debido al crecimiento de mohos que puedan contaminar el medio y enmascarar los dermatofitos. Para que un aislamiento sea considerado de importancia debe mostrar crecimiento sobre el sitio de inoculación en el agar. Y por lo general, se trata de lesiones con un solo aislamiento.

FASE POSTANALÍTICA

Análisis e interpretación de cultivos

- Es importante determinar qué es lo que está creciendo en la placa y diferenciar entre hongos colonizantes, contaminantes y patógenos (4).
- Se debe observar el crecimiento del hongo a partir del sitio de inoculación realizado, de lo contrario el crecimiento debe de considerarse como un posible contaminante.
- En el caso de hongos filamentosos no dermatofitos, para ser considerados como agentes etiológicos causantes de onicomicosis, se debe de contar con un examen directo positivo, con micelio hialino septado o fuliginoso (según el caso) y debe haber crecimiento del hongo en por los menos 5 de los 20 inóculos realizados (7).

- Es importante tomar en cuenta la clínica del paciente y el resultado del examen directo al momento de analizar los cultivos. En caso de duda ante el crecimiento que se observe en los medios de cultivo y los resultados del examen directo, se puede llamar al paciente para coordinar una segunda toma de muestra.
- Para la identificación de las blastosporas se debe de hacer uso del sistema automatizado para ID disponible en el centro de salud. Por su parte la identificación de los hongos filamentosos se basa en la observación de las características tanto macroscópicas como microscópicas del hongo.
- Si el crecimiento inicial no tiene estructuras de reproducción que permitan su identificación, se puede realizar subcultivos a medios poco enriquecidos como agar Avena o agar Papa.
    - **Nota**: En algunas ocasiones la identificación mediante métodos bioquímicos o por observación de las características macroscópicas y microscópicas de un hongo no son suficientes para lograr una correcta identificación del microorganismo, ya sea blastospora u hongo filamentoso. En dichos casos se pueden usar otras metodologías como el sistema MALDI-TOF, que pueden ser útiles en casos de difícil identificación.
- En el caso de las blastosporas sólo se debe de realizar la identificación, no es necesario realizar la PSA.

NOTA:
Por lo general, las onicomicosis en **uñas de pies** son causadas por hongos dermatofitos que tienen capacidad queratinolítica y generan en algunos casos infecciones conjuntas con otros hongos que no poseen esta capacidad o su batería enzimática no es tan abundante. De manera que, en el caso de uñas de pies, en primera instancia, se tratará de aislar el agente dermatofito. En el caso de las blastosporas, trabajar de la siguiente manera:

- Si en el examen directo del paciente se observan blastosporas y se obtiene aislamiento de *Candida* spp. en cultivo (crecimiento en más de 5 inóculos), se debe reportar el aislamiento, aunque no se aíslen otros hongos dermatofitos.

- Si en el examen directo no se observan blastosporas y en el cultivo se obtiene *Candida* spp., se debe considerar como microbiota normal de piel y no reportarlas. En este caso el reporte será **"Cultivo negativo por hongos"** (punto 5 de la sección posterior)**.**
- Si en el examen directo se observa micelio artrosporado (sugestivo de onicomicosis por dermatofitos) y en el cultivo únicamente se obtiene crecimiento de *Candida* sp. Se debe considerar la *Candida* sp como microbiota normal y no reportarla. En este caso el reporte será **"No se obtuvo crecimiento del agente causal"** (punto 4 de la sección posterior)**.**

Tomar en cuenta que en algunos casos la observación de blastosporas en el examen directo puede resultar difícil. Pueden confundirse con artefactos e incluso micelio artrosporado. Es importante asegurarse que se observa gemación en las blastosporas o incluso utilizar otros tipos de examen directo si se tiene al alcance (blanco de calcoflúor, tinciones).

No se debe dejar de lado las observaciones que se hagan de la lesión al momento de la toma de muestra, las lesiones por *Candida* sp., tienden a presentarse con: onicolisis, paroniquia, cambio de color. (3)

En las **uñas de manos**, por los factores predisponentes, las onicomicosis por *Candida* spp. sí son de mayor frecuencia y deben reportarse. (3)

Características macroscópicas

Tomar en consideración:

1. Producción de pigmento en la placa.
2. Color de la colonia.
3. Aspecto de la colonia (algodonosa, pulverulenta, harinosa, entre otros).
4. Tiempo de incubación.

Características microscópicas

Una vez que se tenga una colonia sospechosa realizar el montaje en azul de lactofenol o lactofenol claro para proceder a la identificación microscópica.

Se puede realizar el montaje utilizando cinta adhesiva o con el asa entre porta y cubre, intentando no alterar las estructuras fúngicas, para poder así visualizar las características microscópicas de cada género.

1. Tipo de conidias.
2. Tipo de conidióforos.
3. Características del micelio.

Cuadro 4.6 Principales microorganismos aislados de cultivos de uñas.

Grupo	Microorganismo
Dermatofito	*T. rubrum, T. tonsurans, T. interdigitale, M. canis, N. gypsea* (*M. gypseum*), *E. floccosum*
Blastosporas	*Candida* spp., *Trichosporon* spp
Hongos filamentosos hialinos	*Fusarium spp., Aspergillus spp., Acremonium spp., Scopulariopsis spp.*, *Trichoderma* spp., *Paecilomyces* spp.
Hongos fuliginosos	*N. dimidiatum*, *Curvularia* spp., *Alternaria* spp.

Reporte de resultados

Reporte de examen directo

1. En el examen directo se debe reportar según las características observadas:
   a. **"Se observa micelio hialino septado artrosporado."**
   b. **"Se observa micelio hialino septado."**
   c. **"Se observa micelio fuliginoso septado."**
   d. **"Se observan blastosporas."**
   e. **"Se observa micelio hialino septado y pseudomicelio."**
2. Si al examen directo no se observan estructuras fúngicas, reportar:
   a. **"No se observan estructuras fúngicas."**

Reporte del cultivo

1. Si el cultivo está negativo y el examen directo está negativo, reportar:
   a. "**Cultivo negativo por hongos".**

2. Si se logra aislar el agente causal e identificarlo, reportar:
    a. **"Positivo por (género y especie) o sólo género."**
3. Si se logra aislar varios agentes causales e identificarlos, reportar:
    a. **"Positivo por: (género y especie) o sólo género.**
    (género y especie) o sólo género".
4. Si el cultivo está negativo y el examen directo está positivo, reportar:
    a. **"No se obtuvo crecimiento del agente causal".**
5. Si se observa crecimiento de 1 o más microorganismos que se consideran que no son de importancia clínica, reportar:
    a. "Cultivo negativo por hongos".

REFERENCIAS

1. Salas-Campos I, Gross-Martínez NT. Agentes etiológicos de onicomicosis diagnosticadas en el laboratorio de micología médica de la Universidad de Costa Rica. Acta Med Costarric. 2012; 54(2):114-8.
2. Gross N, Salas Campos I. Métodos diagnósticos en Micología Médica. 1ra ed. 2da reimpresión. San José, Costa Rica: Editorial UCR; 2015.
3. Bonifaz A. Micología Médica Básica. 6ta ed. Ciudad de México: McGraw-Hill interamericana editores; 2020.
4. Wengenack NL. CLSI M54 Principles and Procedures for Detection and Culture of Fungi in Clinical Specimens. 2da ed. Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI); 2021.
5. Carroll K, Pfaller M. Manual of Clinical Microbiology. Vol. 1. 13ra ed. Washington DC: ASM Press; 2023.
6. Leber AL (Ed.). Clinical Microbiology Procedures Handbook. 4ta ed. Washington, D.C.: American Society for Microbiology (ASM); 2024.
7. Walshe MM, English MP. Fungi in nails. Br J Dermatol. 1966; 78(4):198–207.

Módulo 5: Diagnóstico micológico de otomicosis

FASE PREANALÍTICA

Solicitud del análisis: Cuadros clínicos asociados

Este análisis se solicita cuando hay sospecha de otomicosis por hongos, infección que afecta al canal auditivo externo. Suele estar asociada a infecciones bacterianas previas que se convierten en crónicas, donde los hongos encuentran un ambiente propicio en el oído, usualmente debido a la humedad o a lesiones en la piel del conducto auditivo.

Esta condición puede provocar síntomas como picazón, dolor, secreción y pérdida auditiva temporal (1). Generalmente, se encuentran causadas por hongos ambientales con predominio del género *Aspergillus* spp. Sin embargo, pueden ocurrir infecciones endógenas por hongos como *Candida* spp. e incluso afecciones por continuidad de tiñas o mucormicosis. (2)

Diagnóstico diferencial

Otitis bacteriana, dermatitis seborreica, dermatitis de contacto, furunculosis, tiña extendida por continuidad (2).

Muestras clínicas, transporte y conservación

Tabla Resumen. Información requerida para el procesamiento	
Datos del paciente	-Nombre completo, número de identificación, sexo y fecha de nacimiento -Posible diagnóstico o cuadro clínico. -Fecha de inicio de síntomas. -Terapia antimicrobiana recibida. -Lugar de procedencia
Datos de la muestra	-Fecha y hora de la toma de muestra. -Técnica de obtención de la muestra -Sitio de la toma de muestra -Tipo de muestra. -Servicio que envía la muestra -Responsable de la toma de muestra
Muestras clínicas indicadas	
-Exudados óticos -Lavados óticos.	

Criterios de rechazo
-Muestras con más de dos horas de recolección. -Hisopos con medio de transporte en gel. -Muestras recolectadas en recipientes no estériles. -Muestras no rotuladas.
Observaciones
-Es recomendable conocer datos sobre el diagnóstico, historial médico, condiciones subyacentes y tratamiento actual del paciente. Además, la historia clínica es de especial relevancia, aspectos como traumas mecánicos, actividades al aire libre o sumersión en fuentes de agua, pueden ser sumamente útiles para guiar el diagnóstico. Por tanto, se sugiere una estrecha comunicación con el médico tratante y/o acceso a las notas clínicas del expediente del paciente. -En el caso de estas muestras su procesamiento debe ser de manera preferencial el mismo día, en condiciones ideales dentro de las dos primeras horas, para obtener óptimos resultados en la identificación y recuperación de agentes etiológicos, ya que la demora en el procesamiento de estas muestras puede resultar en un crecimiento excesivo de contaminantes bacterianos e impedir la recuperación de patógenos fúngicos (1,2). -Una vez en el laboratorio la muestra debe ser procesada antes de 24 horas después de haber sido recibida. Idealmente deben ser cultivadas una vez recibidas en el laboratorio.
Recipiente indicado para la recolección
-Hisopo compacto estéril para recolección de material descamativo o seroso, con 1mL a 2 mL de solución salina 0.5% o agua estéril. -Tubos estériles sin aditivos, para colocar los hisopos o el material resultante del lavado.
Condiciones de transporte
-Transportar la muestra obtenida al laboratorio inmediatamente después de recolectada. Idealmente, no deberían pasar más de dos horas entre la recolección y el transporte, en casos especiales por distancia máximo 24 horas. -Durante el transporte la muestra debe ser mantenida a temperatura ambiente.

FASE ANALÍTICA

Consideraciones generales de procesamiento de muestras de oído externo (3,4)

Es importante trabajar las muestras en un ambiente aséptico para evitar la contaminación con hongos ambientales. Se recomienda el procesamiento en cámara de flujo laminar o con mechero, de ser posible utilizar cubrebocas y no hablar encima de las muestras para no contaminarlas.

Equipos e insumos requeridos

Cuadro 5.1 Equipos e insumos requeridos

Activos base	Analizadores base	Analizadores adicionales
Cámara de bioseguridad Incubadora a 30°C (o caja en un cuarto a temperatura ambiente en su defecto)	Microscopio de luz, con objetivos de 10x o 20x, 40x y 100x Sistema automatizado para ID Y PSA	MALDI-TOF[1] Microscopio de fluorescencia[1]
Medios de cultivo	**Insumos**	**Pruebas complementarias**
Agar Sabouraud con antibióticos (SGC)[2] Agar Sabouraud (SDA) Agar Sabouraud con antibióticos y cicloheximida (MYC)	Hisopo seco Espátula estéril Asa micológica y bacteriológica Portaobjetos Cubreobjetos KOH 10%-40% Mechero busen o lámpara de alcohol[3] Azul lactofenol o lactofenol claro	Blanco de calcofluor[1]

1. Según la disponibilidad en el centro de salud.
2. Se recomienda la utilización de este medio sobre el SDA ya que evita el crecimiento de bacterias que pueden afectar la recuperación del hongo, esto aplica a zonas no estériles.
3. Si no cuenta con Cámara de bioseguridad, puede utilizar un Mechero bunsen o una lámpara de alcohol para reducir la contaminación ambiental.

Recolección de la muestra para diagnóstico micológico (3,4):

1. Llamar al paciente por nombre y apellidos al lugar asignado para la toma de muestra, verificar con este que los datos personales correspondan.
2. Preguntar al paciente sobre: fecha de aparición del cuadro, aplicación de tratamientos, exámenes previos y cualquier otra información que se considere relevante para poder realizar el diagnóstico.
3. Exponer el canal auditivo externo halando el hélix de la oreja suavemente, a fin de tener una buena observación de oído.
4. Utilizar una lámpara o foco con el fin de iluminar bien la zona afectada.

5. Raspar la base del canal auditivo externo con hisopo seco, una cucharilla o cánula estéril para obtener la mayor cantidad de material. Generalmente se observa una placa blanca descamativa de aspecto aterciopelado o pulverulento, a veces son zonas puntiformes grises, verdes o marrón (1).

Procesamiento de la muestra para diagnóstico microbiológico (3,4):

Examen directo

1. Rotular un portaobjetos con los números de identificación de la muestra.
2. Realizar un frotis delgado a partir del hisopo o el exudado.
3. Realizar una tinción de Giemsa o Gram del frotis y observar a 1000X en busca de estructuras fúngicas.
4. Alternativamente, colocar una gota de KOH 20%, colocar el material obtenido del oído, cubrir con cubreobjetos, observar a alto y bajo poder al microscopio. Si se cuenta con los recursos realizar montaje en blanco de calcoflúor con una gota de reactivo y observar en microscopio de fluorescencia.

Nota:

1. Los hongos se pueden visualizar en microscopio de luz estándar, sin embargo, es importante tomar en cuenta que las células y detritus pueden generar falsos negativos, ya que pueden enmascarar la presencia de un hongo.
2. Las muestras siempre deben de ser observadas en primera instancia en microscopio de luz, para observar si las estructuras fúngicas en la muestra son de aspecto hialino o fuliginoso, ya que estos últimos no se observan en tinciones fluorescentes.

3. Es importante mencionar que se pueden formar artefactos en el KOH, en especial la formación de estructuras que simulan blastosporas, por lo que las tinciones fluorescentes ayudan a confirmar estos hallazgos.

Cuadro 5.2 Resultados que se pueden obtener al visualizar examen directo

Estructura observada en examen directo	Cuadro clínico sugestivo
Micelio hialino septado	Otomicosis por hongos filamentosos hialinos
Micelio fuliginoso septado	Otomicosis por hongos filamentosos fuliginosos
Blastosporas y/o pseudomicelio	Otomicosis por hongos levaduriformes
Cabezas aspergilares	Otomicosis por *Aspergillus* spp.
Micelio cenocítico (hifas gruesas dicotómicas sin septos)	Otomicosis por hongos del orden Mucorales

Cultivo de las muestras (3,4):

Inoculación

1. Revisar la integridad de la muestra y la correspondencia entre la identificación de la muestra y la solicitud enviada (si esta fue tomada por el personal médico)
2. Dejar que los medios (MYC y SGC) alcancen la temperatura ambiente, secar para eliminar el exceso de humedad de la superficie previo a la inoculación de las muestras.
3. Rotular las placas en la base (y no en la tapa) con los datos del paciente, al menos número de cédula, número de muestra, nombre del paciente y fecha del cultivo.
4. Inocular los medios con el hisopo con muestra o con el exudado enviado (0.5 mL). Colocar la muestra en el centro del agar, hacer una estría en el centro y rayar en tres direcciones, sin tocar los bordes del agar. Se puede utilizar el hisopo con la muestra o el asa bacteriológica según sea el caso.

Tiempo de incubación (3)

Las placas se deben Incubar por tres semanas

Lectura de placas (3)

Cuadro 5.3 Tiempos de lectura de placas de cultivo por hongos	
Lectura	**Observaciones**
• Dos veces a la semana la primera semana • Una vez por semana durante 3 semanas	Para que un aislamiento sea considerado de importancia debe mostrar crecimiento sobre el sitio de inoculación en el agar. Y por lo general, se trata de lesiones con un solo aislamiento.

FASE POSTANALÍTICA

Análisis e interpretación de cultivos (3,4)

- Es importante determinar qué es lo que está creciendo en la placa y diferenciar entre hongos contaminantes y patógenos.
- Se debe de observar el crecimiento del hongo a partir del sitio de inoculación realizado, de lo contrario el crecimiento debe de considerarse como un posible contaminante.
- Es importante tomar en cuenta la clínica del paciente y el resultado del examen directo al momento de analizar los cultivos.

Características macroscópicas

Tomar en consideración:

1. Producción de pigmento en la placa.
2. Color de la colonia.
3. Aspecto de la colonia (algodonosa, pulverulenta, harinosa, entre otros).
4. Tiempo de incubación.

Características microscópicas

- Una vez que se tenga una colonia sospechosa realizar el montaje en azul de lactofenol o lactofenol claro para proceder a la identificación microscópica.

- Se puede realizar el montaje utilizando cinta adhesiva o con el asa entre porta y cubre, intentando no alterar las estructuras fúngicas, para poder visualizar así las características microscópicas de cada género.

Estas técnicas se encuentran descritas con mayor claridad en el Módulo 1 de este Manual.

Los principales aislamientos obtenidos en este tipo de muestra se resumen en el cuadro siguiente:

Cuadro 5.4 Principales microorganismos fúngicos aislados de cultivos óticos.

Grupo	Microorganismos
Blastosporas	*Candida* spp. *Geotrichum* spp. (artrosporas) *Trichosporon* spp. (artroblastosporas) *Malassezia* spp.
Filamentosos	**Hialinos**
	Aspergillus spp. (sección flavi, sección fumigati, sección niger, sección terreus) *Penicillium* spp. *Scopulariopsis* spp.
	Fuliginosos
	Cladosporium spp. *Alternaria* spp.
Cenocíticos	Mucorales *(Rhizophus* spp.*, Mucor* spp.*, etc)*

- Si se obtiene crecimiento de hongos levaduriformes identificar por métodos bioquímicos, proteínicos o moleculares, según el alcance en el sitio de trabajo. No es necesario realizar pruebas de sensibilidad.
- Si son hongos filamentosos realizar montaje de las colonias en azul de lactofenol o lactofenol claro según corresponda por el tipo de colonia. Revisar la morfología macro y microscópica para llegar a una identificación de especie, o género al menos.
- Si el crecimiento inicial no tiene estructuras de reproducción que permitan su identificación, realizar subcultivos a medios poco enriquecidos como agar Avena o agar Papa dextrosa.

- Si se cuenta con la tecnología de espectrofotometría de masas, realizar el montaje para confirmación de la identidad del aislamiento. Aunque esta herramienta es de muy alto alcance, no es infalible, utilizarlo en conjunto con técnicas básicas de micología.

Reporte de resultados

Reporte de examen directo

1. Si el examen directo está positivo reportar según las características observadas:
    a. **"Se observa micelio hialino septado".**
    b. **"Se observa micelio fuliginoso septado".**
    c. **"Se observan blastosporas y/o pseudomicelio".**

2. Si al examen directo no se observan estructuras fúngicas, reportar:
    a. **"No se observan estructuras fúngicas".**

Reporte de cultivo

1. Si el cultivo está negativo y el examen directo está negativo, reportar:
    a. "**Cultivo negativo por hongos".**
2. Si se logra aislar el agente causal e identificarlo, reportar:
    a. **"Positivo por (género y especie) o sólo género".**
3. Si se logra aislar varios agentes causales e identificarlos, reportar:
    a. **"Positivo por: (género y especie) o sólo género.**

    (género y especie) o sólo género".
4. Si el cultivo está negativo y el examen directo está positivo, reportar:
    a. **"No se obtuvo crecimiento del agente causal".**

5. Si se observa crecimiento de 1 o más microorganismos que se consideran que no son de importancia clínica, reportar:

    a. **“Cultivo negativo por hongos”.**

REFERENCIAS

1. Bonifaz A. Micología Médica Básica. 6ta ed. Ciudad de México: McGraw-Hill interamericana editores; 2020.
2. Arenas R. Micología Médica Ilustrada. 6ta ed. España: Mcgraw-Hill Interamericana de España S.L.; 2019.
3. Wengenack NL. CLSI M54 Principles and Procedures for Detection and Culture of Fungi in Clinical Specimens. 2da ed. Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI); 2021.
4. Leber AL (Ed.). Clinical Microbiology Procedures Handbook. 4ta ed. Washington, D.C.: American Society for Microbiology (ASM); 2024.

Módulo 6: Diagnóstico micológico de oculares: úlceras corneales y otros

FASE PREANALÍTICA

Solicitud del análisis: Cuadros clínicos asociados

Este análisis se realiza ante la sospecha de queratitis micóticas, infecciones oculares que afectan la córnea y están causadas por hongos. Estas infecciones pueden ser provocadas por diversos tipos de hongos, siendo los más comunes aquellos pertenecientes a los géneros *Fusarium* spp. y *Aspergillus* spp., así como algunos otros levaduriformes y filamentosos dematiáceos. (1)

La queratitis micótica puede ocurrir tras la lesión de la córnea con material vegetal, contacto con agua contaminada o el uso de lentes de contacto mal higienizados. Los síntomas típicos incluyen enrojecimiento ocular, dolor intenso, sensación de cuerpo extraño en el ojo y disminución de la agudeza visual. El tiempo de evolución de la lesión, así como el grado de afectación son dos parámetros cruciales para el oftalmólogo en la sospecha clínica del agente microbiano involucrado. Las lesiones fúngicas suelen avanzar más lentamente, pero con carácter más agresivo. (2)

Existen otros casos donde pueden ocasionarse daños en el ojo a causa de infecciones fúngicas endógenas o por continuidad de tejidos afectados, aunque su frecuencia es mucho menor. Además, pueden presentarse cuadros oculares con alta frecuencia asociados a agentes bacterianos y con menos incidencia por amebas o virus. (2)

El diagnóstico se realiza mediante la evaluación clínica y el cultivo de muestras obtenidas de la córnea afectada. El tratamiento suele incluir el uso de antifúngicos tópicos y en algunos casos, procedimientos quirúrgicos para eliminar tejido afectado. **La pronta atención médica es crucial para prevenir complicaciones y preservar la salud visual del paciente, por lo tanto, corresponde a una emergencia médica en nuestros centros de salud (1).**

Por la naturaleza de estas muestras, se deben trabajar concomitante con estudios bacteriológicos. Es decir, de una misma toma de muestra, deben analizarse ambas clases de microorganismos tanto en el cultivo como en el examen directo.

Diagnóstico diferencial

Queratitis bacteriana, queratitis amebiana, queratitis por cuerpo extraño (1).

Muestras clínicas, transporte y conservación (3,4)

Tabla Resumen. Información requerida para el procesamiento	
Datos del paciente	-Nombre completo, número de identificación, sexo y fecha de nacimiento -Posible diagnóstico o cuadro clínico. -Fecha de inicio de síntomas. -Terapia antimicrobiana recibida. -Lugar de procedencia
Datos de la muestra	-Fecha y hora de la toma de muestra. -Técnica de obtención de la muestra -Sitio de la toma de muestra -Tipo de muestra -Servicio que envía la muestra -Responsable de la toma de muestra
Muestras clínicas indicadas	
-Raspados de córnea. -Fluido intraocular. -Conjuntiva. -Material purulento conjuntival. -Córnea. -Humor vítreo.	
Criterios de rechazo	
-Muestras no rotuladas, por la dificultad de obtención de la muestra en estos casos se debe contactar con el responsable de la toma de muestra para asegurar la trazabilidad de la misma. NO DEBE RECHAZARSE LA MUESTRA EN ESTOS CASOS SIN ANTES COMUNICARSE CON EL PERSONAL MÉDICO ENCARGADO. -Muestras recolectadas no estériles.	

-Muestras que presentan incoherencias en la rotulación. - Hisopos con medio de transporte en gel.
Observaciones
--Todas estas muestras oculares deben ser tomadas por el oftalmólogo capacitado. -De ser posible, el micólogo o personal de laboratorio encargado, debe estar al momento de la toma de muestra, para asegurar la calidad preanalítica y transporte de la muestra. -Es altamente recomendable conocer datos sobre el diagnóstico, historial médico, condiciones subyacentes y tratamiento actual del paciente. Además, la historia clínica es especial relevancia, aspectos como viajes, actividades laborales o recreativas, contacto con animales u otros, pueden ser sumamente útiles para guiar el diagnóstico. Por tanto, se sugiere una estrecha comunicación con el médico tratante y/o acceso a las notas clínicas del expediente del paciente. -En el caso de estas muestras su procesamiento debe ser de manera preferencial el mismo día, en condiciones ideales dentro de las dos primeras horas, para obtener óptimos resultados en la identificación y recuperación de agentes etiológicos, ya que la demora en el procesamiento de estas muestras puede resultar en un crecimiento excesivo de contaminantes bacterianos e impedir la recuperación de patógenos fúngicos (1,2). -Debido a la naturaleza de las lesiones oculares, **una baja cantidad de muestra no constituye un criterio de rechazo,** sin embargo, debe priorizarse la detección de especímenes (bacterianos, fúngicos, etc) por tanto, se enfatiza en la comunicación con el médico tratante para el adecuado procesamiento de la muestra.
Recipiente indicado para la recolección
- Hisopos compactos secos estériles, para recolección de material purulento conjuntival -Tubos estériles sin aditivos o recipientes estériles con tapa con 1 - 5 mL de solución salina para recolección de córneas, conjuntivas u otros tejidos oculares.
Condiciones de transporte
-Transportar la muestra obtenida al laboratorio inmediatamente después de recolectada. Idealmente, no deberían pasar más de dos horas entre la recolección y el transporte, en casos especiales por distancia máximo 24 horas. -Durante el transporte la muestra debe ser mantenida a temperatura ambiente.

FASE ANALÍTICA

Consideraciones generales de procesamiento de muestras oculares (3,4)

- Por lo general, en el caso de muestras oculares, la toma la realizará el personal médico oftalmológico y al laboratorio le corresponderá la debida observación del examen directo y la incubación de cultivos.

- En el caso de lavados o fluidos intraoculares que contengan un volumen considerable de muestra, es preferible centrifugar (10 minutos a 1500 - 2000 g), y sembrar los sedimentos (resuspendido en menos de 2 mL con el fluido remanente) en el SDA o SGC.

Cuadro 6.1 Equipos e insumos requeridos

Activos base	Analizadores base	Analizadores adicionales
Cámara de bioseguridad Incubadora a 30 °C (o caja en un cuarto a temperatura ambiente en su defecto) Vortéx	Microscopio de luz, con objetivos de 10X o 20X, 40X y 100X Sistema automatizado para ID	Sistema MALDI-TOF[1] Microscopio de fluorescencia[1]
Medios de cultivo	**Insumos**	**Pruebas complementarias**
Agar Sabouraud con antibióticos (SGC)[2] Agar Sabouraud glucosado (SDA)	Hisopo seco Espátula estéril Asa micológica y bacteriológica. Portaobjetos Cubreobjetos KOH 10 - 20 % Mechero Bunsen o lámpara de alcohol[3] Azul lactofenol o lactofenol claro Placa de Petri estéril Bisturí Hojas de bisturí	Blanco de calcofluor[1]

1. Según la disponibilidad en el centro de salud
2. Se recomienda la utilización de este medio sobre el SDA ya que evita el crecimiento de bacterias que pueden afectar la recuperación del hongo, esto aplica a zonas no estériles.
3. Si no cuenta con Cámara de bioseguridad, puede utilizar un mechero bunsen o una lámpara de alcohol.

Recolección de la muestra para diagnóstico micológico (3,4):

1. Para muestras de **humor vítreo o fluidos oculares**: recolectar por aspiración, transportar en la misma jeringa sin aguja, inmediatamente, ya que en la mayoría de los casos se trata de un bajo volumen de muestra y podría perderse al pasarse a otro recipiente. En su defecto, aspirar solución salina 0.5 % con la jeringa con muestra y pasar a recipiente estéril.
2. Para las muestras de **raspado de córnea**: proveer al oftalmólogo de un kit que contenga: un SDA (de preferencia suplementado con antibióticos SGC), un agar Chocolate y un agar Sangre, además dos portaobjetos.
3. Instruir al médico en la inoculación de los medios y la realización del frotis. Inocular los medios por estría (2 o 3 veces) delicadamente sin cortar el agar. El orden de inoculación de los medios debería ser priorizado según la sospecha clínica (bacteriana o fúngica) pues en la mayoría de los casos el material obtenido es poco y la práctica es bastante invasiva.
4. Colocar los frotis en el centro de la lámina por el lado biselado, al ser tan escasa muestra se recomienda realizar una marca con lápiz de cera en el sitio donde se colocó la muestra para su posterior observación. Todo el material debe encontrarse debidamente rotulado y una vez concluida la toma, llevarlo cuanto antes al laboratorio.

Nota: En los raspados de córnea, si bien se prefiere no aplicar anestésicos para conservar la calidad de la muestra y evitar dificultad de crecimiento en cultivo, al ser una muestra incómoda y de difícil obtención, el uso de estos es por lo general imprescindible. Por tanto, se recomienda mantener los cuidados adecuados en el procesamiento de estas.

5. Para muestras de **conjuntivas**: muestrear ambos ojos por separado (aunque solo uno esté infectado) antes de aplicar anestésicos. Esto para que el cultivo de ojo no

infectado sirva de control y comparación de aislamientos obtenidos. Práctica recomendable, si no es posible, solo muestrear el ojo lesionado.

Procesamiento de la muestra para diagnóstico microbiológico (3,4):

Examen directo

1. Realizar tinción con Giemsa de los frotis recibidos de la toma de muestra de úlcera corneal o los realizados de los fluidos oculares, material exudativo o córneas. Se prefiere la Tinción de Giemsa, aunque podría usarse otras tinciones como Gram o simples con azul de metileno e incluso KOH 20 %, pero la observación puede resultar más difícil.
2. Observar en bajo poder al microscopio para la observación de posibles hifas y en alto poder para observar con más detalle las estructuras o la presencia de blastosporas.
3. Realizar el examen directo con blanco de calcofluor, en caso de contar con los recursos: colocar una gota sobre el frotis preparado, cubrir con un cubreobjetos y observar en microscopio de fluorescencia, primero en bajo poder y luego en alto poder para analizar estructuras sugestivas.

Nota:

- Los hongos se pueden visualizar en microscopio de luz estándar, sin embargo, es importante tomar en cuenta que las células y detritus pueden generar falsos negativos, ya que pueden enmascarar la presencia de un hongo.
- Las muestras siempre deben de ser observadas en primera instancia en microscopio de luz, para observar si las estructuras fúngicas en la muestra son de aspecto hialino o fuliginoso, ya que estos últimos no se observan en tinciones fluorescentes.

- Es importante mencionar que se pueden formar artefactos en el KOH, en especial la formación de estructuras que simulan a blastosporas, por lo que las tinciones fluorescentes ayudan a confirmar estos hallazgos.

Cuadro 6.2 Resultados que se pueden obtener al visualizar examen directo

Estructura observada en examen directo	Cuadro clínico sugestivo
Micelio hialino septado	Queratitis por hongos filamentosos hialinos
Micelio fuliginoso septado	Queratitis por hongos filamentosos fuliginosos
Blastosporas y/o pseudomicelio	Queratitis por hongos levaduriformes
Micelio cenocítico (hifas gruesas dicotómicas sin septos)	Queratitis por hongos mucorales

Cultivo de las muestras (3,4):

Inoculación

1. Revisar la integridad de la muestra y la correspondencia entre la identificación de la muestra y la solicitud enviada.
2. Rotular las placas en la base (y no en la tapa) con los datos del paciente, al menos número de cédula, número de muestra, nombre del paciente y fecha del cultivo.
3. Una vez recibidas las placas inoculadas con la muestra (en el caso de úlceras corneales) sellar con cintas de celulosa o Parafilm (una sola tira alrededor de la placa). Pasar al punto 8.
4. Si corresponden a **fluidos intraoculares:** sembrar directamente en el agar con una buena cantidad de material (250 a 500 µL), colocar en el centro de la placa y rayar en tres direcciones sin tocar los bordes del medio.
5. En caso de que el material recibido sea de un tamaño más grande, por ejemplo, en una córnea completa, cortar la muestra antes de sembrar, para exponer mejor los microorganismos: en una placa de Petri estéril con unas gotas de solución salina o agua estéril, verter la muestra y cortar en pedacitos pequeños con un bisturí estéril. No se debe macerar.

6. Inocular los fragmentos dentro del SDA o SGC, la cantidad de inóculos depende de la abundancia del material.
7. Sellar las placas con cinta permeable de celulosa o Parafilm (una sola vuelta alrededor de la placa es suficiente) para evitar la desecación del agar o una infestación de ácaros.
8. Incubar a 30 °C por al menos 3 semanas, con revisiones semanales y especial cuidado si el examen directo de la muestra resulta positivo. En casos muy sugestivos conviene esperar hasta 5 semanas.

Tiempo de incubación (3):

Las placas se deben incubar por tres semanas.

Lectura de placas (3):

Cuadro 6.3 Tiempos de lectura de placas de cultivo por hongos	
Lectura	**Observaciones**
• Dos veces a la semana la primera semana • Una vez por semana durante 3 semanas	Para que un aislamiento sea considerado de importancia debe mostrar crecimiento sobre el sitio de inoculación en el agar. Y por lo general, se trata de lesiones con un solo aislamiento.

FASE POSTANALÍTICA

Análisis e interpretación de cultivos

- Es importante determinar qué es lo que está crecimiento en la placa y diferenciar contaminantes y patógenos.
- Se debe de observar el crecimiento del hongo a partir del sitio de inoculación realizado, de lo contrario el crecimiento debe de considerarse como un posible contaminante.

- Es importante tomar en cuenta la clínica del paciente y el resultado del examen directo al momento de analizar los cultivos.

Características macroscópicas

Tomar en consideración:

1. Producción de pigmento en la placa.
2. Color de la colonia.
3. Aspecto de la colonia (algodonosa, pulverulenta, harinosa, entre otros).
4. Tiempo de incubación.

Características microscópicas

- Una vez que se tenga una colonia sospechosa realizar el montaje en azul de lactofenol o lactofenol claro para proceder a la identificación microscópica.
- Se puede realizar el montaje utilizando cinta adhesiva o con el asa entre porta y cubre, intentando no alterar las estructuras fúngicas, para poder así visualizar las características microscópicas de cada género.

Estas técnicas se encuentran descritas con mayor claridad en el Módulo 1 de este Manual.

Los principales aislamientos obtenidos en este tipo de muestra se resumen en el cuadro siguiente:

Cuadro 6.4 Principales microorganismos aislados de cultivos oculares

Grupo	Microorganismos
Blastosporas	*Candida* spp. *Cryptococcus* spp. *Trichosporon* spp.
Filamentosos	**Hialinos**

	Fusarium spp. *Paecilomyces* spp. *Acremonium* spp. *Aspergillus* spp. *Penicillium* spp. *Sedosporium* spp. *Cylindrocarpon* sp. *Verticillium* spp.
	Fuliginosos
	Alternaria spp. *Curvularia* spp. *Phialophora* spp. *Bipolaris* spp. *Cladosporium* spp. *Drechslera* spp.
Cenocíticos	orden Mucorales *(Rhizophus* spp.*, Mucor* spp.*, etc)*

- Si se obtiene crecimiento de hongos levaduriformes se procede a identificarlos por métodos bioquímicos, proteínicos o moleculares, según el alcance en el sitio de trabajo: sistemas de identificación automatizados bioquímicos, Maldi-Tof, paneles moleculares (PCR, sondas de hibridación, etc). Siguiendo la metodología de montaje en cada caso.
- Si son hongos filamentosos, realizar montaje de las colonias en azul de lactofenol o lactofenol claro según corresponda por el tipo de colonia. Revisar la morfología macro y microscópica para llegar a una identificación de especie, o género al menos. Pueden usarse claves dicotómicas de identificación de la literatura.
- Si el crecimiento inicial no tiene estructuras de reproducción que permitan su identificación, pueden realizarse subcultivos a medios poco enriquecidos como agar Avena o agar Papa dextrosa. O el uso de medios cromogénicos como en el caso de *Candida* spp. (referirse al Módulo 1)

Reporte de resultados

Reporte de examen directo

1. Si el examen directo está positivo reportar según las características observadas:
   a. **"Se observa micelio hialino septado".**
   b. **"Se observa micelio fuliginoso septado".**
   c. **"Se observan blastosporas y/o pseudomicelio".**

2. Si al examen directo no se observan estructuras fúngicas, reportar:

   a. **"No se observan estructuras fúngicas"**

Reporte de cultivo

1. Si el cultivo está negativo y el examen directo está negativo, reportar:
   a. "**Cultivo negativo por hongos."**
2. Si se logra aislar el agente causal e identificarlo, reportar:
   a. **"Positivo por (género y especie) o sólo género."**
3. Si se logra aislar varios agentes causales e identificarlos, reportar:
   a. **"Positivo por (género y especie) o sólo género (género y especie) o sólo género."**
4. Si el cultivo está negativo y el examen directo está positivo, reportar:
   a. **"No se obtuvo crecimiento del agente causal."**
5. Si se observa crecimiento de 1 o más microorganismos que se consideran que no son de importancia clínica, reportar:
   a. **"Cultivo negativo por hongos."**

REFERENCIAS

1. Bonifaz A. Micología Médica Básica. 6ta ed. Ciudad de México: McGraw-Hill interamericana editores; 2020.
2. Arenas R. Micología Médica Ilustrada. 6ta ed. España: Mcgraw-Hill Interamericana de España S.L.; 2019.
3. Wengenack NL. CLSI M54 Principles and Procedures for Detection and Culture of Fungi in Clinical Specimens. 2da ed. Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI); 2021.
4. Leber AL (Ed.). Clinical Microbiology Procedures Handbook. 4ta ed. Washington, D.C.: American Society for Microbiology (ASM); 2024.

Módulo 7: Diagnóstico micológico de muestras de mucosas

FASE PREANALÍTICA

Solicitud de análisis: Cuadros clínicos asociados

Este análisis se envía a pacientes que presenten lesiones en las mucosas. Los tipos de lesiones pueden variar dependiendo del agente causal. Por ejemplo, *Candida albicans* es microbiota normal de mucosas; sin embargo, en ciertas circunstancias puede causar infecciones, que atacan al ser humano; su nivel de profundidad y gravedad no depende tanto del agente etiológico en sí, sino del factor de predisposición con el que se asocie (1,2,3).

A continuación, se detallan los cuadros clínicos asociados a mucosas (1):

Cuadro 7.1 Cuadros clínicos asociados a mucosas.

Enfermedad	Agente causal	Aspectos clínicos
TRACTO GENITAL		
Vaginitis candidósica	*C. albicans* *Nakaseomyces glabratus* (*Candida glabrata)* *Pichia krudriavzevii* (*Candida krusei*) *Candida tropicalis*	Más común en la edad reproductiva, se puede ver en niñas recién nacidas. La vulvovaginitis se puede presentar en la pubertad y en embarazadas. En adultas mayores se atribuye a enfermedades como la diabetes y antibioticoterapia. La clínica incluye abundante exudado blanquecino (leucorrea), espeso, grumoso, no fétido (a diferencia de vaginosis baterianas). Pocos son los casos que se diseminan hacia el tracto urinario.
Balanitis o balanopostitis candidósica	*C. albicans* *N. glabratus* (*C. glabrata*) *P. krudriavzevii* (*C. krusei*) *C. tropicalis*	La mayor parte de los casos se presenta como consecuencia de relaciones sexuales con una pareja que cursa con vaginitis por *Candida*, o con una flora incrementada. Frecuente en diabéticos o inmunosuprimidos. La clínica incluye placas de eritema, micropústulas, erosiones y fisuras; leucoplacas a través de todo el glande y surco balanoprepucial, cursa con prurito moderado, que luego se transforma en ardor intenso.

CAVIDAD ORAL		
Candidosis mucocutánea oral	*Candida* spp. y géneros afines	Algodoncillo, trush o muguet: Frecuente en recién nacidos por la falta de regulación de pH. En los adultos se manifiesta ya sea de forma aguda o crónica, en diabéticos o después de tratamientos antibacterianos prolongados.
Candidosis oral aguda		
Pseudomembranosa.	*Candida* spp. y géneros afines	Se presenta en lengua (glositis), puede afectar también encías, paladar o invadir toda la boca (estomatitis). Son placas pseudomembranosas, cremosas y blanquecinas, con fondo eritematoso, que simulan restos de leche o crema.
Atrófica aguda	*Candida* spp. y géneros afines	Se presenta más en lengua y en menor grado en paladar, en pacientes bajo antibioticoterapia prolongada; son zonas eritematosas, erosionadas, en ocasiones con un velo blanquecino.
Candidosis oral crónica		
Hiperplásica o "lengua vellosa".	*Candida* spp. y géneros afines	Se presenta en los bordes laterales de la lengua y en la mucosa yugal (revestimiento interno de las mejillas). En raras ocasiones puede producir una parasitación negra, a lo que se denomina "lengua negra vellosa"; ésta se observa con más frecuencia en pacientes con HIV-SIDA o en fumadores.
Queilitis angular	*Candida* spp. y géneros afines	Se presenta en los labios a nivel de las comisuras, constituido por placas eritemato-escamosas y erosionadas. A partir del foco bucal puede continuar hacia la faringe, laringe, esófago, tráquea, etc.
Crónica atrófica o estomatitis subplaca	*Candida* spp. y géneros afines	Se presenta una sola placa, eritematosa, en pacientes con prótesis mal adaptadas, en los bordes laterales de la lengua y en la mucosa yugal (revestimiento interno de las mejillas), y es común en pacientes con HIV-SIDA.
Causas diferentes a Candida spp.		
Lesión en cavidad oral	*Paracoccidioides* spp.	Se presenta en boca, clásica estomatitis moriforme, las lesiones toman el aspecto de una mora.
Lesión en cavidad oral	*Histoplasma capsulatum*	Se presentan úlceras orales.

Diagnóstico diferencial

- **Candidosis mucocutánea oral:** estomatitis aftosa, lengua saburral, herpes, lengua geográfica, geotricosis, leucoplasia vellosa (1).
- **Vulvovaginitis:** infecciones por *Trichomonas vaginalis, Gardnerella vaginalis, Neisseria gonorrhoeae* y vaginosis bacteriana (1).
- **Balanitis**: balanitis inespecíficas, herpéticas, luéticas, por *T. vaginalis* y por *N. gonorrhoeae* (1).

Muestras clínicas, transporte y conservación

Tabla Resumen. Información requerida para el procesamiento	
Datos del paciente	-Nombre completo, número de identificación, sexo y fecha de nacimiento. -Posible diagnóstico o cuadro clínico. -Fecha de inicio de síntomas. -Terapia recibida. -Lugar de procedencia.
Datos de la muestra	-Fecha y hora de la toma de muestra. -Técnica de obtención de la muestra. -Sitio de la toma de muestra. -Tipo de muestra. -Servicio que envía la muestra. -Responsable de la toma de muestra.
Muestras clínicas indicadas	
-Las muestras se recolectan en dos hisopos flocados, humedecidas con solución salina, idealmente utilizar AMIES líquido[1]. -Sospecha de *Histoplasma capsulatum o Paracoccidioides spp*: Material escamoso de la lesión, material fistuloso tomado por aspiración por aguja fina, biopsia.	
Criterios de rechazo	
-Muestras que su rotulación sea inadecuada o no coincida con los datos de la orden médica. -Muestras que no estén rotuladas. -Paciente que haya consumido antifúngico en los últimos 15 días. -Paciente que esté tomando tratamiento antifúngico.	

-Hisopos secos y aquellos con medios de transporte incorrectos (por ejemplo, medios de transporte anaeróbicos o virales). -Muestras con más de 72 horas de recolectadas.
Observaciones
-Si se reciben muestras que no son aceptables por cualquier motivo, deben rechazarse y se debe notificar a los médicos correspondientes. -Siempre que sea posible, para aumentar la probabilidad de recuperación de un organismo fúngico, la muestra debe recolectarse antes de administrar un agente antimicótico. -En el caso de estas muestras su procesamiento debe ser de manera preferencial el mismo día, en condiciones ideales dentro de las dos primeras horas, para obtener óptimos resultados en la identificación y recuperación de agentes etiológicos, ya que la demora en el procesamiento de estas muestras puede resultar en un crecimiento excesivo de contaminantes bacterianos e impedir la recuperación de patógenos fúngicos (1,2).
Recipiente indicado para la recolección
-Sistema de transporte de hisopo flocado
Condiciones de transporte
-Sistema de transporte de hisopo flocado -Las muestras deben transportarse inmediatamente al Laboratorio Clínico en el contenedor en el cual se recolectó, a temperatura ambiente donde se permita mantenerla en condiciones adecuadas de humedad. -Si se prevé una demora prolongada, las muestras deben almacenarse a 4 °C. Las blastosporas pueden soportar temperaturas de refrigeración normales.

1. Los hisopos flocados son aceptables para el examen directo, cultivo y la tinción de Gram.

FASE ANALÍTICA

Consideraciones generales de procesamiento muestras de mucosas

Es importante trabajar las muestras en un ambiente aséptico para evitar la contaminación con hongos ambientales. Se recomienda el procesamiento en cámara de flujo laminar o con mechero, de ser posible utilizar cubrebocas y no hablar encima de las muestras para no contaminarlas.

Cuando se envían muestras de mucosas con sospecha de micosis, el material enviado o tomado, por ejemplo hisopos, deben ser exclusivos para el estudio por hongos. La muestra

no debe ser compartida para otros análisis como bacterianos. Esto por el riesgo de que la muestra resulte insuficiente.

Equipos e insumos requeridos

Cuadro 7.2 Equipos e insumos requeridos para análisis de infecciones en mucosas		
Activos base	**Analizadores base**	**Activos adicionales**
Cámara de bioseguridad Incubadora a 30 °C (o caja en un cuarto a temperatura ambiente en su defecto)	Microscopio de luz, con objetivos de 10X, 20X, 40X y 100X Sistema automatizado para ID y PSA	Sistema MALDI-TOF[1] Microscopio de fluorescencia[1]
Medios de cultivo	**Insumos**	**Pruebas complementarias**
Agar Sabouraud glucosado (SDA) Agar Sabouraud con antibióticos[2] (SGC) Agar Sabouraud con antibióticos y cicloheximida (MYC)	Portaobjetos Cubreobjetos KOH 10 - 20 % Mechero Bunsen, Lámpara de alcohol[3] Hisopos con medio de transporte Asas bacteriológicas Bisturí Hojas bisturí Alcohol 70 % Cuadros de gasa estéril	Tinción de Giemsa Blanco de Calcoflúor

1. Según la disponibilidad en el centro de salud.
2. Se recomienda la utilización de este medio sobre el SDA ya que evita el crecimiento de bacterias que pueden afectar la recuperación del hongo, esto aplica a zonas no estériles.
3. Si no cuenta con Cámara de bioseguridad, puede utilizar un Mechero bunsen o una lámpara de alcohol.

Recolección de la muestra para diagnóstico micológico

1. Verificar que los datos personales de la solicitud de análisis micológico correspondan con los datos de la muestra enviada (en el caso de muestras de tracto genital).

2. Revisar que la muestra enviada venga en el medio de transporte adecuado (en el caso de muestras de tracto genital), en un recipiente estéril a temperatura ambiente.

3. Utilizar 2 torundas estériles, humedecidas con solución salina, proceder a pasarlas suavemente, pero con firmeza sobre la región afectada en cavidad oral.

4. En raras ocasiones, se pueden observar lesiones orales en caso de histoplasmosis y paracoccidioidomicosis, pero no se parecen a las observadas en *Candida* spp. Si observa úlceras en cavidad oral, raspar cuidadosamente con un bisturí sin filo. Se puede utilizar hisopos flocados con solución salina estéril. Sembrar de inmediato como se describe más adelante.

Procesamiento de la muestra para diagnóstico microbiológico

Examen directo:

Poner sobre el portaobjetos una gota de KOH 10 - 20 %, sobre este utilizando el hisopo enviado coloque la muestra clínica y encima ponga un cubreobjetos (si tiene a disposición puede usar blanco de calcoflúor).

También se puede realizar un frotis delgado en portaobjetos limpio del material recolectado con la torunda y realizar una tinción como Gram o Giemsa.

Estas técnicas se encuentran descritas con mayor claridad en el Módulo 1 de este Manual.

Se pueden obtener los siguientes resultados:

Cuadro 7.3 Resultados que se pueden obtener al visualizar KOH

Estructura observada KOH	Cuadro clínico sugestivo
Con el objetivo de alto aumento se observará: blastosporas de 2 - 7.5 µm ovaladas o redondeadas, gemantes con pared delgada, sin cápsula, acompañadas o no de pseudomicelio y micelio.	Candidiasis de mucosas

Observación de blastosporas multigemantes con base de implantación puntiforme. Se puede observar células levaduriformes de diversos tamaños, blastosporas en forma de timón de barco y de aspecto de “Mickey Mouse”	Paracoccidioidomicosis

*Si hay sospecha de histoplasmosis en lesiones de cavidad oral se debe realizar una tinción de Giemsa para observar blastosporas intracelulares.

Cultivo de las muestras:

Inoculación

1. Dejar que el medio alcance la temperatura ambiente, secar para eliminar el exceso de humedad de la superficie previo a la inoculación de las muestras.
2. Rotular una placa de agar SGC (SDA en su defecto) y otra de MYC con los datos del paciente, por el reverso a una orilla de placa, con el fin de poder ver el crecimiento colonial al reverso.
3. Rayar en 3 o 4 zonas con un asa microbiológica para obtener colonias separadas de *Candida* spp.
4. Sellar con cinta permeable de celulosa o Parafilm para evitar se sequen o sufran de una infestación de ácaros.
5. Incubar a 30 ± 2 °C en un ambiente aerobio durante 2 semanas.
6. Si observa úlceras en cavidad oral, y hay sospecha de paracoccidioidomicosis e histoplasmosis, lo ideal es realizar 20 inóculos en la parte central de cada medio de cultivo, pero por la dificultad de esta muestra, inocular la mayor cantidad de inóculos posibles.

Tiempo de incubación

- Si se sospecha de candidiasis y criptococosis las placas se deben incubar por 2 semanas, aunque suelen crecer en los 3 primeros días de incubación

- Si se sospecha de paracoccidioidomicosis o histoplasmosis las placas se deben incubar por 4 semanas, pues el crecimiento es más lento.

Lectura de placas

Cuadro 7.4 Tiempos de lectura de placas de cultivo por hongos	
Lectura (4)	**Observaciones**
Para candidiasis y criptococosis: ● Dos veces a la semana la primera semana ● Una vez por semana durante 1 semana	Para que un aislamiento sea considerado de importancia debe mostrar crecimiento sobre el sitio de inoculación en el agar. Los agares cromogénicos para blastosporas (tracto urogenital) deben incubarse de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.
Para paracoccidioidomicosis e histoplasmosis: ● Dos veces a la semana la primera semana ● Una vez por semana durante 4 semanas	Para que un aislamiento sea considerado de importancia debe mostrar crecimiento sobre el sitio de inoculación en el agar. Estos cultivos deben tratarse bajo condiciones de bioseguridad estrictas, abrir únicamente en cámara de flujo.

FASE POSTANALÍTICA

Interpretación del cultivo

Es importante determinar la identidad del crecimiento en las placas y diferenciar entre hongos contaminantes y patógenos. Es importante tomar en cuenta la clínica del paciente y el resultado del examen directo al momento de analizar los cultivos.

Para la identificación morfológica de los hongos se deben de buscar las características tanto macroscópicas como microscópicas del hongo.

Características macroscópicas

Tomar en consideración:

1. Producción de pigmento en la placa.

2. Color de la colonia.
3. Aspecto de la colonia (algodonosa, pulverulenta, harinosa, entre otros).
4. Tiempo de incubación.

Características microscópicas

Realizar el montaje de colonias sospechosas en azul de lactofenol o lactofenol claro según sea el caso.

Se puede realizar el montaje utilizando cinta adhesiva o con el asa entre porta y cubre, intentando no alterar hongo para poder visualizar las características microscópicas.

Cuadro 7.5 Características Macroscópicas y microscópicas del agente causal más común que produce lesiones en mucosas

Agente causal	Características macroscópicas
Blastosporas	*Candida* spp.
Hongos dimórficos	*Histoplasma capsulatum* *Paracoccidioides* spp.

Para la identificación de especies de *Candida* spp. se deben realizar pruebas bioquímicas con sistemas automatizados. Recordar que si se obtiene un aislamiento a partir de medios cromogénicos se debe realizar un subcultivo en un medio no selectivo, por ejemplo, SDA, antes de realizar pruebas bioquímicas. **Se recomienda realizar PSA a todos los aislamientos, principalmente en casos de candidiasis vaginal a repetición. Reportar solamente la sensibilidad a Fluconazol.**

Tomando en cuenta la Alerta: Aislamientos resistentes a azoles en Candidiasis vulvovaginales, junio 2022 a octubre 2023, Costa Rica, emitida por el Centro Nacional de Referencia de Bacteriología (CNRB) se debe **determinar la especie y la sensibilidad a los antifúngicos de los cultivos vaginales positivos**, y en caso de que el aislamiento presente resistencia a azoles, enviar al INCIENSA para su confirmación de sensibilidad. El aislamiento debe acompañarse con la boleta Inciensa-R86: Solicitud de Confirmación Diagnóstica, completa con los datos clínico-epidemiológicos que en ella se solicitan (5). La

misma puede ser descargada en la página web de la institución (https://www.inciensa.sa.cr/inciensa/Formularios.aspx).

En el caso de criptococosis al trabajar en sistemas automatizados bioquímicos este no discrimina *C. neoformans* de *C. gattii* por lo que se debe corroborar la especie en MALDI-TOF. Si en su centro de salud no cuenta con dicho insumo diríjase al hospital Clase A más cercano que le pueda ayudar con dicha identificación.

En el caso de Paracoccidioidomicosis recuerde que el examen directo es diagnóstico de la enfermedad (2).

RECORDAR QUE LOS PATÓGENOS PRIMARIOS NUNCA DEBEN SER CONSIDERADOS CONTAMINANTES, INDEPENDIENTEMENTE DE SI SE OBSERVAN O NO EN EL EXAMEN DIRECTO.

Reporte de resultados

Reporte de examen directo

1. En el examen directo reportar según las características observadas:
    a. **“Se observan blastosporas gemantes, pseudomicelio o micelio”**
    b. **“Se observan blastosporas multigemantes semejantes a *Paracoccidioides* sp.”**
    c. **“Se observan blastosporas intracelulares semejantes a *H.capsulatum”***
2. Si al examen directo no se observan estructuras fúngicas, reportar:
    a. “No se observan estructuras fúngicas”

Reporte de cultivo

1. Si el cultivo está negativo y el examen directo está negativo, reportar:
    a. **“Cultivo negativo por hongos”**
2. Si se logra aislar el agente causal e identificarlo, reportar:
    a. **“Cultivo positivo por (género y especie) o sólo género*”**

*Si el aislamiento corresponde a una especie de *Candida*, se recomienda realizar la PSA reporte solamente la sensibilidad a Fluconazol, en los casos de vaginitis.

3. Si se logra aislar varios agentes causales e identificarlos, reportar:
    a. **"Positivo por: (género y especie) o sólo género**

    (género y especie) o sólo género"
4. Si el cultivo está negativo y el examen directo está positivo, reportar:
    a. **"No se obtuvo crecimiento del agente causal"**
5. Si se observa crecimiento de 1 o más microorganismos que se consideran que no son de importancia clínica, reportar:
    a. **"Cultivo negativo por hongos"**

REFERENCIAS

1. Bonifaz A. Micología Médica Básica. 6ta ed. Ciudad de México: McGraw-Hill interamericana editores; 2020.
2. Gross N, Salas Campos I. Métodos diagnósticos en Micología Médica. 1ra ed. 2da reimpresión. San José, Costa Rica: Editorial UCR; 2015.
3. Arenas R. Micología Médica Ilustrada. 6ta ed. España: Mcgraw-Hill Interamericana de España S.L.; 2019.
4. Wengenack NL. CLSI M54 Principles and Procedures for Detection and Culture of Fungi in Clinical Specimens. 2da ed. Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI); 2021.
5. Cob M. Aislamientos resistentes a azoles en Candidiasis vulvovaginales. Junio 2022 a octubre 2023. INCIENSA. 2023.

Módulo 8: Diagnóstico micológico de infecciones subcutáneas

FASE PREANALÍTICA

Solicitud del análisis: Cuadros clínicos asociados

Las micosis subcutáneas, también conocidas como micosis de implantación son infecciones fúngicas que se asocian por lo general a traumatismo con un cuerpo extraño en la dermis o en el tejido subcutáneo. El agente causal puede encontrarse también en el suelo, en vegetación en descomposición. Puede afectar músculo, tejido conectivo e inclusive hueso. El contacto inicial con el agente etiológico se da a través de una herida o por punción traumática. En general se considera que las infecciones subcutáneas son principalmente ocupacionales, cosmopolitas y en algunos casos pueden ser zoonóticas, Con excepción de ciertas poblaciones la diseminación hematógena no suele ocurrir (1).

Cuadro 8.1 Descripción de los tipos de muestra clínicas recolectadas en las infecciones subcutáneas

Cuadro clínico	**Descripción de la lesión** (2,3)	**Tipo de muestra recolectada** (2,3,4)
Cromoblastomicosis	Inicia como una lesión pequeña de aspecto papular que se extiende y forma capas eritemato escamosas de bordes irregulares y bien definidos semejantes al inicio con tiña corporis. Al pasar de los meses la lesión puede verse de aspecto verrugoso, vegetante, cubierto de escamas, con úlceras y costras sanguinolentas que pueden adoptar aspecto de coliflor. Las lesiones también pueden verse aplanadas y superficiales. Puede haber lesiones satélites. Observación de múltiples “puntos negros” dentro de la zona en estudio, que corresponden a los talos fumagoides.	-Material de las lesiones tomadas con bisturí sin filo. -Biopsia tomada por el personal médico. -Ocasionalmente algún tipo de material purulento.

Esporotricosis	**Cutánea linfática:** inicia como un chancro esporotricósico, con aumento de volumen, eritema y lesiones nodosas gomosas, también hay úlceras. En término de días recorre los vasos linfáticos. **Cutánea fija:** en Costa Rica se reporta como una forma frecuente. Lesión única, vegetante o verrugosa, de bordes definidos, con halo eritematoso-violáceo, a su vez está cubierta por escamas y costras melicéricas. Otras formas: cutánea superficial, cutánea diseminada o pulmonar.	-Material de las lesiones tomadas con bisturí sin filo. -Biopsia tomada por el personal médico. -Material purulento o fistuloso.
Feohifomicosis	Las lesiones varían, desde formas nodulares a formas cicatrizales con descamación y/o algo de secreción.	-Material escamoso de la lesión. -Material fistuloso tomado por aspiración por aguja fina. -Biopsia.
Hialohifomicosis	Las lesiones varían, desde formas nodulares a formas cicatrizales con descamación y/o algo de secreción.	-Material escamoso de la lesión. -Material fistuloso tomado por aspiración por aguja fina. -Biopsia.
Micetoma verdadero o eumicetoma	Zona afectada con aumento de volumen y deformidad de la región. Lesiones nodulares fistulizantes donde se pueden observar los granos macroscópicos.	-Material de la fístula con grano -Biopsia por tejido para micetomas sin fístula. -Aspirado de la lesión por aguja fina cuando la lesión está cerrada. -Raros casos pueden recurrir al lavado broncoalveolar, en

		infecciones respiratorias conjuntas.
Lacaziosis	Lesiones se presentan como nódulos cerrados, de aspecto queloide bien delimitados, no eritematosos y duros a la palpación.	-Biopsia tomada por el personal médico.
Paracoccidioidomicosis	Lesiones ulcerativas en piel y mucosas.	-Material escamoso de la lesión. -Material fistuloso tomado por aspiración por aguja fina. -Biopsia.
Histoplasmosis	Lesiones de aspecto ulcerativo, pueden ser diseminados o localizados, algunas con base eritematosa y cubiertas de exudado blanco-amarillento. No hay lesiones patognomónicas. Otro aspecto posible es el moluscoide.	-Raspado de la lesión -Biopsia. **Nota**: se debe buscar otros sitios de infección: sangre periférica, médula ósea, pulmón, otros.
Criptococosis	Lesiones de aspecto variable, secas, formas ulcerativas, crateriformes, localizadas o diseminadas. Puede ser también de aspecto moluscoide o acneiforme. No existe una lesión elemental que oriente el diagnóstico.	**Nota**: se debe buscar otros sitios de infección: sangre periférica, sistema nervioso central, pulmón, otros.
Mucormicosis	En piel se puede observar como una lesión única, ulcerativa, de aspecto necrótico y de avance rápido. Puede haber exudado fétido negruzco Puede iniciar como fístula palpebral única, con necrosis en párpado y áreas adyacentes.	-Raspado de la lesión -Secreción de las fístulas Biopsia **Nota**: las lesiones pueden aparecer posterior a un evento traumático o asociadas a estado de inmunosupresión.

Otras patologías no fúngicas	Descripción de la lesión	Tipo de muestra recolectada
Actinomicetoma	Lesiones edematosas, fistulizantes, con lesiones satelitales, dolorosas.	-Material fistuloso tomado por aspiración por aguja fina. -Material purulento tomado de las fístulas que drenan del nódulo abierto (puede ser con el mismo bisturí) -Biopsia
Actinomicosis	Lesiones crónicas, se presentan en zonas asociadas a cavidad oral y extremidades, lesiones fistulizadas. Puede presentarse en otras zonas del cuerpo (abdomen, tórax, pulmón, inclusive pélvico uterina y cerebral). Pueden observarse granos de pequeño tamaño. Son procesos endógenos.	-Material fistuloso tomado por aspiración por aguja fina. -Material purulento tomado de las fístulas que drenan del nódulo abierto (puede ser con el mismo bisturí) -Biopsia.
Nocardiosis	Se describe foco primario pulmonar, con tendencia a diseminar a SNC, otros órganos incluyendo piel. **Únicamente se observan las bacterias sin granos.**	-Material fistuloso tomado por aspiración por aguja fina, si el nódulo es cerrado. -Material purulento tomado de las fístulas que drenan del nódulo abierto (puede ser con el mismo bisturí) -Biopsia

Diagnóstico diferencial

Al observar las lesiones, se debe de sospechar de cualquiera de los agentes fúngicos mencionados en el cuadro anterior. A su vez, no se deben descartar otros posibles orígenes etiológicos, ya sea infeccioso (bacteriano, micobacterias) o de tipo no infeccioso (asociado a procesos crónicos como diabetes, insuficiencia renal venosa entre otras entidades). En primera instancia el examen directo y el cultivo son importantes para determinar el origen de la lesión que se está estudiando.

Muestras clínicas, transporte y conservación

Tabla Resumen. Información requerida para el procesamiento (5)	
Datos del paciente	-Nombre completo, número de identificación, número de teléfono,sexo y fecha de nacimiento. -Posible diagnóstico o cuadro clínico. -Fecha de inicio de síntomas. -Indicar si ha recibido tratamientos, el nombre del medicamento y el tiempo de administración e indicar la fecha en la cual estuvo en uso. -Lugar de procedencia.
Datos de la muestra	-Fecha y hora de la toma de muestra. -Técnica de obtención de la muestra. -Sitio de la toma de muestra. -Servicio que envía la muestra. -Responsable de la toma de muestra.
Muestras clínicas indicadas	
-Biopsia. -Muestra tomada por aspiración aguja fina. -Muestra tomada en el laboratorio (raspado de la lesión, material de úlcera, material de fístulas, recolección de granos eumicéticos y actinomicéticos).	
Criterios de rechazo	
-Muestras tomadas con hisopo son inaceptables. -Muestras no rotuladas. Se debe seguir la política institucional de manejo de muestras.	

-Muestras enviadas al laboratorio en formalina **no** pueden ser cultivadas. Únicamente se puede realizar el examen directo y se debe indicar que la muestra es inadecuada para cultivo. -Muestras recolectadas en recipientes no estériles. -Muestra enviada en recipiente inadecuado (enviada en recipiente diferente a los proporcionados por el laboratorio). Por ejemplo, frascos de vidrio de uso casero o bolsas plásticas. -Cuando la cantidad de muestras es insuficiente para los exámenes solicitados, se debe contactar al médico para priorizar las pruebas a realizar. -La información de la solicitud no corresponde a la proporcionada en el frasco de muestra. -La muestra es inadecuada por el sitio de toma de muestra enviado.
Observaciones
En el caso de estas muestras su procesamiento debe ser de manera preferencial el mismo día, en condiciones ideales dentro de las dos primeras horas, para obtener óptimos resultados en la identificación y recuperación de agentes etiológicos, ya que la demora en el procesamiento de estas muestras puede resultar en un crecimiento excesivo de contaminantes bacterianos e impedir la recuperación de patógenos fúngicos (1,5). **LOS AISLAMIENTOS DEBEN SER TRABAJADOS EN CÁMARA DE BIOSEGURIDAD POR EL RIESGO DE TRANSMISIÓN AÉREA.**
Recipiente indicado para la recolección
-Frasco estéril de boca ancha con tapa hermética
Condiciones de transporte
-Se debe transportar la muestra al Laboratorio Clínico en 4 horas o menos. Si no es posible, debe conservarse en solución fisiológica estéril al 0.85 %. -Se debe evitar al máximo la refrigeración de la muestra.

Observaciones sobre los criterios de rechazo:

- Sin embargo, las muestras subcutáneas pueden ser de difícil obtención, por lo que se debe realizar la consulta al personal médico antes de descartar la muestra. Se debe notificar por escrito cuál fue el criterio de rechazo (2).

Transporte y conservación de muestras

- Las muestras deben ser enviadas al laboratorio en un recipiente estéril, el cual debe contener solución salina al 0.85 %. Es importante que sea una cantidad adecuada,

dependiendo de la cantidad de tejido, que lo cubra para evitar la desecación. No debe enviarse la muestra con un alto volumen de solución salina.

- Las mismas deben ser de tejido profundo en caso de pacientes con quemaduras y debe enviarse tejido vivo, no debe enviarse al laboratorio tejido necrosado.
- En caso de no poder procesar la muestra de forma inmediata, la misma debe de mantenerse a temperatura de 4 ºC por no más de 8 a 10 horas (si se sospecha de mucorales o entomophthorales las muestras NO deben de refrigerarse).
- Deben de sembrarse inmediatamente. Idealmente el transporte de muestras subcutáneas al Laboratorio Clínico debe ser inmediato y a temperatura ambiente. (4,5).

FASE ANALÍTICA

Consideraciones generales de procesamiento de muestras sospechosas de micosis subcutáneas

- Para que el rendimiento de las pruebas diagnósticas microbiológicas en las muestras de micosis subcutáneas sea óptimo, es esencial una buena colaboración entre el laboratorio de microbiología y el servicio que envía la muestra.
- El microbiólogo clínico debe tener conocimiento básico sobre los posibles agentes etiológicos que pueden encontrarse en este tipo de muestras de piel o tejido.
- El personal médico por su parte debe conocer los procedimientos microbiológicos básicos para seleccionar la muestra adecuada, rotular la muestra con los datos del paciente y del espécimen recolectado y transportar la muestra sin demora al laboratorio. (6)

Equipos e insumos requeridos

Cuadro 8.2 Equipos e insumos requeridos para el procesamiento de muestras sospechosas de micosis subcutáneas

Activos base	Analizadores base	Activos adicionales
Cámara de bioseguridad Incubadora a 30 °C (O caja en un cuarto a temperatura ambiente en su defecto)	Microscopio de luz, con objetivos de 10X o 20X, 40X y 100X	Sistema MALDI-TOF[1] Incubadora a 37 ºC Microscopio de fluorescencia[1]
Medios de cultivo	**Insumos**	**Pruebas complementarias**
Agar Sabouraud glucosado (SDA) Agar Sabouraud con antibiótico[2] (SGC) Agar Sabouraud con antibióticos y cicloheximida (MYC) Agar papa dextrosa[1] (PDA) Otros medios de cultivo según la sospecha clínica (Bacterias o micobacterias)	KOH al 10 - 20 %. Portaobjetos Cubreobjetos. Hojas de bisturí. Bisturí Reactivos para tinción de Gram Reactivos para tinción con derivados de Romanowsky (Wright, Giemsa). Placas de Petri estériles. Guantes	Caldo infusión cerebro corazón para demostración del dimorfismo en caso de ser necesario[1] Técnicas moleculares[1]

1. Según la disponibilidad en el centro de salud
2. Se recomienda la utilización de este medio sobre el SDA ya que evita el crecimiento de bacterias que pueden afectar la recuperación del hongo, esto aplica a zonas no estériles.

Recolección de la muestra para diagnóstico micológico:

- Las muestras se recogerán antes de iniciar el tratamiento antifúngico y la aplicación de anestésicos tópicos, siempre que las condiciones clínicas del paciente lo permitan.

- Si ya se han utilizado antifúngicos, se deben eliminar por lavado con agua o solución salina estéril no fungistática o fungicida.
- La recolección de muestras cutáneas tomadas por biopsia debe ser realizada por el personal médico con las máximas condiciones de asepsia y evitando la contaminación con microbiota comensal y ambiental (2).

Procesamiento de las muestras para diagnóstico micológico

Raspado de la lesión o líquido de fístulas

1. Dejar que el medio alcance la temperatura ambiente, secar para eliminar el exceso de humedad de la superficie previo a la inoculación de las muestras.
2. Rotular una placa de agar SGC (SDA en su defecto) y otra de MYC en la base (y no en la tapa) con los datos del paciente.
3. Previo a la toma de la muestra se debe limpiar la zona de la lesión con alcohol al 70 % y gasa estéril.
4. Si lo que se obtiene de la lesión es líquido de las fístulas o material escamoso, este material debe inocularse en los medios de cultivo, puede tomarse con un bisturí directamente del material purulento que está saliendo de las fístulas.
5. Se debe tomar la muestra de los márgenes activos de la lesión. Idealmente se recomiendan un mínimo de 20 inóculos, pero por la naturaleza de estas lesiones puede ser que este número de inóculos no sea posible de realizar. En todo caso, es importante que obtengamos la mayor cantidad de muestra posible. Es importante colocar la muestra en el centro de las placas, evitando los bordes de las mismas (4).
6. Si al contrario, los nódulos se encuentran cerrados se debe hacer una aspiración con aguja fina (tuberculina 1 mL) y obtener del material purulento. Si la aspiración no es suficiente, del mismo punto de inoculación de la aguja se puede hacer presión en los bordes para extraer el material purulento.

7. Se debe reservar una parte del material para el examen directo de la muestra. Este puede incluir las tinciones como el Gram, un derivado de Romanowsky (Giemsa, Wright), el KOH al 10 % y blanco de calcoflúor.

Muestra de tejido (biopsia)

1. De previo a la inoculación de las muestras clínicas, es importante dejar que el medio alcance la temperatura ambiente, este debe secarse para eliminar el exceso de humedad de la superficie.
2. Rotular una placa de agar SGC (SDA en su defecto) y otra de MYC con los datos del paciente, por el reverso a una orilla de placa, con el fin de poder ver el crecimiento colonial al reverso.
3. Las muestras de biopsia no deben macerarse de forma brusca ya que esto puede ocasionar la ruptura de las estructuras fúngicas, lo que puede llevar a falsos negativos.
4. Colocar el tejido en la placa de Petri, la misma debe tener unas gotas de solución salina estéril si la muestra está muy seca, y con ayuda del bisturí hacer cortes finos del tejido, se puede realizar una delicada maceración del tejido con el mismo bisturí que se está utilizando.
5. Colocar una parte del tejido en los medios de cultivo (SGC y MYC de preferencia) y reservar una parte para el examen directo.
6. No deben inocularse secciones del tejido muy grandes (más grandes que el tamaño de un frijol), inoculando fragmentos pequeños se aumenta la exposición de la muestra al medio de cultivo y se favorece el crecimiento fúngico en las placas. El CLSI recomienda mínimo de 3 a 5 fragmentos del tejido de ser posible (5).
7. Con el material reservado para el examen directo de la muestra se pueden realizar tinciones como Gram, un derivado de Romanowsky, el KOH al 10 % y blanco de calcoflúor, entre otras.

Nota: si existiera la sospecha de histoplasmosis o leishmaniasis se puede macerar la muestra de forma más exhaustiva, para exponer mejor las estructuras que son intracelulares y se favorece también su crecimiento en el cultivo cuando este es cultivable.

Fístulas con presencia de granos actinomicéticos

Si se observan granos microscópicos o granos muy pequeños compuestos por estructuras bacterianas y con clavas se pueden sembrar en SDA y MYC, agar sangre y Lowenstein Jensen (3). **En estos casos es indispensable sembrar una parte de la muestra en anaerobiosis.**

Fístulas con presencia de granos eumicéticos

La probabilidad de que este tipo de lesiones sea polimicrobiana es alta. Se debe reportar el aislamiento de los agentes bacterianos en caso de que se encuentren. Para el procesamiento de los granos eumicéticos estos deben ser previamente lavados antes de ser cultivados (4).

Para el lavado de estos se emplea solución salina al 0.85 %, se recomiendan al menos 5 lavados a 3000 rpm por 10 minutos. Entre cada lavado se descarta la solución salina que se utilizó. Al decantar la solución salina se debe emplear una gasa doble para evitar perder los granos al realizar este procedimiento.

Una vez lavados los granos, estos pueden ser sembrados en los medios de cultivo de micología. En caso de que haya sospecha o se haya confirmado la infección polimicrobiana se recomienda el uso de antibióticos en la solución o utilizar discos impregnados con antibióticos al momento de cultivar los granos. La selección de los antibióticos dependerá de la bacteria aislada en los cultivos.

8. Sellar las placas una vez inoculadas, usar cintas de celulosa o Parafilm (una sola tira alrededor de la placa).
9. Incubar a 30 °C por al menos 3 semanas, con revisiones semanales y especial cuidado si el examen directo de la muestra resulta positivo. En casos muy sugestivos conviene esperar hasta 5 semanas.

NOTA: El tiempo de incubación puede variar según la muestra, desde 2 - 4 días para una esporotricosis hasta 5 semanas en el caso de hongos como las especies del complejo *Histoplasma capsulatum* y *Paracoccidioides* spp. (1,2,3,5)

Recordar que en este tipo de lesiones pueden deberse a otras etiologías infecciosas por ejemplo de origen bacteriano o micobacterias.

Examen directo

KOH:

Colocar una gota de KOH al 10 % en el portaobjetos (puede usarse mayor concentración si el material es difícil de digerir).

Colocar la muestra sobre el KOH y cubrirla con un cubreobjetos, examinar tras el tiempo indicado según la técnica utilizada.

Estas técnicas se encuentran descritas con mayor claridad en el Módulo 1 de este Manual.

Otras tinciones

En el caso de utilizar otras tinciones como los derivados de Romanowsky (Giemsa, Wright), tinción de Gram o Ziehl Neelsen seguir los procedimientos habituales que se llevan a cabo en cada laboratorio para su procesamiento.

Cuadro 8.3 Interpretación del examen directo en muestras de tejido subcutáneo **NOTA: TRABAJAR LOS AISLAMIENTOS CLÍNICOS EN CÁMARA DE BIOSEGURIDAD, ESTO POR EL RIESGO DE MANIPULAR PATÓGENOS FÚNGICOS DE TRANSMISIÓN AÉREA** (1)		
Patología	**Observación del examen directo** (2,3,4,5)	**Interpretación y observaciones** (3,4,5)
Cromoblastomicosis	Presencia de talo fumagoide en KOH al 10 %	Reportar el cultivo pendiente.
Esporotricosis	Blastosporas alargadas (forma de cigarro) en tinción de Giemsa o tinción de Gram	En el caso de la esporotricosis es raro encontrar las blastosporas, en la mayoría de los casos el examen directo es negativo. Esperar el resultado del cultivo para dar el reporte final.
Feohifomicosis	Micelio fuliginoso septado, puede variar en su tamaño y en el grado de pigmentación. Se pueden observar blastoconidios dependiendo del género en KOH al 10 %	Reportar cultivo pendiente
Hialohifomicosis	Micelio hialino septado en KOH al 10 %.	Reportar la presencia de micelio hialino septado. Reportar el cultivo pendiente.
Micetoma	Micelio hialino o fuliginoso septado en forma de grano en KOH al 10 %.	Reportar micetoma eumicético y describir el tipo de micelio observado. Se puede describir si el grano se observa de color blanquecino o negruzco. Sin embargo, es necesario el cultivo para confirmar su etiología. Reportar el cultivo pendiente.
Lacaziosis	Se observan blastosporas redondas u ovales de doble contorno y refringentes, pueden estar solas o formando cadenas de blastoconidios.	Reportar "se observan blastosporas en cadena semejantes de *Lacazia loboi* (*Paracoccidioides loboi*)" Agente fúngico no cultivable
Paracoccidioidomicosis	Observación de blastosporas multigemantes con base de implantación estrecha. Se puede observar cómo células	Reportar "se observan blastosporas multigemantes de *Paracoccidioides* spp." Reportar el cultivo pendiente.

	levaduriformes de distintos tamaños, blastosporas en forma de timón de barco y de aspecto de “Mickey Mouse”	
Histoplasmosis	En el Giemsa o en la tinción de Gram se pueden observar blastosporas intracelulares (se observan mejor en una tinción con derivados de Romanowsky como Giemsa o Wright que con la tinción de Gram)	Reportar blastosporas semejantes *Histoplasma capsulatum* e indicar que el cultivo está pendiente hasta que haya crecimiento del agente causal. Ante la sospecha de histoplasmosis se recomienda realizar una búsqueda del agente causal en otros sitios como sangre periférica, médula ósea, muestras de tracto respiratorio inferior, esto según sea el caso y la sospecha clínica. Reportar el cultivo pendiente.
Criptococosis	Se observan blastosporas con cápsula en la tinción de Gram, tinta china o inclusive se pueden observar con cápsula en el KOH.	Ante la sospecha de criptococosis lo ideal es realizar una tinta china. Se recomienda realizar también una inmunocromatografía de flujo lateral en muestras de suero, LCR, plasma según sea el caso. Esto se coordina con los centros hospitalarios que cuentan con estas pruebas.
Mucormicosis	Observación de micelio espaciadamente septado en KOH al 10 % o en una tinción de Gram	**Este tipo de hallazgo debe ser reportado de inmediato al personal médico.** Relacionar este hallazgo con el tipo de muestra y el estado de salud del paciente.
Otras patologías no fúngicas	**Observación del examen directo**	**Interpretación y observaciones**
Actinomicetoma	Observación de granos actinomicéticos, se pueden observar clavas en la periferia. Se puede hacer un montaje directo de la muestra entre portaobjetos y cubreobjetos. De	Reportar actinomicetoma. Reportar el cultivo pendiente.

	esta manera los granos conservan mejor su morfología.	
Actinomicosis y nocardiosis	Observación de bacterias ramificadas únicamente	Reportar probable actinomicosis o nocardiosis. Reportar cultivo pendiente. Realizar tinción para evidenciar ácido resistencia (Ziehl-Neelsen)

NOTA:

- En el caso de observar bacterias ramificadas se recomienda realizar una tinción de Ziehl Neelsen, en caso de observar filamentos alcohol ácido resistentes o alcohol ácido resistentes variables reportar la presencia sugestiva de bacterias del género *Nocardia* spp. la confirmación depende del crecimiento del cultivo. Las bacterias del grupo de Actinomyces no son alcohol ácido resistentes (4).
- Ver el capítulo de diagnóstico micológico de las infecciones superficiales para consultar el procesamiento de muestras de piel y tejido asociado a Talaromicosis (*Talaromyces marneffei)*, Módulo 3
- Las muestras siempre deben de ser observadas en primera instancia en microscopio de luz, para observar si las estructuras fúngicas en la muestra son de aspecto hialino o fuliginoso.
- **En todos los casos la observación y el reporte del examen directo debe de correlacionarse con el cuadro clínico y las lesiones en estudio. Se debe realizar un análisis de cada caso individual y describir únicamente lo que se observa y de lo cual no hay duda, esto para evitar confusiones en el diagnóstico. En caso de tener dudas se puede consultar con el especialista en micología que forma parte de la red de apoyo.**

FASE POST ANALITICA

Análisis e interpretación de cultivos

- Es importante determinar la identidad del crecimiento en las placas y diferenciar entre hongos colonizantes, contaminantes y patógenos. Es importante tomar en cuenta la clínica del paciente y el resultado del examen directo al momento de analizar los cultivos.

- Se debe de observar el crecimiento del hongo a partir del sitio de inoculación realizado, de lo contrario el crecimiento debe de considerar como un posible contaminante.

- En caso de duda ante el crecimiento que se observe en los medios de cultivo y los resultados del examen directo, se puede llamar al paciente para coordinar una segunda toma de muestra.

    - **Nota**: En algunas ocasiones la identificación mediante métodos bioquímicos o por observación de las características macroscópicas y microscópicas de un hongo no son suficientes para lograr una correcta identificación del microorganismo, ya sea blastospora u hongo filamentoso. En dichos casos se pueden usar otras metodologías como el sistema MALDI-TOF, que pueden ser útiles en casos de difícil identificación.

Características macroscópicas

Tomar en consideración:

1. Producción de pigmento en la placa.
2. Color de la colonia.
3. Aspecto de la colonia (algodonosa, pulverulenta, harinosa, entre otros).
4. Tiempo de incubación.

Características microscópicas

- Realizar el montaje de colonias sospechosas en azul de lactofenol o lactofenol claro según sea el caso.
- Se puede realizar el montaje utilizando cinta adhesiva o con el asa entre porta y cubre, intentando no alterar hongo para poder visualizar las características microscópicas de cada género.
- Estas técnicas se encuentran descritas con mayor claridad en el Módulo 1 de este Manual.

Cultivo de las muestras:

- En las muestras de tejido subcutáneo puede observarse el crecimiento de hongos que pueden ser considerados contaminantes o ambientales en otros contextos clínicos. Debe analizarse con cuidado este tipo de muestra.
- Si se obtiene crecimiento de hongos levaduriformes se procede a identificarlos por métodos bioquímicos, proteínicos o moleculares, según el alcance en el sitio de trabajo.
- Si son hongos filamentosos realizar montaje de las colonias en azul de lactofenol o lactofenol claro según corresponda por el tipo de colonia. Revisar la morfología macro y microscópica para llegar a una identificación de especie, o género al menos.
- Si el crecimiento inicial no tiene estructuras de reproducción que permitan su identificación, pueden realizarse subcultivos a medios poco enriquecidos como agar Avena o agar Papa Dextrosa (ver Módulo 1).
- Si se cuenta con la tecnología de espectrofotometría de masas, se puede realizar el montaje para confirmación de la identidad del aislamiento.

- **RECORDAR QUE LOS PATÓGENOS PRIMARIOS NUNCA DEBEN SER CONSIDERADOS CONTAMINANTES, INDEPENDIENTEMENTE DE SI SE OBSERVAN O NO EN EL EXAMEN DIRECTO.**

NOTA: TRABAJAR LOS AISLAMIENTOS CLÍNICOS EN CÁMARA DE BIOSEGURIDAD, ESTO POR EL RIESGO DE MANIPULAR PATÓGENOS FÚNGICOS DE TRANSMISIÓN AÉREA

Cuadro 8.4 Observación del cultivo

Micosis	Observaciones
Cromoblastomicosis	Puede ser necesario utilizar medios de esporulación y cultivos en lámina para determinar el género. Para la identificación de cada especie debe enviarse la muestra a hospitales que cuenten con MALDI-TOF o al INCIENSA, esto dependerá de cada caso.
Esporotricosis	Se puede demostrar el dimorfismo, incubando la colonia filamentosa en caldo infusión cerebro corazón a 37 ºC, por 3 a 5 días. Se deben observar con regularidad hasta observar la forma levaduriforme. Se puede enviar al HNN PCR para *Leishmania* y *Sporothrix* en casos difíciles donde la lesión sea sugestiva y las observaciones o cultivos sean negativos. Coordinar directamente con el laboratorio del HNN. En el caso del diagnóstico de Leishmaniasis se puede coordinar con INCIENSA el envío de muestras para identificación hasta especie y cultivo.
Feohifomicosis	Puede ser necesario utilizar medios de esporulación y cultivos en lámina para determinar el género. Para la identificación hasta especie debe enviarse la muestra a hospitales que cuenten con MALDI-TOF o al INCIENSA, esto dependerá de cada caso
Hialohifomicosis	Misma observación que en el caso de la feohifomicosis
Micetoma	Misma observación que en el caso de la feohifomicosis
Lacaziosis	No cultivable
Paracoccidioidomicosis	El examen directo es el diagnóstico de la enfermedad.

Histoplasmosis	Las colonias tienen el aspecto algodonoso y con pigmentos amarillentos y rojizos que presentan los dermatofitos. Trabajar estos aislamientos sospechosos de histoplasmosis en cámara de bioseguridad.
Criptococosis	Se debe corroborar la especie en MALDI-TOF. Los métodos bioquímicos automatizados de identificación no discriminan *C. neoformans* de *C. gattii.*
Mucormicosis	Puede ser de utilidad utilizar el agar sangre para el crecimiento de los mucorales.
Otras patologías no fúngicas	**Observaciones**
Actinomicetoma	Para la identificación de cada especie debe enviarse la muestra a hospitales que cuenten con MALDI-TOF o al INCIENSA, esto dependerá de cada caso.
Actinomicosis	Utilizar medio de tioglicolato. Sembrar en anaerobiosis. Misma observación del actinomicetoma con respecto a ID de especie
Nocardiosis	Sembrar en agar sangre de cordero al 5 %, agar chocolate o ATS. Se puede utilizar Sabouraud sin antibióticos. NO debe sembrarse en micosel. Misma observación del actinomicetoma con respecto a ID de especie.

Tiempo de incubación

Las placas se deben de incubar por tres semanas, sin embargo, en casos muy sugestivos puede extenderse a seis semanas.

Lectura de placas

Los principales microorganismos asociados a las micosis subcutáneas se explican en el cuadro a continuación:

Cuadro 8.5 Tiempos de lectura de placas de cultivo por hongos	
Lectura	**Observaciones**
• Dos veces a la semana la primera semana • Una vez por semana durante 3 semanas	Los cultivos pueden ser incubados por más tiempo en caso de ser necesario. Esto debido al crecimiento lento de algunos hongos filamentosos.

Cuadro 8.6 Microorganismos más frecuentes según cuadro clínico asociado (2,3,4)		
Cuadro clínico	**Microorganismos**	**Observaciones**
Cromoblastomicosis	*Fonsecaea* spp. *Cladophialophora carrionii* *Phialophora verrucosa* *Rhinocladiella aquaspersa* *Exophiala* spp. *Cladophialophora bantiana*	Se debe recurrir a biología molecular para identificar las distintas especies de *Fonsecaea* spp. y los otros hongos asociados a la cromoblastomicosis. Para efectos de reporte de laboratorio basta con reportar el género al médico. Recordar que el diagnóstico se realiza con el examen directo y la observación del talo fumagoide. La cepa puede ser enviada al Centro de Referencia para su identificación hasta especie.
Esporotricosis	Especies crípticas Complejo *Sporothrix schenckii*	Se debe recurrir a biología molecular para identificar las distintas especies del Complejo *Sporothrix schenckii.*
Feohifomicosis	**Neurotrópicos** *Cladophialophora bantiana* *Exophiala dermatitidis* *Cladosporium cladosporioides*	Se debe recurrir a biología molecular para identificar las distintas especies. Para efectos de reporte de laboratorio basta con reportar el género al médico. Sin embargo, por el riesgo de

	Exserohilum rostratum *Rhinocladiella mackenziei* **Dermatrópicos** *Cladophialophora bantiana* *Exophiala spinifera* *Exophiala jeanselmei* *Alternaria alternata* *Alternaria infectoria* *Lomentospora prolificans* *Bipolaris spicifera* **Fungemias** *Aureobasidium pullulans* *Phaeoacremonium parasiticum* *Lomentospora prolificans* **Cutáneas superficiales** *Neoscytalidium dimidiatum* *Scytalidium hyalinum* **Agentes de cromoblastomicosis asociados a feohifomicosis** *Fonsecaea* spp. *Phialophora verrucosa*	neurotropismo es importante realizar la identificación hasta especie de los aislamientos sospechosos de los hongos citados. La cepa puede ser enviada al Centro de Referencia para su identificación hasta especie.
Hialohifomicosis	*Fusarium* spp. *Scedosporium* spp. *Acremonium* spp *Sarocladium* spp. *Paecilomyces variotii* *Purpureocillium lilacinum* *Scopulariopsis* spp.	La identificación de estos hongos es importante ya que dependiendo del estado clínico del paciente se puede desencadenar infecciones multiorgánicas o sistémicas.

Micetoma	**Hongos blancos** *Scedosporium boydii* (*Pseudallescheria boydii*) *Acremonium* spp. *Fusarium* spp. *Aspergillus* spp. *Cylindrocarpon* spp. Se han descrito micetomas por dermatofitos como *T.rubrum, M. andouinii y M.canis* (7) **Hongos negros** *Phaeoacremonium* spp. *Exophiala* spp. *Rhinocladiella* spp. *Curvularia* spp. *Cladophialophora* spp. *Medicopsis romeroi* (antes *Pyrenochaeta romeroi*) **Otros hongos descritos en la literatura:** *Madurella mycetomatis* (el más importante en México, sin embargo, en Costa Rica no se ha descrito su aislamiento). *Trematosphaeria grisea* (antes *Madurella*) *Falciformispora* spp. (antes *Leptosphaeria*)	Para la identificación hasta especie es necesario la utilización de espectrometría de masas (MALDI-TOF) y en algunos casos se debe recurrir a técnicas de PCR y posterior secuenciación.
Otras patologías no fúngicas		
Actinomicetoma	*Nocardia asteroides complex (N. nova, N. farcinica, N.*	Para la identificación hasta especie es necesario la utilización de espectrometría de masas

	Cyriacigeorgica), Nocardia brasiliensis, N. otitiscaviarum Actinomadura madurae Actinomadura pelletieri Streptomyces somaliensis	(MALDI-TOF) y en algunos casos se debe recurrir a técnicas de PCR y posterior secuenciación.
Nocardiosis	*Nocardia asteroides* complex *(N.nova, N.farcinica, N. cyriacigeorgica), Nocardia brasiliensis, N. otitiscaviarum* entre otros	En la actualidad se reconoce que muchas de las especies identificadas anteriormente como *N.brasiliensis* pertenecen a otras especies. Por eso es necesario hacer la identificación hasta especie por pruebas moleculares.
Actinomicosis	En la literatura se menciona *Actinomyces israelii, A. odontolyticus, Actinomyces meyeri, Actinomyces bovis,* entre otros.	Para la identificación hasta especie es necesario la utilización de espectrometría de masas (MALDI-TOF) y en algunos casos se debe recurrir a técnicas de PCR y posterior secuenciación.

FASE POSTANALÍTICA

Reporte de resultados

Reporte de examen directo

1. En el examen directo eportar según las características observadas:
    a. **“Se observa micelio hialino septado.”**
    b. **“Se observa micelio fuliginoso septado.”**
    c. **“Se observa micelio espaciadamente septado.”**
    d. **“Se observa talo fumagoide.”**
    e. **“Se observan blastosporas multigemantes.”**
    f. **“Se observan blastosporas intracelulares.”**
    g. **“Se observa micelio hialino septado y pseudomicelio.”**

h. **"Se observa grano eumicético."**
i. **"Se observa grano actinomicético."**

2. En tinción de Giemsa reportar según las características observadas:

a. **"Se observan blastosporas intracelulares semejantes a *Histoplasma capsulatum."***
b. **"Se observan amastigotos de *Leishmania* spp."**

3. En tinción de Gram reportar según las características observadas:

a. **"Se observan bacterias ramificadas."**

4. En la tinción de Ziehl Neelsen reportar la presencia o ausencia de estructuras ácido-resistentes.

a. **"Se observan bacilos alcohol-ácido resistentes."**
b. **"No se observan bacilos alcohol-ácido resistentes."**

5. Si al examen directo y/o tinciones no se observan estructuras fúngicas, reportar:

a. **"No se observan estructuras fúngicas."**

Reporte de cultivo

1. Si el cultivo está negativo y el examen directo está negativo, reportar:
   a. **"Cultivo negativo por hongos".**

2. Si se logra aislar el agente causal e identificarlo, reportar:

a. **"Positivo por (género y especie) o sólo género".**

3. Si se logra aislar varios agentes causales e identificarlos, reportar:

a. **"Positivo por: (género y especie) o sólo género**

(género y especie) o sólo género"

4. Si el cultivo está negativo y el examen directo está positivo, reportar:

a. **"No se obtuvo crecimiento del agente causal"**

5. Si se observa crecimiento de 1 o más microorganismos que se consideran que no son de importancia clínica, reportar:

a. **"Cultivo negativo por hongos"**

REFERENCIAS

1. Mahon CR, Lehman DC. Textbook of Diagnostic Microbiology. 7ma ed. St Louis, Missouri. Elsevier Health Sciences; 2022.
2. Arenas R. Micología Médica Ilustrada. 6ta ed. España: Mcgraw-Hill Interamericana de España S.L.; 2019.
3. Bonifaz A. Micología Médica Básica. 6ta ed. Ciudad de México: McGraw-Hill interamericana editores; 2020.
4. Gross N, Salas Campos I. Métodos diagnósticos en Micología Médica. 1ra ed. 2da reimpresión. San José, Costa Rica: Editorial UCR; 2015.
5. Wengenack NL. CLSI M54 Principles and Procedures for Detection and Culture of Fungi in Clinical Specimens. 2da ed. Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI); 2021.
6. Leber AL (Ed.). Clinical Microbiology Procedures Handbook. 4ta ed. Washington, D.C.: American Society for Microbiology (ASM); 2024.

Módulo 9: Diagnóstico micológico de infecciones en muestras de tejido nasal y senos paranasales

FASE PREANALÍTICA

Solicitud del análisis: Cuadros clínicos asociados

Las infecciones fúngicas respiratorias representan un desafío para la salud pública, especialmente en individuos con sistemas inmunitarios comprometidos. Estas infecciones son causadas por diversos hongos patógenos, los cuales pueden invadir los pulmones y otros órganos del sistema respiratorio, e incluso llegar a diseminar. Las principales poblaciones de riesgo incluyen, a los pacientes hematológicos y pacientes con diabetes *mellitus* descompensada. Se pueden citar hongos del orden de los Mucorales, especies pertenecientes al género *Aspergillus* spp., especies de hongos negros y otros hongos hialinos dentro de los cuales destaca *Fusarium* spp. (1).

También se pueden encontrar patógenos fúngicos primarios como los microorganismos correspondientes a *Histoplasma capsulatum* y *Paracoccidioides* spp. En el caso de pacientes inmunocompetentes, se ha descrito la infección por hongos basidiomicetes como *Schizophyllum commune*, además de infecciones fúngicas por entomophtomorales como *Conidiobolus* spp. (2)

Diagnóstico diferencial

Enfermedades oncológicas con afectación de piel, leishmaniasis, nocardiosis, actinomicosis, infecciones por bacterias e infecciones por micobacterias tuberculosas y no tuberculosas (3).

Muestras clínicas, transporte y conservación

Tabla Resumen. Información requerida para el procesamiento (4,5)	
Datos del paciente	-Nombre completo, número de identificación, sexo y fecha de nacimiento. -Posible diagnóstico o cuadro clínico. -Fecha de inicio de síntomas. -Terapia recibida. -Lugar de procedencia.
Datos de la muestra	-Fecha y hora de la toma de muestra. -Técnica de obtención de la muestra. -Sitio de la toma de muestra. -Tipo de muestra. -Servicio que envía la muestra. -Responsable de la toma de muestra.
Muestras clínicas indicadas	
Tejido de senos paranasales	Este tejido será tomado por personal médico y enviado de forma inmediata al laboratorio. No se aceptan hisopados de senos paranasales.
Hisopado de lesiones nasales	Es importante que la muestra llegue en el medio de transporte adecuado. El hisopo aceptado es el flocado con medio de transporte como AMIES. Si la muestra es un hisopado nasal de una lesión sospechosa de micosis, se debe inocular de inmediato en los medios de cultivo y realizar los frotis de forma concomitante.
Biopsia de tejido nasal	Tomada por personal médico, al igual que las otras muestras se enviará de inmediato al laboratorio. Puede enviarse en frasco con una pequeña cantidad de solución salina estéril para evitar la desecación del tejido (lo necesario para cubrir el espécimen).
Criterios de rechazo	
-Muestras no rotuladas o sin coincidencia de los datos. -Muestras enviadas al laboratorio en formalina, etanol o metanol, únicamente se podrá realizar un examen directo de la muestra. Este tipo de muestras son NO cultivables. -Muestra enviada en recipiente inadecuado (como bolsas o frascos de segundo uso). -Cuando la cantidad de muestras es insuficiente para los exámenes solicitados, se debe contactar al médico para priorizar las pruebas a realizar. -Muestras recolectadas en recipientes no estériles. -Muestras con más de 24 horas de recolección y sin refrigeración (5 °C). -Muestras derramadas.	

-Muestras en hisopo con algodón y que se observen con poco material y seco no deben ser procesadas.
Observaciones
En el caso de estas muestras su procesamiento debe ser de manera preferencial el mismo día, en condiciones ideales dentro de las dos primeras horas, para obtener óptimos resultados en la identificación y recuperación de agentes etiológicos, ya que la demora en el procesamiento de estas muestras puede resultar en un crecimiento excesivo de contaminantes bacterianos e impedir la recuperación de patógenos fúngicos (1,2). **LOS AISLAMIENTOS DEBEN SER TRABAJADOS EN CÁMARA DE BIOSEGURIDAD POR EL RIESGO DE TRANSMISIÓN AÉREA.**
Recipiente indicado para la recolección
-Frasco estéril de boca ancha con tapa hermética. -Hisopos con medio de transporte.
Condiciones de transporte
-La muestra debe ser procesada lo más pronto posible, pues para algunos hongos se reduce su viabilidad en largos periodos de refrigeración. Se recomienda que no se sobrepasan las 2 horas desde el momento de tomada la muestra hasta su procesamiento (4). -Las muestras de tracto respiratorio superior se pueden refrigerar (5 °C) hasta por 24 horas, para evitar sobrecrecimiento bacteriano en caso de que no se pueda procesar inmediatamente. **Idealmente las muestras deben ser procesadas de inmediato.**

Observaciones sobre los criterios de rechazo:

- Si la muestra ha estado refrigerada por 24 horas o más, se debe procesar, este no es un criterio de rechazo. Sin embargo, es importante consignar en el reporte la posibilidad de disminución de viabilidad del cultivo. Algunos de los hongos a recuperar en lesiones de senos paranasales son termosensibles (mucorales).
- Las Guías internacionales indican que en ninguna circunstancia las muestras de hisopado nasal o nasofaríngeo son adecuadas para estudios por hongos. Sin embargo, existe la excepción en el caso de muestras de lesiones nasales. Es importante indicar al médico que esta no es la muestra ideal (idealmente se debería enviar biopsia o material de la lesión) y que por la cantidad de muestra se deberán priorizar los análisis a realizar (4,5).

FASE ANALÍTICA

Consideraciones generales de procesamiento de muestras sospechosas de micosis a nivel de mucosa oral y senos paranasales:

- Para que el rendimiento de las pruebas diagnósticas microbiológicas en las muestras de micosis respiratorias del tracto superior sea óptimo, es esencial una buena colaboración entre el laboratorio de microbiología y el servicio que envía la muestra (por lo general, otorrinolaringología o dermatología).
- El microbiólogo clínico debe tener conocimiento básico sobre los posibles agentes etiológicos que pueden encontrarse en este tipo de muestras.
- El personal médico por su parte debe conocer los procedimientos microbiológicos básicos para seleccionar la muestra adecuada, rotular la muestra con los datos del paciente y del espécimen recolectado y transportar la muestra sin demora al laboratorio (4).

Equipos e insumos requeridos

Cuadro 9.1 Equipos e insumos requeridos para el procesamiento de muestras sospechosas de micosis respiratorias

Activos base	**Analizadores base**	**Activos adicionales**
Cámara de bioseguridad Incubadora a 30 °C (o caja en un cuarto a temperatura ambiente en su defecto)	Microscopio de luz, con objetivos de 10X, 20X, 40X y 100X Sistema automatizado para ID	Sistema MALDI-TOF[1] Microscopio de fluorescencia[1]
Medios de cultivo	**Insumos**	**Pruebas complementarias**
Agar Sabouraud (SDA) Agar Sabouraud con gentamicina (SGC)[2] Agar micosel (MYC) Agar papa dextrosa (PDA)[1]	KOH al 10 %. Portaobjetos y cubreobjetos. Hojas de bisturí. Bisturí Reactivos para tinción de Gram	Blanco de calcoflúor.[1]

Otros medios de cultivo según la sospecha clínica (Bacterias o micobacterias)	Reactivos para tinción con derivados de Romanowsky (Giemsa, Leishman, Wright). Placas de Petri estériles. Guantes Lactofenol azul y claro	

1. Según la disponibilidad en el centro de salud.
2.Se recomienda la utilización de este medio sobre el SDA ya que evita el crecimiento de bacterias que pueden afectar la recuperación del hongo, esto aplica a zonas no estériles.

Recolección de muestras respiratorias para diagnóstico micológico (6):

- Las muestras se recogerán antes de iniciar el tratamiento antifúngico, siempre que las condiciones clínicas del paciente lo permitan.
- La recolección de muestras de tracto respiratorio superior se realiza por parte del personal capacitado. Se deben mantener las máximas condiciones de asepsia, no exponer la muestra al ambiente, utilizar recipientes estériles para su recolección.
- Todo el material obtenido debe ser debidamente rotulado y entregado al laboratorio.

Procesamiento de las muestras para diagnóstico micológico:

Indicaciones generales para todos los tipos de muestras

1. Revisar la correspondencia entre los datos y la muestra recibida en el laboratorio.
2. Asegurar la integridad de la muestra: libre de derrames, en un recipiente adecuado, entre otros.
3. Dejar que el medio alcance la temperatura ambiente, secar para eliminar el exceso de humedad de la superficie previo a la inoculación de las muestras.
4. Rotular una placa de agar SGC (SDA en su defecto) y otra de MYC en la base (y no en la tapa) con el número asignado a esa muestra.

5. Rotular un portaobjetos con el número asignado a esa muestra.

Muestras de biopsia de tejido nasal o muestra de senos paranasales (2,4,6)

1. Revisar las condiciones de la muestra.
2. Colocar la muestra en una placa de Petri estéril con unas pocas gotas de solución salina (puede ser la misma solución en que se transportó la muestra).
3. Cortar la biopsia o material del seno paranasal con el filo del bisturí en pedazos pequeños sin macerar, para no destruir las estructuras fúngicas en el tejido. Si la muestra es en exceso pequeña trabajarla sin cortar. (Aunque en este caso debe hacerse la nota en el reporte, ya que existe menor posibilidad de recuperación de los agentes fúngicos presentes en la muestra). Reservar una parte para el examen directo.
4. Sembrar los pedacitos de tejido obtenidos en agar SGC (de estar disponible en el centro de salud, realizar al menos 5 inoculaciones), colocándolos en el centro del agar, sin utilizar los bordes de la placa. Pueden hundirse ligeramente en el agar, sin perforar el medio.
5. Sembrar con la misma técnica el agar MYC. Si la muestra es suficiente para ambos agares, si no priorizar el SGC.
6. Cortar el pedacito de biopsia seleccionado finalmente para el examen directo.
7. Colocar el material en un portaobjetos rotulado. En el caso de biopsias es buena práctica realizar tinciones, por lo que se puede realizar adicional un frotis de la muestra.
8. Sellar los medios con cinta de celulosa (si no hay disponibilidad, utilizar Parafilm, con una vuelta a la placa es suficiente para sellar, evitar contaminantes y permitir el paso de oxígeno para el hongo)
9. Incubar las placas a 30 °C de 3 a 4 semanas.

Examen directo

KOH

Sobre la preparación de una gota de muestra en el portaobjetos, colocar una gota de KOH 10 - 20 % o blanco de calcoflúor, según la disponibilidad. Colocar un cubreobjetos sobre la preparación. Observar a microscopía de luz a 20X y 40X para analizar la presencia de estructuras fúngicas de importancia.

*Variación: en algunos casos resulta válido digerir primero la muestra con KOH y posteriormente colocar el Blanco de Calcoflúor para observar a microscopía de fluorescencia.

Estas técnicas se encuentran descritas con mayor claridad en el Módulo 1 de este Manual.

Otras tinciones

En el caso de utilizar otras tinciones como los derivados de Romanowsky (Wright, Giemsa), tinción de Gram o Ziehl-Neelsen seguir los procedimientos habituales que se llevan a cabo en cada laboratorio para su procesamiento.
Este manual cuenta con una sección del procedimiento sugerido para cada tinción (Refiérase al Módulo 1).

Cuadro 9.2 Interpretación del examen directo en muestras respiratoria nasales y senos paranasales (2,3,7)

Patología	Observación del examen directo (2,3,4,5)	Interpretación y observaciones (3,4,5)
Mucormicosis	Numerosas (o pocas) hifas gruesas, cenocíticas (no septadas) o, en raras ocasiones, espaciadamente septadas o poco septadas. De aspecto hialino,	Esta imagen en el examen directo se considera patognomónica. Debe de notificarse de inmediato al personal médico. Este tipo de

	bifurcadas con predominio de ángulo de 90 ° y en menor proporción se describen en la literatura en ángulo de 45 °. El ancho promedio es de 20 a 50 µm de largo.	micosis es muy agresiva, **su progresión hacia un desenlace fatal se da en cuestión de horas.**
Aspergilosis	Se observan hifas septadas hialinas, en ramificaciones usualmente en ángulo de 45 °. Las hifas suelen ser de ancho uniforme, sin constricción en los septos y el último compartimento en el ápice presenta forma cilíndrica.	Reportar la presencia de micelio y el cultivo pendiente. Tener especial atención con estos cultivos a fin de identificar el agente lo antes posible
Histoplasmosis	En el Giemsa o en la tinción de Gram se pueden observar blastosporas intracelulares de 2 - 5 µm con aspecto de “media luna” (se observan mejor en una tinción con derivados de Romanowsky que con la tinción de Gram). En KOH son prácticamente no observables. En Blanco de calcoflúor, no se percibe la característica de “media luna”, únicamente se distinguen por su tamaño y forma lenticular.	Reportar blastosporas semejantes a *Histoplasma capsulatum.* e indicar que el cultivo está pendiente hasta que haya crecimiento del agente causal. Ante la sospecha de histoplasmosis se recomienda realizar una búsqueda del agente causal en otros sitios como sangre periférica, médula ósea, muestras de tracto respiratorio inferior, esto según sea el caso y la sospecha clínica.
Criptococosis	Se observan blastosporas redondas con cápsula 2 - 15 µm en la tinción de Gram, tinta china o inclusive se pueden observar con cápsula en el KOH. En Blanco de Calcoflúor la cápsula se observa muy discretamente.	Ante la sospecha de criptococosis lo ideal es realizar una tinta china. Se recomienda realizar también una inmunocromatografía de flujo lateral en muestras de suero, LCR, plasma según sea el caso. Esto se coordina con los centros hospitalarios que cuentan con estas pruebas.
Paracoccidioidomicosis	Observación de blastosporas 5 - 60 µm, multigemantes con base de implantación estrecha. Se puede	Reportar Paracoccioidomicosis. Reportar el cultivo pendiente.

	observan células levaduriformes de distintos tamaños, blastosporas en forma de timón de barco y de aspecto de “Mickey Mouse”	
Candidiasis en senos paranasales	Se observan blastosporas de tamaño variable desde 2.5 - 7.5 µm, siendo *N. glabratus* (*C. glabrata*) la más pequeña de 2.5 - 4 µm. Presentan por lo general una sola gemación, con base ligeramente ancha. Se pueden observar hifas septadas con constricción en la zona de los septos, pueden tener gemaciones en el sitio del septo y usualmente el último compartimento hacia el ápice es redondo.	Reportar observación de micelio y/o blastosporas semejantes a *Candida* spp. La importancia de este hallazgo se evalúa en el caso particular de cada paciente y corresponde al criterio médico en cada caso. Sin embargo, debe reportarse.
Entomoftoromicosis **Principal agente: *Conidiobolus coronatus***	Se describen hifas cortas con pocos septos, en ocasiones dicotómicas. Las paredes son gruesas, refringentes y con pocas granulaciones. Se recomienda realizar un montaje con lactofenol azul, ya que suelen encontrarse escasas estructuras fúngicas.	Correlacionar lo observado con la clínica del paciente.
Cromoblastomicosis	Presencia de talo fumagoide en KOH al 10 %	Reportar cromoblastomicosis. Dejar consignado como pendiente el cultivo hasta su identificación. Por lo general la muestra en este caso será nasal.
Esporotricosis	Blastosporas alargadas (forma de cigarro) en tinción de Giemsa o tinción de Gram	En el caso de la esporotricosis es raro encontrar las blastosporas, en la mayoría de los casos el examen directo es negativo. Esperar el resultado del cultivo para dar el diagnóstico.

Feohifomicosis	Micelio fuliginoso septado, puede variar en su tamaño y en el grado de pigmentación. Se pueden observar blastoconidios.	Reportar se observan estructuras fúngicas semejantes a feohifomicosis. Reportar el cultivo pendiente.
Otros hongos filamentosos	Micelio hialino septado	*Fusarium* spp., *Penicillium* spp., *Paecylomyces* spp., a pesar de que pueden ser contaminantes, si se encuentra un examen directo positivo con crecimiento de estos agentes y un cuadro clínico sugestivo, forman parte de los agentes causantes de micosis respiratorias. **Otros micosis profundas o sistémicas:** Talaromicosis, blastomicosis, coccidiodomicosis. Otros agentes de micosis subcutánea: *Rhinosporidium* spp. (refiérase al capítulo: micosis poco frecuentes).
Otros hongos levaduriformes	Se pueden observar blastosporas similares a las de *Candida* spp., artrosporas o incluso micelio artroblastosporado, aunque no es frecuente.	*Geotrichum* spp., *Trichosporon* spp. son dos géneros de baja frecuencia, pero que deben reportarse en muestras respiratorias, especialmente por su capacidad de formar biopelículas. La importancia de este hallazgo se evalúa en el caso particular de cada paciente y corresponde al criterio médico en cada caso. Sin embargo, debe reportarse.
Otras patologías no fúngicas	**Observación del examen directo**	**Interpretación y observaciones**

Actinomicosis y nocardiosis	Observación de bacterias ramificadas únicamente	Reportar probable actinomicosis o nocardiosis. Reportar cultivo pendiente. Realizar tinción para evidenciar ácido de resistencia (Ziehl Neelsen)

NOTA:

- En el caso de observar bacterias ramificadas se recomienda realizar una tinción de Ziehl Neelsen, en caso de observar filamentos alcohol ácido resistentes o alcohol ácido resistentes variables reportar la presencia sugestiva de bacterias del género *Nocardia* sp. la confirmación depende del crecimiento del cultivo. Las bacterias del grupo de Actinomyces no son alcohol ácido resistentes, y deben de cultivarse en anaerobiosis (3,7).
- Ante la posibilidad de encontrarse con un examen directo sugestivo de una micosis de baja incidencia, se prefiere ante todo consultar primero con especialistas en micología, y tratar las muestras con extrema precaución por ser agentes de fácil transmisión.
- En todos los casos la observación y el reporte del examen directo debe de correlacionarse con el cuadro clínico. Se debe realizar un análisis de cada caso individual y describir únicamente lo que se observa y de lo cual no hay duda, esto para evitar confusiones en el diagnóstico. En caso de tener dudas se puede consultar con el especialista en micología que forma parte de la red de apoyo.

FASE POSTANALÍTICA

Análisis e interpretación de cultivos

- Es importante determinar la identidad del crecimiento en las placas y diferenciar entre hongos colonizantes, contaminantes y patógenos. Es importante tomar en cuenta la clínica del paciente y el resultado del examen directo al momento de analizar los cultivos.
- Se debe observar el crecimiento del hongo a partir del sitio de inoculación realizado, de lo contrario el crecimiento debe de considerar como un posible contaminante.
- La significancia clínica de un aislamiento siempre dependerá de:
    a. La posibilidad de ese microorganismo de causar enfermedad.

b. El tipo de aislamiento y el método de obtención de la muestra.
c. El estado inmune del paciente o el tratamiento con inmunosupresores.
d. La historia clínica del paciente, la posible exposición al microorganismo aislado y el historial de viajes.
e. La visualización de un examen directo positivo (que no se logra en todos los casos de infecciones respiratorias del tracto respiratorio superior).
f. La presencia del microorganismo en otros sitios anatómicos.
g. La cuantificación del aislamiento, es decir, la cantidad de colonias aisladas del agente.
h. Otros métodos indirectos que validen la presencia de una infección fúngica sistémica, como las Galactomananas por *Aspergillus* o las 1,3-β-D-glucanas.

RECORDAR QUE LOS PATÓGENOS PRIMARIOS NUNCA DEBEN SER CONSIDERADOS CONTAMINANTES, INDEPENDIENTEMENTE DE SI SE OBSERVAN O NO EN EL EXAMEN DIRECTO.

- Los cultivos de muestras respiratorias, SIEMPRE, deben abrirse dentro de la cámara de bioseguridad, por la posibilidad de aislar agentes patógenos de fácil transmisión.
- Para la identificación de las blastosporas se debe de hacer uso del sistema automatizado para ID disponible en el centro de salud. Por su parte la identificación de los hongos filamentosos se basa en la observación de las características tanto macroscópicas como microscópicas del hongo.
- **Nota**: En algunas ocasiones la identificación mediante métodos bioquímicos o por observación de las características macroscópicas y microscópicas de un hongo no son suficientes para lograr una correcta identificación del microorganismo, ya sea blastospora u hongo filamentoso. En dichos casos se pueden usar otras metodologías como el sistema MALDI-TOF, que pueden ser útiles en casos de difícil identificación.

Características macroscópicas

Tomar en consideración:

1. Producción de pigmento en la placa.
2. Color de la colonia.
3. Aspecto de la colonia (algodonosa, pulverulenta, harinosa, entre otros).
4. Tiempo de incubación.

Características microscópicas

- Realizar el montaje de colonias sospechosas en azul de lactofenol o lactofenol claro según sea el caso.
- Se puede realizar el montaje utilizando cinta adhesiva o con el asa entre portaojetos y cubreobjetos, intentando no alterar hongo para poder visualizar las características microscópicas de cada género.
- Estas técnicas se encuentran descritas con mayor claridad en el Módulo 1 de este Manual.

Cultivo de las muestras:

- A partir de muestras respiratorias del tracto superior pueden aislarse una variada posibilidad de microorganismos fúngicos, muchos de ellos ambientales. Por lo que deben tomarse en consideración al momento de la lectura de los cultivos, ya que algunos no contarán con relevancia al momento de la lectura.
- Es importante la concordancia entre lo observado en el examen directo y el crecimiento en cultivo. Es importante siempre realizar un examen directo, esto por la probabilidad de no obtener crecimiento en los medios. **La observación al microscopio puede ser el único hallazgo microbiológico que indique una infección fúngica.**
- Si se obtiene crecimiento de hongos levaduriformes se procede a identificarlos por métodos bioquímicos, proteínicos o moleculares, según el alcance en el sitio de trabajo.

- Si son hongos filamentosos realizar montaje de las colonias en azul de lactofenol o lactofenol claro según corresponda por el tipo de colonia. Revisar la morfología macro y microscópica para llegar a una identificación de especie, o género al menos. Pueden usarse claves dicotómicas de identificación de la literatura.
- La presencia de varias colonias de un mismo microorganismo incide en su importancia clínica. Por el tipo de muestra y su recolección pueden crecer en el cultivo muchas colonias de otros hongos ambientales que no tienen relevancia. Si se presentan varias colonias de un mismo hongo, en ambos cultivos, deben identificarse.
- En el caso de crecimiento de *Candida* spp. al ser microbiota en tracto respiratorio, reportar únicamente si hay crecimiento de más de 5 colonias en las placas. En estos casos el reporte sirve para el "Score *Candida* spp.", por lo que es suficiente con reportar *Candida* spp. El hallazgo es más significativo si el examen directo también está positivo.
- Si el crecimiento inicial no tiene estructuras de reproducción que permitan su identificación, pueden realizarse subcultivos a medios poco enriquecidos como agar Avena o agar Papa (ver Módulo 1)
- Si se cuenta con la tecnología de espectrofotometría de masas, se puede realizar el montaje para confirmación de la identidad del aislamiento.

NOTA: TRABAJAR LOS AISLAMIENTOS CLÍNICOS EN CÁMARA DE BIOSEGURIDAD, ESTO POR EL RIESGO DE MANIPULAR PATÓGENOS FÚNGICOS DE TRANSMISIÓN AÉREA

Cuadro 9.3 Observación del cultivo (2,3,7)			
Micosis	**Aspecto macroscópico del cultivo**	**Morfología microscópica colonial**	**Observaciones**
Mucormicosis	Colonias de rápido crecimiento de aspecto	Las características microscópicas dependen del	Reportar hasta género. En algunas especies son requeridas técnicas

	algodonoso blanco u oscuro.	microorganismo aislado	especiales de esporulación, identificación proteómica o genómica.
Aspergilosis	Colonias de rápido crecimiento, cada una con características específicas dependiendo del complejo	Las características microscópicas dependen del microorganismo aislado	En algunas especies se requiere de identificación por proteómica o genómica para separar complejos. Aunque en la práctica clínica la identificación hasta complejo es suficiente.
Histoplasmosis	Colonias algodonosas blanquecinas con pigmento amarillo o rojizo. Tienen aspecto de "dermatofito" (30 °C). El crecimiento puede durar hasta 4 semanas.	Macroconidios tuberculados o no tuberculados, microconidios y micelio hialino septado	Corresponde a un hongo termodimórfico. Si se cultiva a 37 °C se obtiene la fase levaduriforme.
Criptococosis	Colonias levaduriformes de aspecto lechoso	Blastosporas con, sin o poca cápsula	Se debe corroborar la especie por espectrometría de masas. Los sistemas de identificación bioquímicos y automatizados no distinguen *C. neoformans* de *C. gattii.*
Paracoccidioidomicosis	Aspecto de la colonia variable tipo *Trichosporon* o filamentoso o una mezcla de ambos	Se pueden observar clamidospora y microconidios no característicos	El examen directo es diagnóstico de la enfermedad. Corresponde a un hongo termodimórfico. Si se cultiva a 37 °C se obtiene la fase levaduriforme.1

Candidiasis en senos paranasales sp.	Colonias levaduriformes, serosas, brillantes, con o sin micelio sumergido en el agar, circunscritas, redondas.	Las características microscópicas dependen del microorganismo aislado	Utilizar pruebas bioquímicas automatizadas para identificación. En algunos casos se requiere confirmación proteómica.
Entomoftomoromicosis (conidiobolomicosis)	No se debe utilizar micosel para estas muestras. Crecimiento rápido, colonia limitada, glabra, membranosa, adherida al medio, color blanco-beige, con escaso micelio de aspecto húmedo.	Balistosporas en forma de limón, miden de 10 a 30 µm de diámetro y presentan una papila prominente. Se pueden observar vellosidades. Rara vez se observan zigosporas.	**¡¡¡MUCHO CUIDADO CON LAS BALISTOSPORAS!!!** Son lanzadas por el hongo hacia la tapa de la placa.
Cromoblastomicosis	Colonia de aspecto fuliginoso (tonalidades verde-oscuro a negras) puede ser aterciopelada o algodonosa. Periodo de incubación de 5 a 40 días	Varía según agente etiológico	Puede ser necesario utilizar medios de esporulación y cultivos en lámina para determinar el género. Para la identificación de cada especie debe enviarse la muestra a hospitales que cuenten con MALDI-TOF o al INCIENSA, esto dependerá de cada caso.
Esporotricosis	El cultivo se considera el estándar de oro. Colonias de aspecto membranoso, de color blanquecino a beige. Dependiendo de la cepa	A temperatura ambiente se observa la presencia de conidióforo tipo simpodial con o sin radulococonidios.	Se puede demostrar el dimorfismo, incubando la colonia filamentosa en caldo infusión cerebro corazón a 37ºC.[1]

	puede volverse melánica (fuliginosa). Período de incubación de 5 - 8 días. Generalmente crecen muy puras.	Si se cultiva a 37 ºC se observan las células levaduriformes en forma de puro o cigarro.	Se deben observar con regularidad hasta observar la forma levaduriforme. Se puede enviar al HNN PCR para *Leishmania* y *Sporothrix* en casos difíciles donde la lesión sea sugestiva y las observaciones o cultivos sean negativos. Coordinar directamente con el laboratorio del HNN.
Feohifomicosis	Algunos cultivos pueden observarse inicialmente como levaduriformes (*Exophiala* spp.) para luego volverse filamentosos. Otros se presentan filamentosos desde su inicio. La morfología es variable de acuerdo con el género.	Varía según agente etiológico	Puede ser necesario utilizar medios de esporulación y cultivos en lámina para determinar el género. Para la identificación hasta especie debe enviarse la muestra a hospitales que cuenten con MALDI-TOF o al INCIENSA, esto dependerá de cada caso
Schizophyllum commune	Colonias blancas, levantadas, algodonosas. Con un olor característico a metano. Puede formar basidiocarpos.	Se observan hifas septadas hialinas con conexiones en hebilla completas o incompletas.	Si las características no son claras, puede usarse proteómica para su identificación.
Otras patologías no fúngicas	**Aspecto macroscópico del cultivo**	**Morfología microscópica colonial**	**Observaciones**

Actinomicosis	Se observan pequeñas masas amarillentas	Se observan bacterias filamentosas con formas cocoides y bacilares.	Utilizar medio de tioglicolato y sembrar en anaerobiosis. Para la identificación de cada especie debe enviarse la muestra a hospitales que cuenten con MALDI-TOF o al Centro de Referencia, esto dependerá de cada caso
Nocardiosis	Colonias limitadas, secas y rugosas. De coloración blanca a amarillenta-naranja	Al teñir las colonias se observan filamentos alcohol ácido resistentes-ácido variables con la tinción de Ziehl Neelsen.	Sembrar en agar sangre de cordero al 5%, agar chocolate o ATS. Se puede utilizar Sabouraud sin antibióticos. NO debe sembrarse en micosel. Para la identificación de cada especie debe enviarse la muestra a hospitales que cuenten con MALDI-TOF o al Centro de Referencia, esto dependerá de cada caso

1. En el caso de los hongos dimórficos, **no** se sugiere demostrar el dimorfismo por la patogenicidad de estos aislamientos. Estas prácticas especiales se realizan solamente en un laboratorio que cuente con Micólogo especialista y un espacio seguro para la manipulación de los mismos.

Tiempo de incubación

- Las placas se deben de incubar por tres semanas, sin embargo, en casos muy sugestivos puede extenderse a 6 semanas.
- Para pacientes con inmunosupresiones y/o exámenes directos positivos por *Histoplasma capsulatum* es conveniente esperar hasta 4 - 6 semanas.
- En caso de alguno de los agentes no endémicos de la región también esperar 4 semanas.

Lectura de placas

Cuadro 9.4 Tiempos de lectura de placas de cultivo por hongos

Lectura	Observaciones
● Dos veces a la semana la primera semana ● Una vez por semana durante 3 semanas o el resto del tiempo	Para que un aislamiento sea considerado de importancia debe mostrar crecimiento sobre el sitio de inoculación en el agar. Y por lo general, se trata de muestras con un solo aislamiento.

Reporte de resultados

Reporte de examen directo

1. En el examen directo reportar según las características observadas:
    a. **“Se observa micelio espaciadamente septado.”**
    b. **“Se observa micelio hialino septado.”**
    c. **“Se observa micelio fuliginoso septado.”**
    d. **“Se observan blastosporas multigemantes semejantes a *Paracoccidioides* spp.”**
    e. **“Se observan blastosporas intracelulares semejantes a *Histoplasma capsulatum*.”**

f. **"Se observa micelio y blastosporas semejantes a *Candida* spp."**
g. **"Se observan esférulas semejantes a *Coccidioides* spp."**
h. **"Se observan blastosporas semejantes a *Blastomyces* spp."**

2. En tinción de Gram reportar según las características observadas:

a. **"Se observan bacterias ramificadas."**

3. En la tinción de Ziehl-Neelsen o Kinyoun reportar según las características observadas:

a. **"Se observan bacilos alcohol-ácido resistentes."**
b. **"No se observan bacilos alcohol-ácido resistentes."**

4. Si al examen directo no se observan estructuras fúngicas, reportar:

a. **"No se observan estructuras fúngicas."**

Reporte de cultivo

1. Si el cultivo está negativo y el examen directo está negativo, reportar:
   a. **"Cultivo negativo por hongos".**
2. Si se logra aislar el agente causal e identificarlo, reportar:
   a. **"Positivo por (género y especie) o sólo género".**
3. Si se logra aislar varios agentes causales e identificarlos, reportar:
   a. **"Positivo por: (género y especie) o sólo género.**
      (género y especie) o sólo género."
4. Si el cultivo está negativo y el examen directo está positivo, reportar:
   a. **"No se obtuvo crecimiento del agente causal".**
5. Si se observa crecimiento de 1 o más microorganismos que se consideran que no son de importancia clínica, reportar:

a. **“Cultivo negativo por hongos”.**

REFERENCIAS

1. Leber AL (Ed.). Clinical Microbiology Procedures Handbook. 4ta ed. Washington, D.C.: American Society for Microbiology (ASM); 2024.
2. Gross N, Salas Campos I. Métodos diagnósticos en Micología Médica. 1ra ed. 2da reimpresión. San José, Costa Rica: Editorial UCR; 2015.
3. Bonifaz A. Micología Médica Básica. 6ta ed. Ciudad de México: McGraw-Hill interamericana editores; 2020.
4. Carroll K, Pfaller M. Manual of Clinical Microbiology. Vol. 1. 13ra ed. Washington DC: ASM Press; 2023.
5. Mahon CR, Lehman DC. Textbook of Diagnostic Microbiology. 7ma ed. St Louis, Missouri. Elsevier Health Sciences; 2022.
6. Wengenack NL. CLSI M54 Principles and Procedures for Detection and Culture of Fungi in Clinical Specimens. 2da ed. Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI); 2021.
7. Arenas R. Micología Médica Ilustrada. 6ta ed. España: Mcgraw-Hill Interamericana de España S.L.; 2019.

Módulo 10: Diagnóstico micológico de las infecciones respiratorias

FASE PREANALÍTICA

Solicitud del análisis: Cuadros clínicos asociados

Las infecciones fúngicas respiratorias representan un desafío significativo para la salud pública, especialmente en individuos con inmunosupresión. Estas infecciones son causadas por diversos hongos patógenos, los cuales pueden invadir los pulmones y otros órganos del sistema respiratorio, e incluso llegar a diseminar. Los hongos más comunes responsables de estas infecciones incluyen *Aspergillus* spp., *Cryptococcus* spp., *Pneumocystis jirovecii*, *Histoplasma capsulatum* y en ocasiones otros agentes menos frecuentes (1). En personas con un sistema inmunitario saludable, estas infecciones suelen ser raras y a menudo asintomáticas. Sin embargo, en pacientes inmunocomprometidos, como aquellos con VIH, cáncer, enfermedades hematológicas o en tratamiento con medicamentos inmunosupresores, la incidencia de estas infecciones aumenta considerablemente por la neutropenia asociada. (2)

Las infecciones respiratorias pueden variar desde una leve neumonía hasta formas graves y potencialmente mortales. Los síntomas son inespecíficos y pueden incluir tos persistente, fiebre, dificultad para respirar y dolor torácico, lo que puede complicar su diagnóstico. Normalmente, las solicitudes de laboratorio se acompañan con diagnósticos sugestivos o hallazgos como: bronquiectasias, disnea, síndrome de distrés respiratorio agudo, bronconeumonía, atelectasias o cavitaciones, que no son específicos de ninguna enfermedad particular. Por lo que el diagnóstico de laboratorio resulta sumamente importante, para ayudar al clínico a definir el cuadro clínico del paciente (1,3).

Diagnóstico diferencial

Las infecciones respiratorias pueden tener numerosos orígenes, infecciosos o no.

Dentro de los posibles diagnósticos diferenciales, deben descartarse en el laboratorio son los agentes bacterianos como: estreptococos del grupo viridans, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas* spp., enterobacterias y bacterias anaerobias. (para más detalle referirse al Manual de Procedimientos de Bacteriología de la Caja Costarricense del Seguro Social MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023). Además, es muy importante considerar la presencia de micobacterias tuberculosas y no tuberculosas, agentes virales como: influenza, parainfluenza, coronavirus, rinovirus, adenovirus. Y otros de baja incidencia como *Mycoplasma* spp., *Nocardia* spp. y parásitos en ciclos de afección respiratoria.

Muestras clínicas, transporte y conservación

Tabla Resumen. Información requerida para el procesamiento (4,5)	
Datos del paciente	-Nombre completo, número de identificación, sexo y fecha de nacimiento. -Posible diagnóstico o cuadro clínico. -Fecha de inicio de síntomas. -Terapia recibida. -Lugar de procedencia.
Datos de la muestra	-Fecha y hora de la toma de muestra. -Técnica de obtención de la muestra. -Sitio de la toma de muestra. -Tipo de muestra. -Servicio que envía la muestra. -Responsable de la toma de muestra.
Muestras clínicas indicadas	
-Lavado bronquial -Lavado bronquioalveolar -Aspirado endotraqueal o a través de traqueostomía -Esputo inducido	

-Biopsia transbronquial pulmonar -Cepillados bronquiales -Líquidos pleurales -Derrames pleurales
Volúmenes indicados: para aspirados, líquidos o derrames con al menos 2 mL, para lavados de 5 a 10 mL, las biopsias y cepillos deben colocarse en 1 mL de solución salina estéril. Con respecto a los esputos solamente son aceptados los “inducidos”. En casos donde no exista posibilidad de obtener ninguna de las muestras anteriores y el caso sea muy sugestivo, se aceptan 3 esputos de la mañana por expectoración profunda, obtenidos después de lavarse la boca (siendo esta una muestra de muy baja calidad analítica).
Criterios de rechazo
-Muestras de esputo al azar. -Muestras no rotuladas o sin coincidencia de los datos. -Muestras enviadas al laboratorio en formalina, etanol o metanol. -Muestras recolectadas en recipientes no estériles. -Muestra enviada en recipiente inadecuado (como bolsas o frascos de segundo uso). -Cuando la cantidad de muestras es insuficiente para los exámenes solicitados, se debe contactar al médico para priorizar las pruebas a realizar. -La información de la solicitud no corresponde a la proporcionada en el frasco de muestra. -Muestras con más de 24 horas de recolección y sin refrigeración (5 °C). -Muestras derramadas -Muestras utilizadas en otros análisis previos.
Observaciones
En el caso de estas muestras su procesamiento debe ser de manera preferencial el mismo día, en condiciones ideales dentro de las dos primeras horas, para obtener óptimos resultados en la identificación y recuperación de agentes etiológicos, ya que la demora en el procesamiento de estas muestras puede resultar en un crecimiento excesivo de contaminantes bacterianos e impedir la recuperación de patógenos fúngicos (1,2). **ESTAS MUESTRAS DEBEN SER TRABAJADOS EN CÁMARA DE BIOSEGURIDAD.** **SI LA SOSPECHA CLÍNICA ES MUCORMICOSIS, NO REFRIGERAR LA MUESTRA.**
Recipiente adecuado para la recolección
-Frasco estéril de boca ancha con tapa hermética -Frascos de aspiración en trampa

Condiciones de transporte
-La muestra debe ser procesada lo más pronto posible, pues para algunos hongos se reduce su viabilidad en largos periodos de refrigeración. -Las muestras respiratorias se pueden refrigerar (5 °C) hasta por 24 horas, para evitar sobrecrecimiento bacteriano en caso de que no se pueda procesar inmediatamente.

Observaciones sobre los criterios de rechazo:

- Si las muestras son tomadas por técnicos de neumología, han pasado más de 24 horas y se encuentra refrigerada, es preferible procesarla por la dificultad de la toma de la muestra. Aunque debe hacerse una aclaración de la posibilidad de disminución de viabilidad del cultivo. Si se trata de esputo inducido o expectorado, es preferible solicitar una nueva muestra (4,5).
- En ninguna circunstancia las muestras de hisopado nasal o nasofaríngeo son adecuadas para estudios por hongos.

FASE ANALÍTICA

Consideraciones generales del procesamiento de muestras sospechosas de micosis respiratorias

- Es esencial una buena comunicación entre el laboratorio de microbiología y el servicio que envía la muestra, en orden para obtener el mayor rendimiento de las pruebas diagnósticas.
- El microbiólogo clínico debe tener conocimiento básico sobre los posibles agentes etiológicos que pueden encontrarse en este tipo de muestras.
- El personal médico por su parte debe conocer los procedimientos microbiológicos básicos para seleccionar la muestra adecuada, rotular la muestra con los datos del paciente y del espécimen recolectado, así como transportar la muestra sin demora al laboratorio. (4)

Equipos e insumos requeridos

Cuadro 10.1 Equipos e insumos requeridos para el procesamiento de muestras sospechosas de micosis respiratorias

Activos base	Analizadores base	Activos adicionales
Cámara de bioseguridad Incubadora a 30 °C (o caja en un cuarto a temperatura ambiente en su defecto) Centrífuga ventilada para tubos cónicos de 15 mL o 50 mL (con alcance de 3000 rpm) Vórtex	Microscopio de luz, con objetivos de 10X, 20X, 40X y 100X Sistema automatizado para ID y PSA	Sistema MALDI-TOF[1] Incubadora a 37 ºC Microscopio de fluorescencia[1]
Medios de cultivo	**Insumos**	**Pruebas complementarias**
Agar Sabouraud dextrosa (SDA) Agar Sabouraud con antibióticos: gentamicina y cloranfenicol (SGC)[2] Agar micosel (MYC) Otros medios de cultivo según la sospecha clínica (Bacterias o micobacterias)	KOH al 10 - 20 %. Portaobjetos Cubreobjetos. Hojas de bisturí. Bisturí Asas bacteriológicas y micológicas Reactivos para tinción de Gram Reactivos para tinción con derivados de Romanowsky (Giemsa, Leishman, Wright). Placas de Petri estériles. Tubos cónicos de 15 mL o 50 mL Mucolítico (esputasol, N-acetil-L-cisteína) Guantes Lactofenol azul y claro	Blanco de calcoflúor[1] Técnicas moleculares[1] Prueba de detección de antígeno de Galactomananas de *Aspergillus*[1]

1. Según la disponibilidad en el centro de salud

2. Se recomienda la utilización de este medio sobre el SDA ya que evita el crecimiento de bacterias que pueden contaminar el crecimiento del hongo si aplica a zonas no estériles

Recolección de muestras respiratorias para diagnóstico micológico (4,5,6):

- Las muestras se recogerán antes de iniciar el tratamiento antifúngico, siempre que las condiciones clínicas del paciente lo permitan.
- La recolección de muestras respiratorias se realiza por parte del personal capacitado de neumología y enfermería. Se deben mantener las máximas condiciones de asepsia, no exponer la muestra al ambiente, utilizar recipientes estériles para su recolección.
- Todo el material obtenido debe ser debidamente rotulado y entregado al laboratorio.

Procesamiento de las muestras para diagnóstico micológico (4,5,6):

Indicaciones generales para todos los tipos de muestras

1. Revisar la correspondencia entre los datos y la muestra recibida en el laboratorio.
2. Asegurar la integridad de la muestra: libre de derrames, en un recipiente adecuado, con volumen suficiente y otro tipo de alteraciones.
3. De previo a la inoculación de las muestras clínicas, es importante dejar que el medio alcance la temperatura ambiente, este debe secarse para eliminar el exceso de humedad de la superficie.
4. Rotular una placa de agar SGC y otra de MYC con los datos del paciente, por el reverso a una orilla de placa, con el fin de poder ver el crecimiento colonial al reverso.
5. Rotular un portaobjetos con los datos del paciente.

Muestras de esputo inducido, aspirado endotraqueal o aspirado a través de tubo endotraqueal

1. Revisar las condiciones de la muestra, aquellas que sean en exceso mucopurulentas o mucosas necesitan por lo general tratamiento mucolítico (como el dithiothreitol (DTT) o N-acetilcisteína al 2 %). Las muestras con un volumen superior a 5 mL y de consistencia acuosa, es preferible centrifugar y tratarlas como lavados bronquiales (Ver adelante en esta sección).
2. Homogenizar la muestra en su recipiente original, por medio de vórtex fuerte hasta que en la muestra se haya deshecho el moco por completo.
3. Transferir la muestra a un tubo cónico de 15 mL, trabajar un volumen aproximado de 5 mL.
4. Agregar partes iguales de agente mucolítico, generalmente de 2 a 3 mL.
5. Incubar a temperatura ambiente por 15 minutos.
6. Centrifugar a 3000 rpm por 10 minutos.
7. Descartar el sobrenadante con bulbo plástico. Dejar en el tubo 1:4 del volumen total del sobrenadante, para luego resuspender el sedimento.
8. Homogeneizar por completo el sedimento utilizando el vortex.
9. Sembrar de 0.25 a 0.5 mL de sedimento (aproximadamente de 3 a 4 gotas) en el centro de cada agar. **En micología siempre se siembra la mayor cantidad de muestra posible.**
10. Con asa estéril (de 1 o 10 µL) rayar la gota depositada en tres direcciones, sin tocar los bordes del agar.
11. Sembrar la siguiente placa realizando el mismo procedimiento de los puntos 9 y 10. Es imperativo cambiar de asa con cada placa de cultivo.
12. Colocar una gota de sedimento en un portaobjetos rotulado. Si se realizará una tinción, preparar un frotis por extendido.
13. Dejar secar el cultivo y sellar con cinta de celulosa (si no hay disponibilidad, utilizar Parafilm, con una vuelta a la placa es suficiente para sellar, evitar contaminantes y permitir el paso de oxígeno para el agente fúngico).

14. Incubar las placas a 30 °C de 3 a 4 semanas.

Muestras de lavado bronquial, lavado broncoalveolar, líquido pleural y derrame pleural

1. Revisar las condiciones de la muestra, por lo general son muestras que contienen bastante volumen.
2. Homogenizar la muestra en su recipiente original, por medio de vórtex fuerte hasta que en la muestra se haya deshecho el moco por completo.
3. Transferir la muestra a un tubo cónico de 15 mL, trabajar un volumen aproximado de 5 mL a 10 mL.
4. Centrifugar a 3000 rpm por 10 minutos.
5. Descartar el sobrenadante con bulbo plástico. Dejar en el tubo 1:4 del volumen total del sobrenadante, para luego resuspender el sedimento.
6. Homogeneizar por completo el sedimento utilizando el vortex.
7. Sembrar de 0.25 a 0.5 mL de sedimento (aproximadamente de 3 a 4 gotas) en el centro de cada agar. En micología siempre se siembra la mayor cantidad de muestra posible.
8. Con asa estéril (de 1 o 10 µL) rayar la gota depositada en tres direcciones, sin tocar los bordes del agar.
9. Sembrar la siguiente placa realizando el mismo procedimiento de los puntos 9 y 10. Es imperativo cambiar de asa con cada placa de cultivo.
10. Colocar una gota de sedimento en un portaobjetos rotulado. Si se realiza una tinción, realizar frotis por extendido.
11. Permitir que la muestra se seque en el agar y sellar con cinta de celulosa (si no hay disponibilidad, utilizar Parafilm, con una vuelta a la placa es suficiente para sellar, evitar contaminantes y permitir el paso de oxígeno para el hongo)
12. Incubar las placas a 30 ± 2 °C de 3 a 4 semanas.

Muestras de biopsia transbronquial

1. Revisar las condiciones de la muestra, por lo general son muestras muy pequeñas, se trata apenas del tejido obtenido con una punción de aguja.
2. Colocar la muestra en una placa de Petri estéril con unas pocas gotas de solución salina (puede ser la misma solución en que se transportó la muestra).
3. Cortar la biopsia con el filo del bisturí en pedazos pequeños sin macerar. Las biopsias no deben macerarse, ya que esto puede ocasionar la ruptura de las estructuras fúngicas, lo que puede llevar a falsos negativos. Si la muestra es en exceso pequeña trabajarla sin cortar. (Aunque en este caso debe hacerse la nota en el reporte, ya que existe menos posibilidad de obtener posibles agentes fúngicos). Si se cuenta con el suficiente material, se debe separar una porción pequeña para el examen directo. En muestras escasas priorice el cultivo.
4. Sembrar los fragmentos de tejido obtenidos en agar SGC, colocándolos en el centro del agar, sin utilizar los bordes de la placa. Pueden hundirse ligeramente, sin perforar el medio. No deben inocularse secciones del tejido muy grandes, inoculando fragmentos pequeños se aumenta la exposición de la muestra al medio de cultivo y se favorece el crecimiento fúngico en las placas. Se recomienda mínimo de 3 a 5 fragmentos del tejido por medio de cultivo de ser posible
5. Sembrar con la misma técnica el agar MYC. Si la muestra es escasa, sembrar prioritariamente el SGC.
6. Tomar el fragmento reservado para el examen directo, que sea representativo de la muestra, cortarlo aún más finamente. Está porción del material se usa para el examen directo (KOH, blanco de calcoflúor, tinción de Gram, tinción de Giemsa).
7. Colocar ese material cortado en un portaobjetos rotulado para el examen directo. En el caso de biopsias es buena práctica preparar un segundo frotis para realizar tinciones complementarias.
8. Sellar los medios con cinta de celulosa (si no hay disponibilidad, utilizar Parafilm, con una vuelta a la placa es suficiente para sellar, evitar contaminantes y permitir el paso de oxígeno para el hongo)

9. Incubar las placas a 30 ± 2°C de 3 a 4 semanas.

Examen directo (4,5,6)

KOH

Colocar una gota de KOH 10 % sobre la preparación de la muestra en el portaobjetos, sustituya por blanco de calcoflúor según la disponibilidad. Colocar un cubreobjetos sobre la preparación. Observar a microscopía de luz a 200X y 400X para analizar la presencia de estructuras fúngicas de importancia.

*Variación: en algunos casos resulta válido digerir primero la muestra con KOH y posteriormente colocar el blanco de calcoflúor para observar en el microscopio de fluorescencia.

Estas técnicas se encuentran descritas con mayor claridad en el Módulo 1 de este Manual.

Nota:

1. Los hongos se pueden visualizar en microscopio de luz, sin embargo, es importante tomar en cuenta que las células y detritus pueden generar falsos negativos, ya que pueden enmascarar la presencia de estructuras fúngicas.
2. Es importante mencionar que se pueden formar artefactos en el KOH, en especial estructuras que simulan a blastosporas, por lo que las tinciones fluorescentes ayudan a confirmar estos hallazgos.

Otras tinciones

En el caso de utilizar otras tinciones como los derivados de Romanowsky (Wright, Giemsa), tinción de Gram o Ziehl Neelsen seguir los procedimientos habituales que se llevan a cabo en cada laboratorio para su procesamiento. Este manual cuenta con una sección del procedimiento sugerido para cada tinción. (Refiérase al Módulo 1)

Cuadro 10.2 Interpretación del examen directo en muestras respiratorias (4,5)		
Patología	**Observación del examen directo** (2,3,4,5)	**Interpretación y observaciones** (3,4,5)
Paracoccidioidomicosis	Observación de blastosporas 5 - 60 µm, multigemantes con base de implantación estrecha. Se pueden observar blastosporas de distintos tamaños, blastosporas en forma de timón de barco y de aspecto de "Mickey Mouse"	Reportar "se observan blastosporas multigemantes de *Paracoccidioides* spp." Reportar el cultivo pendiente.
Histoplasmosis	En el Giemsa o en la tinción de Gram se pueden observar blastosporas intracelulares de 2 - 5 µm con aspecto de "media luna" (se observan mejor en una tinción con derivados de Romanowsky que con la tinción de Gram). En KOH son prácticamente no observables. En Blanco de calcoflúor, no se percibe la característica de "media luna", únicamente se distinguen por tamaño y forma lenticular,	Reportar blastosporas semejantes a *Histoplasma capsulatum* e indicar que el cultivo está pendiente hasta que haya crecimiento del agente causal. Ante la sospecha de histoplasmosis se recomienda realizar una búsqueda del agente causal en otros sitios como sangre periférica, médula ósea, muestras de tracto respiratorio inferior, esto según sea el caso y la sospecha clínica.
Criptococosis	Se observan blastosporas redondas con cápsula 2- 15 µm en la tinción de Gram, tinta china o inclusive se pueden observar con cápsula en el KOH (ocasional y de difícil observación). En blanco de calcoflúor la cápsula se observa muy discretamente.	Ante la sospecha de criptococosis lo ideal es realizar una tinta china. Se recomienda realizar también una inmunocromatografía de flujo lateral en muestras de suero, LCR, plasma según sea el caso. Esto se coordina con los centros hospitalarios que cuentan con estas plataformas.

Aspergilosis	Se observan hifas septadas hialinas, en ramificaciones usualmente en ángulo de 45 °. Las hifas suelen ser de ancho uniforme, sin constricción en los septos y el último compartimento en el ápice presenta forma cilíndrica.	Reportar la presencia de micelio y el cultivo pendiente. Tener especial atención con estos cultivos a fin de identificar el agente lo antes posible.
Pneumocystosis	Se observan estructuras quísticas esféricas, normalmente en grumos. Poseen una pared muy delicada, por lo que suelen verse casi transparentes con un aspecto interior de "paréntesis o comillas". Pueden verse trofozoítos o quistes dependiendo del estado evolutivo.	Son microorganismos bastante difíciles de observar en cualquiera de las tinciones. Se sugiere aplicar adicionalmente otras técnicas diagnósticas como inmunofluorescencia y PCR. Ante la sospecha, se sugiere contactar con Laboratorios de Hospitales clase A que cuenten con Micólogo especialista, para coordinar envío de muestra.
***Candida* spp.**	Se observan blastosporas de tamaño variable desde 2.5 a 7.5 µm, siendo *N. glabratus* (*C. glabrata*) la más pequeña de 2.5 a 4 µm. Presentan por lo general una sola gemación, con base ligeramente ancha. Se pueden observar hifas septadas con constricción en la zona de los septos, pueden tener gemaciones en el sitio del septo y usualmente el último compartimento hacia el ápice es redondo.	Reportar observación de micelio y/o blastosporas semejantes a *Candida* spp. La importancia de este hallazgo se evalúa en el caso particular de cada paciente y corresponde al criterio médico en cada caso. Sin embargo, debe reportarse.
Otros hongos filamentosos	Se pueden observar micelio septado correspondiente a otros géneros. O incluso micelio cenocítico o con septos muy espaciados, hifas anchas, de grosor variable que tienden a doblarse sobre sí.	Es poco frecuente encontrar hongos pertenecientes al orden de los mucorales en infecciones respiratorias. Sin embargo, como suelen causar infecciones en senos paranasales eventualmente podrían

		encontrarse en muestras respiratorias. *Fusarium* spp., *Penicillium* spp., *Paecylomyces* spp., a pesar de que pueden ser contaminantes, si se encuentra un examen directo positivo con crecimiento de estos agentes y un cuadro clínico sugestivo, forman parte de los agentes causantes de micosis respiratorias.
Schizophyllum commune	Se observan hifas septadas hialinas. Sin características particulares	Es de importancia clínica con baja frecuencia.
Otros hongos levaduriformes	Se pueden observar blastosporas similares a las de *Candida* spp., artrosporas o incluso micelio artroblastosporado, aunque no es frecuente.	*Geotrichum* y *Trichosporon* son dos géneros de baja frecuencia, pero que deben reportarse en muestras respiratorias, especialmente por su capacidad de formar biopelículas que pueden adherirse a tubos endotraqueales.
Talaromicosis	Se observan blastosporas intracelulares pequeñas de 3 - 6 µm que recuerdan artrosporas, de forma elongada y tienen un característico septo interno.	No es una micosis endémica de nuestra región. Prestar atención en pacientes extranjeros o con historial de viajes al sureste de Asia, y por lo general con inmunosupresión.
Blastomicosis	Se observan blastosporas unigemantes grandes 8 a 15 µm, con base de implantación ancha y usualmente la blastospora madre y la hija llegan a alcanzar el mismo tamaño unidas aún.	No es una micosis endémica de nuestra región. Prestar atención en pacientes extranjeros o con historial de viajes a Norteamérica (Canadá, Estados Unidos del este, cercanos a los ríos Mississippi y Ohio, incluso hay reportes autóctonos en Israel, países africanos del este y la India)

Coccidioidomicosis	Se observan esférulas de tamaño variable de 10 a 80 µm que contienen endosporas. Pueden haber esférulas estériles (sin endosporas). No tienen gemación y rara vez filamentizan.	No es una micosis endémica de nuestra región. Prestar atención en pacientes extranjeros o con historial de viajes a zonas desérticas de la frontera de México y Estados Unidos, algunas partes de Guatemala, El Salvador, Honduras y Nicaragua o procedentes de la cordillera árida del norte de Argentina.
Otras patologías no fúngicas	**Observación del examen directo**	**Interpretación y observaciones**
Actinomicosis y nocardiosis	Observación de bacterias ramificadas únicamente	Reportar probable actinomicosis o nocardiosis. Reportar cultivo pendiente. Realizar tinción para evidenciar ácido de resistencia (Ziehl Neelsen)

NOTA:

- En el caso de observar bacterias ramificadas se recomienda realizar una tinción de Ziehl Neelsen, en caso de observar filamentos alcohol ácido resistentes o con reacción variable irregular, reportar la presencia sugestiva de bacterias del género *Nocardia* sp. la confirmación depende del crecimiento del cultivo (agar sangre y chocolate). Las bacterias del grupo de Actinomyces son alcohol ácido sensibles (4).
- Ante la posibilidad de encontrarse con un examen directo sugestivo de una micosis de baja incidencia y no tener completa seguridad del hallazgo, consultar con los Especialistas en Micología.
- **En todos los casos la observación y el reporte del examen directo debe guardar relación con el cuadro clínico. Se debe realizar un análisis individualizado de cada caso y describir únicamente lo que se observa y de lo cual no hay duda, esto para evitar confusiones en el diagnóstico. Se sugiere**

mantener estrecha comunicación con los especialistas en Micología para el análisis de los casos complejos y dudosos.

- El uso de pruebas de diagnóstico molecular debe ser llevado a cabo con precaución y valoración de cada caso individual. No siempre la detección de copias de material genético en la muestra indica necesariamente infección. Debe utilizarse de manera complementaria a otros hallazgos clínicos o de laboratorio, y apegarse a las guías vigentes de consensos internacionales sobre cada micosis así como seguir las recomendaciones de uso de la casa comercial que facilita la prueba.

Análisis e interpretación de cultivos

- Es importante determinar la identidad del crecimiento en las placas y diferenciar entre hongos colonizantes, contaminantes y patógenos. Es importante tomar en cuenta la clínica del paciente y el resultado del examen directo al momento de analizar los cultivos.

- Se debe de observar el crecimiento del hongo a partir del sitio de inoculación realizado, de lo contrario el crecimiento debe considerarse como un posible contaminante.

- La significancia clínica de un aislamiento siempre dependerá de:

    a. La capacidad que tiene microorganismo de causar enfermedad
    b. El tipo de aislamiento y el método de obtención de la muestra (por ejemplo, un aislamiento de una muestra respiratoria profunda como lavado bronquioalveolar, posee mayor significancia)
    c. El estado inmune del paciente o el tratamiento con inmunosupresores
    d. La historia clínica del paciente, la posible exposición al microorganismo aislado y el historial de viajes
    e. La visualización de un examen directo positivo (este hallazgo no está siempre presente en las infecciones respiratorias)

f. La presencia del microorganismo en otros sitios anatómicos
g. La cuantificación del aislamiento es decir la cantidad de colonias aisladas del agente
h. Otros métodos indirectos que validen la presencia de una infección fúngica sistémica, como las Galactomananas por *Aspergillus* o las 1,3-β-D-glucanas.
i. El aislamiento de hongos filamentosos saprofíticos comunes debe evaluarse críticamente, ya que con frecuencia corresponden a colonización o contaminación.

- Los cultivos de muestras respiratorias, SIEMPRE, deben ser abiertos dentro de la cámara de flujo, por la posibilidad de aislar agentes de fácil transmisión aerógena.
- Para la identificación de las blastosporas se debe de hacer uso del sistema automatizado para ID disponible en el centro de salud. Por su parte la identificación de los hongos filamentosos se basa en la observación de las características tanto macroscópicas como microscópicas.

Nota: En algunas ocasiones la identificación mediante métodos bioquímicos o por observación de las características macroscópicas y microscópicas de un hongo no son suficientes para lograr una correcta identificación del microorganismo, ya sea blastosporas u hongo filamentoso. En dichos casos se pueden usar otras metodologías como el sistema MALDI-TOF, que pueden ser útiles en casos de difícil identificación.

Características macroscópicas

Tomar en consideración:

1. Producción de pigmento en la placa.
2. Color de la colonia.
3. Aspecto de la colonia (algodonosa, pulverulenta, harinosa, entre otros).
4. Tiempo de incubación.

Características microscópicas

- Realizar el montaje de colonias sospechosas en azul de lactofenol o lactofenol claro según sea el caso.
- Para la observación de las características microscópicas del cultivo, se puede tomar una porción de la colonia con asa micológica entre porta y cubreobjetos con lactofenol claro o azul, según corresponda. Alternativamente, se puede realizar un montaje con cinta adhesiva y lactofenol.
- Estas técnicas se encuentran descritas con mayor claridad en el Módulo 1 de este Manual.

Cultivo de las muestras:

- A partir de muestras respiratorias pueden aislarse una variada posibilidad de microorganismos fúngicos, muchos de ellos ambientales. Por lo que deben tomarse en consideración al momento de la lectura de los cultivos, ya que algunos no contarán con relevancia al momento de la lectura.
- Es importante verificar la concordancia entre lo observado en el examen directo y el crecimiento en cultivo. En muestras escasas donde el frotis no fue adecuado, se debe priorizar el resultado del cultivo.
- Si se obtiene crecimiento de hongos levaduriformes se procede a identificarlos por métodos bioquímicos, proteínicos o moleculares, según el alcance en el sitio de trabajo.
- Si son hongos filamentosos realizar montaje de las colonias en azul de lactofenol o lactofenol claro, según corresponda, por el tipo de colonia (fuliginosas o hialinas).

Revisar la morfología macro y microscópica para llegar a una identificación de especie, o género al menos. (8)

- La presencia de múltiples colonias de un mismo hongo apoya su relevancia clínica, así como su recuperación en cultivos diferentes. A su vez es importante considerar el crecimiento de hongos ambientales sin relevancia clínica producto de la técnica poco invasiva de muestreo.

- En el caso de crecimiento de *Candida* spp. al ser microbiota en tracto respiratorio puede tratarse de un cuadro de colonización, reportar únicamente si hay crecimiento de más de 5 colonias en las placas y es una muestra de tracto respiratorio inferior. No es necesario realizar identificación de especie ni PSA. En estos casos el reporte sirve para el "Score *Candida* spp.", por lo que es suficiente con reportar *Candida* spp. El hallazgo es más significativo si el examen directo es también positivo.

- Si el crecimiento inicial no tiene estructuras de reproducción (conidióforos, esporangióforos, conidias, esporas, …) que permitan su identificación, pueden realizarse subcultivos a medios poco enriquecidos como agar avena, agar papa dextrosa. (consultar el Módulo 1)

- Si se cuenta con la tecnología de espectrofotometría de masas, se puede realizar el montaje para confirmación de la identidad del aislamiento.

NOTA: TRABAJAR LOS AISLAMIENTOS CLÍNICOS EN CÁMARA DE BIOSEGURIDAD, ESTO POR EL RIESGO DE MANIPULAR PATÓGENOS FÚNGICOS DE TRANSMISIÓN AÉREA

Cuadro 10.3 Observación del cultivo de muestras respiratorias (7,8)

Micosis	Aspecto macroscópico del cultivo	Morfología microscópica colonial	Observaciones
Paracoccidioidomicosis	Colonia blanca o crema, de aspecto variable tipo *Trichosporon* o filamentosa o una mezcla de ambos. Plegable y de lento crecimiento, inclusive hasta 6 semanas.	Clamidospora y microconidios no característicos	El examen directo es diagnóstico de la enfermedad. Corresponde a un hongo termodimórfico. Si se cultiva a 37 °C se obtiene la fase levaduriforme.
Histoplasmosis	Colonias algodonosas blanquecinas con pigmento amarillo o rojizo. Tienen aspecto de "dermatofito" (30 °C). El crecimiento puede durar hasta 6 semanas.	Micelio hialino septado con macroconidios tuberculados o no tuberculados.	Corresponde a un hongo termodimórfico. Si se cultiva a 37 °C se obtiene la fase levaduriforme.
Criptococosis	Colonias levaduriformes de aspecto lechoso	Blastosporas con, sin o poca cápsula	Se debe corroborar la especie por espectrometría de masas. Los sistemas de identificación bioquímicos y automatizados no distinguen *Cryptococcus neoformans* de *Crptococcus gattii.*
Aspergilosis	Colonias de rápido crecimiento, cada una con características específicas dependiendo de la especie.	Características microscópicas particulares dependen del microorganismo aislado. En general, micelio hialino septado	En algunas especies se requiere de identificación por proteómica o genómica para separar complejos.

		con conidióforos complejos completa o parcialmente llenos de fiálides, con conidias redonda u ovales.	Aunque en la práctica clínica la identificación hasta complejo es suficiente.
Pneumocystis jirovecii	No cultivable		
***Candida* spp.**	Colonias levaduriformes, serosas, brillantes, con o sin micelio sumergido en el agar, circunscritas, redondas.	Las características microscópicas dependen del microorganismo aislado. En general, blastosporas de 2.5 a 7.5 µm redondas o alargadas que pueden formar micelio.	Utilizar pruebas bioquímicas automatizadas para identificación. En algunos casos se requiere confirmación proteómica.
Orden Mucorales	Colonias de rápido crecimiento de aspecto algodonoso blanco u oscuro	Las características microscópicas dependen del microorganismo aislado. En general, micelio cenocítico con esporangióforos de diversos tamaños y formas, variable según el género del mucoral.	Reportar hasta género. En algunas especies son requeridas técnicas especiales de esporulación, identificación proteómica o genómica.
***Penicillium* spp.**	Colonias planas, aterciopeladas y rugosas. Con distintas tonalidades desde cafe oscuro a verde o amarillo con pigmento difuso y borde blanco en la periferia.	Micelio septado hialino, con conidióforos ramificados y conidias en cadena. El tipo de métulas y fiálides define las especies.	Reportar hasta género. Se puede hacer proteómica para identificar especie.
***Fusarium* spp.**	Colonias blancas algodonosas inicialmente que luego desarrollan pigmentos desde rosados, violetas o anaranjados. Se desarrolla rápidamente, en unos 4 días.	Micelio septado hialino con conidióforos simples que producen conidias fusiformes septadas de 3 a 5 septos, como	Reportar hasta género. Se pueden seguir claves dicotómicas para la identificación de

		"bananos". Pueden observarse macro y microconidias, así como clamidospora intercalares.	especie, cuando son insuficientes se puede hacer proteómica, aunque no se distinguen todos los complejos.
Schizophyllum commune	Colonias blancas, levantadas, algodonosas. Con un olor característico a metano. Puede formar basidiocarpos.	Micelio hialino septado con conexiones en hebilla completas o incompletas.	Si las características no son claras, puede usarse proteómica para su identificación, ya que hay variaciones macro y microscópicas dependiendo si está dicarionte o monocarionte.
Blastomicosis	Colonias levaduriformes inicialmente, que filamentizan con micelio aéreo blanco que luego se torna café. (30 °C) La fase levaduriforme ocurre a 37 °C con colonias cerosas, crema o beige, arrugadas o agrumadas. (crece mejor en medios especiales BHI)	Micelio septado hialino, con conidióforos simples en la punta del ápice o a lo largo de la hifa, similar a *Scedosporium* spp.	Micosis no endémica en nuestra región. Hallazgos sospechosos referirlos al Laboratorio de Referencia. Tratar los cultivos con extremas medidas de bioseguridad.
Cocciodioidomicosis	Colonias blancas algodonosas por lo general, pero con gran variación. Crecen en 10 días, aunque puede durar hasta 2 semanas.	Micelio artrosporado, con artrosporas "aladas" por los remanentes de pared en forma de "barril". El micelio es alternado con compartimentos vacíos y llenos.	Micosis no endémica en nuestra región. Hallazgos sospechosos referirlos al Laboratorio de Referencia. Tratar los cultivos con extremas medidas de

			bioseguridad, de preferencia no cultivar si se tiene certeza del examen directo.
***Trichosporon* spp.**	Colonias levaduriformes, primero húmedas, crema y suaves. Luego se tienden a arrugar hacia la periferia y hacerse polvorientas. Apariencia cerebriforme.	Micelio artroblastosporado hialino.	Utilizar pruebas bioquímicas automatizadas para identificación, solo para *T. asahii*. Las demás especies requieren confirmación proteómica. Enviar al hospital de la red CCSS correspondiente.
***Geotrichum* spp.**	Colonias levaduriformes blancas, húmedas. Se puede ver el micelio sumergido. A veces con el tiempo pueden desarrollar una apariencia de algodón.	Micelio artrosporado hialino. Son hifas que separan sus compartimentos y tienen forma de barril o rectangular.	Reportar hasta género. En algunas especies son requeridas técnicas especiales de identificación proteómica o genómica.
Otras patologías no fúngicas	**Aspecto macroscópico del cultivo**	**Morfología microscópica colonial**	**Observaciones**
Actinomicosis	Se observan pequeñas masas amarillentas	Bacterias filamentosas con formas cocoides y bacilares.	Utilizar medio de tioglicolato y/o sembrar en anaerobiosis. Para la identificación de cada especie debe enviarse la muestra a

			hospitales que cuenten con MALDI-TOF o al Centro de Referencia, esto dependerá de cada caso
Nocardiosis	Colonias limitadas,secas y rugosas. De coloración blanca a amarillenta-naranja	Bacterias filamentosas alcohol ácido resistentes o variables con la tinción de Ziehl Neelsen.	Sembrar en agar sangre de cordero al 5%, agar chocolate o ATS. Se puede utilizar Sabouraud sin antibióticos. NO debe sembrarse en micosel. Para la identificación de cada especie debe enviarse la muestra a hospitales que cuenten con MALDI-TOF o al Centro de Referencia, esto dependerá de cada caso.

Tiempo de incubación

Las placas se deben de incubar por 3 semanas, sin embargo, en casos muy sugestivos puede extenderse a seis semanas.

Para pacientes con inmunosupresión y/o exámenes directos positivos por *Histoplasma capsulatum*, es conveniente esperar hasta 4 - 6 semanas.

En caso de alguno de los agentes no endémicos de la región también esperar 4 - 6 semanas.

Lectura de placas

Cuadro 10.4 Tiempos de lectura de placas de cultivo por hongos (4)

Lectura	Observaciones
● Dos veces a la semana la primera semana ● Una vez por semana durante 3 semanas o el resto del tiempo	Para que un aislamiento sea considerado de importancia debe mostrar crecimiento sobre el sitio de inoculación en el agar. Y por lo general, se trata de muestras con un solo aislamiento.

FASE POSTANALÍTICA

Reporte de resultados

Reporte de examen directo

1. En el examen directo reportar según las características observadas:
    a. **“Se observa micelio hialino septado.”**
    b. **“Se observa micelio espaciadamente septado.”**
    c. **“Se observan blastosporas multigemantes de *Paracoccidioides* spp.”**
    d. **“Se observan blastosporas intracelulares semejantes a *Histoplasma capsulatum*.”**
    e. **“Se observa micelio y blastosporas semejantes a *Candida* spp.”**
    f. **“Se observan esférulas de *Coccidioides* spp.”**
    g. **“Se observan blastosporas de *Blastomyces* spp.”**
    h. **“Se observan estructuras de *Pneumocystis jirovecii*.”**

2. En la tinción de Gram reportar según las características observadas:
    a. **“Se observan bacterias ramificadas”**
3. En la tinción de Ziehl Neelsen reportar según las características observadas:

a. **"Se observan bacterias filamentosas ramificadas parcialmente alcohol-ácido resistentes semejantes a *Nocardia* spp."**
b. **"Se observan bacterias filamentosas ramificadas alcohol-ácido sensibles semejantes a Actinomicetes."**
c. **"No se observan bacterias filamentosas ramificadas alcohol-ácido resistentes."**

4. Si al examen directo no se observan estructuras fúngicas, reportar:
   a. **"No se observan estructuras fúngicas."**

Reporte de cultivo

1. Si el cultivo está negativo y el examen directo está negativo, reportar:
   a. **"Cultivo negativo por hongos"**

2. Si se logra aislar el agente causal e identificarlo, reportar:
   a. **"Positivo por (género y especie) o sólo género"**

3. Si se logra aislar varios agentes causales e identificarlos, reportar:
   a. **"Positivo por: (género y especie) o sólo género**
      (género y especie) o sólo género"

4. Si el cultivo está negativo y el examen directo está positivo, reportar:
   a. **"No se obtuvo crecimiento del agente causal"**

5. Si se observa crecimiento de 1 o más microorganismos que no se consideran importancia clínica, reportar:
   a. **"Cultivo negativo por hongos"**

REFERENCIAS

1. Lease ED, Alexander BD. Fungal diagnostics in pneumonia. In: Seminars in respiratory and critical care medicine. © Thieme Medical Publishers; 2011. p. 663–72.
2. Douglas AP, Smibert OC, Bajel A, Halliday CL, Lavee O, McMullan B, *et al*. Consensus guidelines for the diagnosis and management of invasive aspergillosis, 2021. Intern Med J. 2021; 51:143–76.
3. Bonifaz A. Micología Médica Básica. 6ta ed. Ciudad de México: McGraw-Hill interamericana editores; 2020.
4. Wengenack NL. CLSI M54 Principles and Procedures for Detection and Culture of Fungi in Clinical Specimens. 2da ed. Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI); 2021.
5. Leber AL (Ed.). Clinical Microbiology Procedures Handbook. 4ta ed. Washington, D.C.: American Society for Microbiology (ASM); 2024.
6. Gross N, Salas Campos I. Métodos diagnósticos en Micología Médica. 1ra ed. 2da reimpresión. San José, Costa Rica: Editorial UCR; 2015.
7. Westblade LF, Burd EM, Lockhart S, Procop GW. Larone´s Medically Important Fungi. 7ma ed. Washington DC: Wiley, ASM Press; 2023.
8. Hoog GS de, Guarro J, Gene J, Figueras MJ. Atlas of Clinical Fungi. 4ta ed. Utrecht, Países Bajos: Westerdijk Institute; 2021.

Módulo 11: Diagnóstico micológico de infecciones del Sistema Nervioso Central

FASE PREANALÍTICA

Solicitud de análisis: Cuadros clínicos asociados

Las infecciones del Sistema Nervioso Central (SNC) son infecciones que ponen en riesgo la vida de la persona, por lo que el análisis del líquido cefalorraquídeo (LCR) debe de ser prioritario en el laboratorio. Las meningitis causadas por hongos suelen clasificarse con un desarrollo subagudo o crónico, se manifiestan con fiebre, malestar general, cefalea, letargo, confusión y cuello rígido. La infección puede llegar a complicarse con afectación de los pares craneales, trombosis e infarto cerebral, microabscesos corticales y subcorticales (1,2).

En el caso de las meningitis causadas por hongos, el agente etiológico más común son las blastosporas pertenecientes al complejo de especies *Cryptococcus neoformans/Cryptococcus gattii.* También se deben de considerar otras micosis sistémicas que pueden diseminar hacia Sistema Nervioso Central, tales como *Candida* spp., *Aspergillus* spp., *Histoplasma capsulatum*., *Coccidioides* spp., mucorales y hongos negros (1,3).

Diagnóstico diferencial

Infecciones por bacterias, virus, parásitos, enfermedades autoinmunes, sarcoidosis, linfomatosis de las meninges (1,4).

Muestras clínicas, transporte y conservación

Con el fin de poder realizar un diagnóstico adecuado y brindar el tratamiento correcto, se debe de realizar una correcta toma de muestra.

Tabla Resumen. Información requerida para el procesamiento	
Datos del paciente	-Nombre completo, número de identificación, sexo y fecha de nacimiento. -Posible diagnóstico o cuadro clínico. -Fecha de inicio de síntomas. -Terapia recibida. -Lugar de procedencia.
Datos de la muestra	-Fecha y hora de la toma de muestra. -Técnica de obtención de la muestra. -Sitio de la toma de muestra. -Tipo de muestra. -Servicio que envía la muestra. -Responsable de la toma de muestra.
Muestras clínicas indicadas	
-Líquido cefalorraquídeo por punción lumbar realizada por el personal médico. -Líquido cefalorraquídeo recolectado a partir de dispositivos implantados desde el Sistema Nervioso Central (5). -Biopsias.	
Criterios de rechazo	
-Debido a la naturaleza crítica de la muestra, la misma no se puede rechazar. Si hace falta algún dato de los mencionados anteriormente, el personal de laboratorio debe de llamar al servicio y recabar la información faltante (5). -Muestra enviada en recipiente no estéril.	
Observaciones	
-Las muestras de SNC deben de ser tomadas siempre que sea posible previo a la administración de antifúngicos. -En el caso de estas muestras su procesamiento debe ser de manera preferencial el mismo día, en condiciones ideales dentro de las dos primeras horas, para obtener óptimos resultados en la identificación y recuperación de agentes etiológicos, ya que la demora en el procesamiento de estas muestras puede resultar en un crecimiento excesivo de contaminantes bacterianos e impedir la recuperación de patógenos fúngicos (1,2).	
Recipiente indicado para la recolección	
-Tubo estéril con tapa rosca	

Condiciones de transporte
-Las muestras de SNC deben de ser transportadas al laboratorio clínico de inmediato a temperatura ambiente (6). -Las muestras no deben de refrigerarse (5). -Las muestras de LCR deben de procesarse de manera prioritaria (5). -Las biopsias idealmente deben de ser enviadas con una pequeña cantidad de solución salina estéril 0.85 %.

FASE ANALÍTICA

Consideraciones generales de procesamiento de muestras de SNC

Es importante trabajar las muestras en un ambiente aséptico para evitar la contaminación con hongos ambientales. Se recomienda el procesamiento en cámara de flujo laminar o con mechero, de ser posible utilizar cubrebocas y no hablar encima de las muestras para no contaminarlas.

Cuadro 11.1 Equipos e insumos requeridos

Activos base	Analizadores base	Activos adicionales
Cámara de bioseguridad Incubadora a 30 °C (o caja en un cuarto a temperatura ambiente en su defecto) Centrífuga ventilada para tubos cónicos de 15 mL o 50 mL (con alcance de 3000 rpm)	Microscopio de luz, con objetivos de 10X, 20X, 40X y 100X Sistema automatizado para ID y PSA	Sistema MALDI-TOF[1] Microscopio de fluorescencia[1]
Medios de cultivo	**Insumos**	**Pruebas complementarias**
Agar Sabouraud glucosado (SDA)[2] Agar Mycosel (MYC) Agar Sabouraud con antibiótico (SGC)	Portaobjetos Cubreobjetos Azul de lactofenol Lactofenol claro Tinta China KOH 10 - 20 % Tinción de Gram	Blanco de calcoflúor[1] Técnicas moleculares[1] Prueba de detección de antígeno capsular de *Cryptococcus*[1]

	Reactivos para tinción con algún derivado de Romanowsky (Wright, Giemsa) Asa bacteriológica Bisturí Hoja para bisturí Placa de Petri estéril	

1. Según la disponibilidad en el centro de salud
2. Para los LCR se recomienda realizar el cultivo únicamente en SDA

Procesamiento de la muestra para diagnóstico micológico

Procesamiento de LCR

1. El procesamiento de las muestras de LCR varía según el volumen de muestra que se reciba. Se recomienda un mínimo de 1 mL para poder realizar el examen directo y cultivo (6).
2. Centrifugar a 1000 - 1500 rpm por 10 - 15 minutos. Si se envían menos de 2 mL de muestra no se recomienda la centrifugación de la muestra (6).
3. En caso de que la muestra presente un coágulo, cortar en pedazos más pequeños con un bisturí (6), de manera similar a como se procesan los tejidos y biopsias que se reciben en el laboratorio clínico.
4. Guardar el sobrenadante de la muestra, ya sea para realizar las pruebas bioquímicas o la detección de antígenos capsulares de *Cryptococcus* spp., según la cantidad de tubos que se hayan enviado y las pruebas que haya solicitado el médico tratante.
5. A partir del sedimento se realiza el examen directo y el cultivo de la muestra.

Procesamiento de biopsias

1. Las biopsias no deben macerarse de forma brusca ya que esto puede ocasionar la ruptura de las estructuras fúngicas, lo que puede llevar a falsos negativos.
2. Cortar la muestra en fragmentos más finos, no deben inocularse secciones del tejido muy grandes, inoculando fragmentos pequeños se aumenta la exposición de la muestra al medio de cultivo y se favorece el crecimiento fúngico en las placas. Se recomienda mínimo de 3 a 5 fragmentos del tejido por medio de cultivo de ser posible (6).
3. Tomar un corte del tejido, que sea representativo de la muestra, cortarlo aún más finamente. Está porción del material se usa para el examen directo (KOH, blanco de calcoflúor, tinción de Gram, tinción de Giemsa).

Examen directo

Tinta China

Tras centrifugar la muestra de LCR, colocar una gota de la muestra en un portaobjetos, añadir una gota de la tinta china, mezclar con el sedimento usando un cubreobjetos y colocarlo sobre la muestra.

KOH

En casos específicos en los que exista la sospecha clínica de una micosis diseminada, se puede realizar un examen directo a partir del sedimento del LCR con KOH (se puede complementar con blanco de calcoflúor), como se describe a continuación.

Colocar una gota de KOH del 10 al 20 % en el portaobjetos y colocar una gota de la muestra sobre el KOH y cubrirla con un cubreobjetos, examinar tras el tiempo indicado según la técnica utilizada.

Nota:

1. La tinta china es la tinción de elección para la observación de los LCR, en especial en muestras que provengan de pacientes con algún tipo de inmunosupresión u otro factor de riesgo para la infección por *C. neoformans* /*C. gattii* (3,5).
2. En caso de que la preparación con tinta china haya quedado muy oscura, se puede colocar una gota de agua en un lado del cubreobjetos y un pedazo de papel del otro extremo, para formar una gradiente de la tinta china, lo que va a aclarar la preparación (5).
3. Para biopsias de cerebro se recomienda la realización de una tinción de Gram, ya que con el KOH se producen artefactos que pueden confundir al personal que esté observando el examen directo (7).
4. Hay algunos hongos que presentan baja fluorescencia.
5. **En todos los casos la observación y el reporte del examen directo debe guardar relación con el cuadro clínico. Se debe realizar un análisis individualizado de cada caso y describir únicamente lo que se observa y de lo cual no hay duda, esto para evitar confusiones en el diagnóstico. Se sugiere mantener estrecha comunicación con los especialistas en Micología para el análisis de los casos complejos y dudosos.**

Cuadro 11.2 Posibles resultados que se pueden obtener al visualizar la tinta china	
Estructura observada en la tinta china	**Posible agente etiológico (se debe de esperar al resultado del cultivo para confirmar diagnóstico)**
Blastosporas encapsuladas, 2 - 15 µm	*C. neoformans* /*C. gattii*

Cuadro 11.3 Posibles resultados que se pueden obtener al visualizar el examen directo	
Estructura observada al examen directo	**Posible agente etiológico (se debe de esperar al resultado del cultivo para confirmar diagnóstico)**
Blastosporas encapsuladas, 2 - 15 µm	*C. neoformans* /*C. gattii*
Micelio hialino septado	*Aspergillus* spp.
Pseudomicelio hialino, micelio y/o blastosporas de 2.5 - 7.5 µm	*Candida* spp.
Blastosporas intracelulares, 2 - 5 µm	*Histoplasma capsulatum*

- Estas técnicas se encuentran descritas con mayor claridad en el Módulo 1 del presente manual.

Cultivo de las muestras:

Inoculación

- De previo a la inoculación de las muestras clínicas, es importante dejar que el medio alcance la temperatura ambiente, este debe secarse para eliminar el exceso de humedad de la superficie.
- Rotular las placas con la identificación en la base.
- Inocular el SDA con el sedimento del LCR obtenido o con la muestra sin centrifugar, dependiendo del volumen de muestra recibido. Se debe colocar la muestra en el centro del agar, hacer una estría en el centro y rayar en tres direcciones, sin tocar los bordes del agar (6).
- Otra opción para inocular la placa es tomar parte del sedimento o muestra sin centrifugar e inocular como gotas en los medios, sin esparcir, esto permite un ambiente más húmedo que favorece la adaptación del hongo al medio (3). Se recomienda realizar 5 inoculaciones y marcar los sitios de dichos inóculos.
- En ambos casos colocar la mayor cantidad de muestra posible (entre 0.25 a 0.5 mL), para aumentar la probabilidad de recuperar el agente etiológico si se encuentra en baja carga (6).

- Como se mencionó anteriormente, en el caso de las biopsias, hacer cortes finos de la muestra, realizar de 3 a 5 inóculos por placa y colocarlos suavemente sobre el agar (6). Para este tipo de muestra se recomienda la utilización de dos agares, el SDA y un agar con antibióticos, según la disponibilidad del centro.
- Luego de inoculadas, las placas deben quedar boca arriba, ya que el volumen de muestra es importante. Se debe dejar que el agar absorba un poco la muestra.
- Sellar las placas con cinta permeable de celulosa o Parafilm para evitar que se sequen o sufran de una infestación de ácaros. Se debe incubar los medios a 30 ± 2 °C en un ambiente aerobio.

Tiempo de incubación

Las placas se deben de incubar por cuatro semanas, sin embargo, si se sospecha de una infección por un hongo dimórfico, como *Histoplasma capsulatum*, el tiempo de incubación se puede extender hasta por 6 semanas (6).

Lectura de placas

Cuadro 11.4 Tiempos de lectura de placas de cultivo por hongos

Lectura	Observaciones
-Diaria durante la primera semana -Una vez por semana durante 4 semanas	Para que un aislamiento sea considerado de importancia debe mostrar crecimiento sobre el sitio de inoculación en el agar.

FASE POSTANALÍTICA

Análisis e interpretación de cultivos

- Es importante determinar la identidad del crecimiento en las placas y diferenciar entre hongos colonizantes, contaminantes y patógenos. Es importante tomar en cuenta la clínica del paciente y el resultado del examen directo al momento de analizar los cultivos.
- Se debe de observar el crecimiento del hongo a partir del sitio de inoculación realizado, de lo contrario el crecimiento debe de ser considerado como un posible contaminante.
- Es importante verificar la concordancia entre lo observado en el examen directo y el crecimiento en cultivo.
- Para la identificación de las blastosporas se debe de hacer uso del sistema automatizado para ID disponible en el centro de salud. Por su parte la identificación de los hongos filamentosos se basa en la observación de las características tanto macroscópicas como microscópicas del hongo.
- Nota: En algunas ocasiones la identificación mediante métodos bioquímicos o por observación de las características macroscópicas y microscópicas de un hongo no son suficientes para lograr una correcta identificación del microorganismo, ya sea blastospora u hongo filamentoso. En dichos casos se pueden usar otras metodologías como el sistema MALDI-TOF, que pueden ser útiles en casos de difícil identificación.
- En el caso de las blastosporas se debe de realizar la identificación y la PSA, de acuerdo a los estándares del CLSI vigentes.
- Se puede recuperar aislamientos de hongos a partir de medios de cultivos para bacterias, como agar sangre, agar chocolate o medios líquidos de enriquecimiento. En dichos casos se recomienda aplicar los mismos criterios que se han mencionado anteriormente.

Características macroscópicas

Tomar en consideración:

1. Producción de pigmento en la placa.
2. Color de la colonia.
3. Aspecto de la colonia (algodonosa, pulverulenta, harinosa, entre otros).
4. Tiempo de incubación.

Características microscópicas

Realizar el montaje de colonias sospechosas en azul de lactofenol o lactofenol claro según sea el caso.

Para la observación de las características microscópicas del cultivo, se puede tomar una porción de la colonia con asa micológica entre portaobjetos y cubreobjetos con lactofenol claro o azul, según corresponda. Alternativamente, se puede realizar un montaje con cinta adhesiva y lactofenol.

1. Tipo de conidias.
2. Tipo de conidióforos.
3. Características del micelio.

Cuadro 11.5 Principales microorganismos aislados de cultivos de LCR

Grupo	Microorganismo
Blastosporas	*Candida* spp. *C. neoformans*/*C. gattii*
Hongos filamentosos hialinos	*Aspergillus* spp., *Fusarium* spp.
Hongos dimórficos	*Histoplasma capsulatum*
Aislados con baja frecuencia	*Scedosporium boydii* (*Pseudallescheria boydii*), levaduras como *Rhodotorula* spp. y algunos hongos negros o fuliginosos como *Exserohilum* spp.

Estas técnicas se encuentran descritas con mayor claridad en el Módulo 1 de este Manual.

Reporte de resultados

Reporte de examen directo

1. En el examen directo reportar según las características observadas:
    a. **"Se observan blastosporas encapsuladas semejantes a *Cryptococcus* spp."**
    b. **"Se observa micelio hialino septado."**
    c. **"Se observan blastosporas semejantes a *Candida* spp."**
    d. **"Se observa micelio hialino septado y pseudomicelio *Candida* spp."**
2. Si al examen directo no se observan estructuras fúngicas, reportar:
    a. **"No se observan estructuras fúngicas."**

Reporte de cultivo

1. Si el cultivo está negativo y el examen directo está negativo, reportar:
    a. **"Cultivo negativo por hongos".**
2. Si se logra aislar el agente causal e identificarlo, reportar:
    a. **"Positivo por (género y especie) o sólo género.**
3. Si se logra aislar varios agentes causales e identificarlos, reportar:
    a. **"Positivo por: (género y especie) o sólo género.**

    (género y especie) o sólo género".

4. Si el cultivo está negativo y el examen directo está positivo, reportar:
    a. **“No se obtuvo crecimiento del agente causal”.**
5. Si se observa crecimiento de 1 o más microorganismos que se consideran que no son de importancia clínica, reportar:
    a. **“Cultivo negativo por hongos”.**

REFERENCIAS

1. Ropper AH, Samuels MA, Klein JP. Adams y Victor. Principios de neurología. 10ma ed. Ciudad de México: McGraw-Hill/Interamericana editores, S.A. de C.V.; 2017.
2. Mahon CR, Lehman DC. Textbook of Diagnostic Microbiology. 7ma ed. St Louis, Missouri. Elsevier Health Sciences; 2022.
3. Gross N, Salas Campos I. Métodos diagnósticos en Micología Médica. 1ra ed. 2da reimpresión. San José, Costa Rica: Editorial UCR; 2015.
4. Bonifaz A. Micología Médica Básica. 6ta ed. Ciudad de México: McGraw-Hill interamericana editores; 2020.
5. Carroll K, Pfaller M. Manual of Clinical Microbiology. Vol. 1. 13ra ed. Washington DC: ASM Press; 2023.
6. Wengenack NL. CLSI M54 Principles and Procedures for Detection and Culture of Fungi in Clinical Specimens. 2da ed. Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI); 2021.
7. Leber AL (Ed.). Clinical Microbiology Procedures Handbook. 4ta ed. Washington, D.C.: American Society for Microbiology (ASM); 2024.

Módulo 12: Diagnóstico micológico de otros fluidos estériles (Líquido peritoneal o ascítico, Líquido de diálisis peritoneal, Líquido articular o sinovial, Líquido pericárdico, Líquido pleural)

FASE PREANALÍTICA

Solicitud de análisis: Cuadros clínicos asociados

Cuando haya datos sugestivos de una micosis que afecta estructuras sinoviales, u otros órganos o cavidades, ya sea de manera directa o por diseminación, se puede realizar un análisis micológico para fluidos estériles (líquido peritoneal o ascítico, líquido de diálisis peritoneal, líquido articular o sinovial, líquido pericárdico y/o líquido pleural) (1).

Este grupo de muestras son recolectadas por personal médico capacitado para su obtención. Durante el procedimiento, la recolección, transporte y procesamiento de la muestra puede ocurrir la contaminación de la muestra. Sin embargo, los hongos aislados a partir de muestras de sitios estériles suelen ser significativos, y ningún hongo aislado de estas muestras debe descartarse o reportarse como “contaminante” sin una investigación detallada (2,3). Como se ha mencionado a lo largo de este manual, el aislamiento de patógenos primarios siempre debe reportarse, independientemente del número de colonias que se observen en los medios de cultivo.

Diagnóstico diferencial

Diversas infecciones causadas por parásitos, virus, bacterias, entre otros (4).

Muestras clínicas, transporte y conservación

Tabla Resumen. Información requerida para el procesamiento	
Datos del paciente	-Nombre completo, número de identificación, sexo y fecha de nacimiento. -Posible diagnóstico o cuadro clínico. -Fecha de inicio de síntomas. -Terapia recibida.

	-Lugar de procedencia.
Datos de la muestra	-Fecha y hora de la toma de muestra. -Técnica de obtención de la muestra. -Sitio de la toma de muestra. -Tipo de muestra -Servicio que envía la muestra. -Responsable de la toma de muestra.

Muestras clínicas indicadas

-Líquido obtenido por aspiración aséptica en un recipiente con tapa de rosca estéril.

-Líquido peritoneal: obtenido por aspiración percutánea (paracentesis), procedimientos quirúrgicos (cirugía abierta) o endoscópicos realizados por personal médico.

-Líquido de efluente (diálisis peritoneal): Obtenido por punción con aguja y jeringa.

-Líquido pleural: toracentesis, fluido recolectado por aspiración del espacio pleural seguido de punción de la pared torácica.

-Líquido pericárdico: pericardiocentesis, con aspiración del líquido mediante una jeringa.

-Líquido articular.

-Se debe recolectar una muestra representativa de 5 a 10 mL, para aumentar las posibilidades de recuperación de cualquier patógeno fúngico (2,3).

-Si el volumen es escaso recolectar al menos 0.5 mL de líquido estéril, para realizar exámenes directos, tinciones y cultivos (1).

Criterios de rechazo

-Muestras que su rotulación sea inadecuada o no coincida con los datos de la orden médica.

-Muestras enviadas en hisopos no son adecuadas para la recuperación de hongos (2).

-Muestras que no estén rotuladas.

- Muestras con más de 48 horas de recolectadas.

Observaciones

-Siempre que sea posible, para aumentar la probabilidad de recuperación de un organismo fúngico, la muestra debe recolectarse antes de administrar un agente antimicótico.

-Debido a la naturaleza crítica de la muestra, la misma no se puede rechazar. Si hace falta algún dato de los mencionados anteriormente, el personal de laboratorio debe de llamar al servicio y recabar la información faltante (4).

En el caso de estas muestras su procesamiento debe ser de manera preferencial el mismo día, en condiciones ideales dentro de las dos primeras horas, para obtener óptimos resultados en la identificación y

recuperación de agentes etiológicos, ya que la demora en el procesamiento de estas muestras puede resultar en un crecimiento excesivo de contaminantes bacterianos e impedir la recuperación de patógenos fúngicos (1,2).
Recipiente indicado para la recolección
-Recipiente con tapa de rosca estéril o tapón.
Condiciones de transporte
-Las muestras deben transportarse inmediatamente al Laboratorio Clínico en el contenedor donde se recolectó, a temperatura ambiente donde se permita mantenerla en condiciones adecuadas de humedad. -Si el análisis de inmediato no es posible, se recomienda mantener en refrigeración de 4 a 8 °C (5).

FASE ANALÍTICA

Consideraciones generales de procesamiento muestras de fluidos estériles

Es importante trabajar las muestras en un ambiente aséptico para evitar la contaminación con hongos ambientales. Estas muestras deben ser trabajadas en cámara de bioseguridad.

Equipos e insumos requeridos

Cuadro 12.1 Equipos e insumos requeridos para análisis de infecciones en fluidos estériles

Activos base	Analizadores base	Activos adicionales
Cámara de bioseguridad Incubadora a 30 °C (o caja en un cuarto a temperatura ambiente en su defecto) Centrífuga ventilada para tubos cónicos de 15 mL o 50 mL (con alcance de 3000 rpm) Vortex	Microscopio de luz, con objetivos de 10X, 20X, 40X y 100X Sistema automatizado para ID y PSA	Sistema MALDI-TOF[1] Microscopio de fluorescencia[1] Citocentrífuga[1]
Medios de cultivo	**Insumos**	**Pruebas complementarias**
Agar Sabouraud glucosado (SDA) Agar Sabouraud con antibióticos: gentamicina y cloranfenicol[2]	Portaobjetos Cubreobjetos KOH 10 - 20 % Mechero Bunsen, Lámpara de alcohol[2]	Blanco de Calcoflúor[1] Reactivos para tinción con algún derivado de

(SGC) Agar Mycocel (MYC) Medio cromogénico para *Candida* spp.[1]	Asas bacteriológicas Alcohol 70 % Bulbos plásticos	Romanowsky (Wright, Giemsa) Tinta China

1. Según la disponibilidad en el centro de salud.
2. Se recomienda la utilización de este medio sobre el SDA ya que evita el crecimiento de bacterias que pueden afectar la recuperación del hongo, esto aplica a zonas no estériles.

Recolección de la muestra para diagnóstico micológico

1. Por su naturaleza, estas muestras van a ser recolectadas asépticamente por personal médico. El origen de las muestras puede ser de diversas cavidades, ya sea abdominal, pleural, articular o pericárdico, y se van a colocar en recipientes estériles de tapa de rosca o tapón para ser enviadas al laboratorio clínico lo más pronto posible a temperatura ambiente.
2. Una vez que la muestra llega al laboratorio, verificar que los datos personales de la solicitud de análisis micológico correspondan con los datos de la muestra enviada.
3. Revisar además que la muestra enviada venga en un recipiente estéril a temperatura ambiente (2).

Procesamiento de la muestra para diagnóstico microbiológico

Pretratamiento para muestras con volúmenes mayores de 2 mL.

Con el fin de maximizar la recuperación del microorganismo de interés en muestras de difícil obtención como los líquidos estériles, se debe realizar un tratamiento previo, que consiste en concentrar por centrifugación la muestra (2).

1. Centrifugar a 1000 r.p.m. por 15 minutos, para concentrar los elementos fúngicos. (5)

2. Utilizar un bulbo plástico estéril o una micropipeta, para separar cuidadosamente el sobrenadante, se puede pasar a un tubo estéril para realizar otros análisis.

3. El sedimento es el material que se va a utilizar para el examen directo y el cultivo (1)

- Si se observan coágulos en la muestra, previamente, estos deben triturarse con un bisturí estéril y combinarse con el resto del líquido. Luego realizar el procedimiento anterior (6).

Examen directo:

Estas técnicas se encuentran descritas con mayor claridad en el Módulo 1 de este Manual.

KOH

Con una pipeta estéril colocar una gota del sedimento que obtuvo del líquido que está analizando en un portaobjetos, colocar una gota de KOH 10 - 20 % y encima poner un cubreobjetos (5).

Tinción de Giemsa, Wrigth o Gram

1. Rotular un portaobjetos con el número de identificación de la muestra.
2. Utilizar una pipeta plàs estéril colocar una gota del sedimento del líquido que este analizando, realizar un frotis delgado. Si cuenta con una citocentrífuga se recomienda su uso (2).
3. Realizar una tinción de Giemsa, Wrigth o Gram al frotis y observar a 100X en busca de estructuras fúngicas.

Blanco de Calcoflúor

Si se cuenta con los recursos se puede realizar montaje en blanco de calcoflúor con una gota de reactivo y una gota de sedimento y observar en microscopio de fluorescencia.

Tinta China

Colocar una gota del sedimento en un portaobjetos con pipeta estéril, y añadir una gota de la tinta china, mezclar usando un cubreobjetos y colocarlo sobre la muestra.

Nota:

- Se recomienda el uso de la tinta china en muestras que provengan de pacientes con algún tipo de inmunosupresión u otro factor de riesgo para la infección por Complejo *C. neoformans/C. gattii* (4,5).
- En caso de que la preparación con tinta china haya quedado muy oscura, se puede colocar una gota de agua en un lado del cubreobjetos y un pedazo de papel del otro extremo, para formar una gradiente de la tinta china, lo que va a aclarar la preparación (4).
- Es importante mencionar que se pueden formar artefactos en el KOH, en especial la formación de estructuras que simulan a blastosporas, por lo que las tinciones fluorescentes ayudan a confirmar estos hallazgos.
- Hay algunos hongos que presentan baja fluorescencia.
- En todos los casos la observación y el reporte del examen directo debe de correlacionarse con el cuadro clínico y las lesiones en estudio. Se debe realizar un análisis de cada caso individual y describir únicamente lo que se observa y de lo cual no hay duda, esto para evitar confusiones en el diagnóstico. En caso de tener dudas se puede consultar con el especialista en micología que forma parte de la red de apoyo.

Luego de preparar la o las tinciones requeridas para el análisis de la muestra, se observa el examen directo en microscopio de luz con el objetivo de alto aumento (400X). Se pueden obtener los siguientes resultados:

Cuadro 12.2 Resultados que se pueden obtener al visualizar al examen directo	
Estructura observada	**Cuadro clínico sugestivo**

Blastosporas de 2 - 7.5 µm ovaladas o redondeadas, gemantes con pared delgada, sin cápsula, acompañadas o no de pseudomicelio y/o micelio.	*Candida* spp.
Blastosporas encapsuladas	*Complejo C. neoformans/C. gattii*
Blastosporas intracelulares	*Histoplasma capsulatum*
Micelio hialino septado	Infección por hongos filamentosos hialinos
Micelio fuliginoso septado	Infección por hongos filamentosos fuliginosos
Micelio cenocítico (hifas gruesas dicotómicas sin septos)	Infección por hongos mucorales
Esporangios de diversos tamaños (6 - 26 µm), escasas endosporas y sin gemaciones (5). Colonia de aspecto levaduriforme.	Infección por *Prototheca* spp.
Esférulas de 10 - 80 µm, de pared de 2 µm, con endosporas de 2 - 5 µm (5).	*Coccidioides* spp. (Raro, micosis no endémica de la región)
Blastosporas de tamaño homogéneo, de 8 - 15 µm, monogemantes, base de implantación ancha, de 4 - 5 µm, la célula hija por lo general permanece unida a la célula madre (5).	*Blastomyces dermatitidis* (Raro, micosis no endémica de la región)

Cultivo de las muestras:

Inoculación

- De previo a la inoculación de las muestras clínicas, es importante dejar que el medio alcance la temperatura ambiente, este debe secarse para eliminar el exceso de humedad de la superficie.
- Rotular en la base de placa (no en la tapa) con el número asignado a esa muestra una placa de SGC y una de MYC con el número de muestra.

- Si la cantidad de líquido es < 2 mL realizar una inoculación directa en los medios de cultivo, si el líquido recibido es > 2 mL de realizar el pretratamiento mediante centrifugación e inocular el sedimento (3).
- Inocular los medios utilizando una pipeta plástica estéril, colocar una gota del sedimento que se obtuvo previamente a partir de la muestra clínica en el centro del agar, hacer una estría en el centro y rayar en tres direcciones, sin tocar los bordes del agar.
- Luego de inoculadas, sellar las placas con cinta permeable de celulosa o Parafilm para evitar que se sequen o sufran de una infestación de ácaros. Se debe incubar a 30 ± 2 °C en un ambiente aerobio durante 4 semanas.

Tiempo de incubación

Incubar por cuatro semanas. Si se sospecha de una infección por un hongo dimórfico, como *Histoplasma capsulatum*, el tiempo de incubación se puede extender hasta por 6 semanas (3).

Lectura de placas

Cuadro 12.3 Tiempos de lectura de placas de cultivo por hongos

Lectura (3)	**Observaciones**
● Dos veces a la semana la primera semana ● Una vez por semana durante 3 semanas	Para que un aislamiento sea considerado de importancia debe mostrar crecimiento sobre el sitio de inoculación en el agar.

FASE POSTANALÍTICA

Interpretación del cultivo

Es importante determinar la identidad del crecimiento en las placas y diferenciar entre hongos colonizantes, contaminantes y patógenos. Es importante tomar en cuenta la clínica del paciente y el resultado del examen directo al momento de analizar los cultivos.

Para la identificación morfológica de los hongos se deben de buscar las características tanto macroscópicas como microscópicas del hongo.

Características macroscópicas

Tomar en consideración:

1. Producción de pigmento en la placa.
2. Color de la colonia.
3. Aspecto de la colonia (algodonosa, pulverulenta, harinosa, entre otros).
4. Tiempo de incubación.

Características microscópicas

Realizar el montaje de colonias sospechosas en azul de lactofenol o lactofenol claro según sea el caso.

Para la observación de las características microscópicas del cultivo, se puede tomar una porción de la colonia con asa micológica entre portaobjetos y cubreobjetos con lactofenol claro o azul, según corresponda. Alternativamente, se puede realizar un montaje con cinta adhesiva y lactofenol. Revisar la morfología macro y microscópica para llegar a una identificación de especie, o género al menos.

Estas técnicas se encuentran descritas con mayor claridad en el Módulo 1 de este Manual.

Cuadro 12.4 Principales microorganismos aislados de cultivos de líquidos estériles (1,5,6).

Grupo	Microorganismo
Levaduras	*Candida* spp. Complejo *C. neoformans neoformans/ C. gattii*

	Trichosporon spp. *Rhodotorula* spp. *Saccharomyces* spp.
Hongos dimórficos	*Sporothrix schenckii* (En líquido articular o sinovial) *Histoplasma capsulatum* *Coccidioides* spp. (Raro, micosis no endémica de la región) *Blastomyces dermatitidis* (Raro, micosis no endémica de la región)
Filamentosos hialinos	*Aspergillus* spp. *Trichoderma* spp. *(Peritonitis).*
Filamentosos fuliginosos	*Aureobasidium pullulans (Peritonitis).*
Cenocíticos	Orden Mucorales *(Rhizophus* spp.*, Mucor* spp.*, etc).*
Otros	*Prototheca* spp. (En líquido articular o sinovial)

Para la identificación de especies de *Candida* spp. se deben realizar pruebas bioquímicas con sistemas automatizados. Recuerde que si se obtiene un aislamiento a partir de medios cromogénicos se debe realizar un subcultivo en un medio no selectivo, por ejemplo, SDA, antes de realizar pruebas bioquímicas.

NOTA: En el caso de las *Candida parapsilosis* los sistemas de identificación bioquímica son insuficientes para separar las especies *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis*, cuyas sensibilidades a antifúngicos son variables y no se encuentran validadas en las tarjetas de PSA. Por lo que, ***Candida parapsilosis* aislada de líquidos estériles** debe enviarse al Laboratorio de la red de la CCSS que cuente con identificación por espectrometría de masas o *MALDI-TOF,* y reportar la PSA con una nota “PSA preliminar” hasta su confirmación.

En el caso de criptococosis al trabajar con sistemas bioquímicos automatizados se debe corroborar la especie por espectrometría de masas. Los sistemas de identificación bioquímicos y automatizados no distinguen *C. neoformans* de *C. gattii.* Se debe corroborar

la especie por espectrometría de masas. Si en su centro de salud no cuenta con dicho insumo diríjase al hospital Clase A más cercano que le pueda ayudar con dicha identificación.

Reporte de resultados

Reporte de examen directo

1. En el examen directo reportar según las características observadas:
    a. **"Se observan blastosporas gemantes, pseudomicelio o micelio."**
    b. **"Se observa micelio hialino septado."**
    c. **"Se observa micelio fuliginoso septado."**
    d. **"Se observan blastosporas intracelulares."**
    e. **"Se observa micelio hialino cenocítico."**

2. En la tinción de Giemsa (o similar) reportar según las características observadas:
    a. **"Se observan blastosporas intracelulares semejantes a *Histoplasma capsulatum."***

3. En la tinta china reportar según las características observadas:
    a. **"Se observan blastosporas encapsuladas semejantes a *Cryptococcus* sp."**

4. Si al examen directo y/o tinciones no se observan estructuras fúngicas, reportar:
    a. **"No se observan estructuras fúngicas."**

Reporte de cultivo

1. Si el cultivo está negativo y el examen directo está negativo, reportar:
    a. **"Cultivo negativo por hongos".**
2. Si se logra aislar el agente causal e identificarlo, reportar:

a. **“Cultivo positivo por (género y especie) o sólo género”.**

3. Si se logra aislar varios agentes causales e identificarlos, reportar:
   a. **“Positivo por: (género y especie) o sólo género**
      (género y especie) o sólo género”.
4. Si el cultivo está negativo y el examen directo está positivo, reportar:
   a. **“No se obtuvo crecimiento del agente causal”.**
5. Si se observa crecimiento de 1 o más microorganismos que se consideran que no son de importancia clínica, reportar:
   a. **“Cultivo negativo por hongos”.**

REFERENCIAS

1. Bonifaz A. Micología Médica Básica. 6ta ed. Ciudad de México: McGraw-Hill interamericana editores; 2020.
2. Leber AL (Ed.). Clinical Microbiology Procedures Handbook. 4ta ed. Washington, D.C.: American Society for Microbiology (ASM); 2024.
3. Wengenack NL. CLSI M54 Principles and Procedures for Detection and Culture of Fungi in Clinical Specimens. 2da ed. Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI); 2021.
4. Carroll K, Pfaller M. Manual of Clinical Microbiology. Vol. 1. 13ra ed. Washington DC: ASM Press; 2023.
5. Gross N, Salas Campos I. Métodos diagnósticos en Micología Médica. 1ra ed. 2da reimpresión. San José, Costa Rica: Editorial UCR; 2015.
6. Westblade LF, Burd EM, Lockhart S, Procop GW. Larone´s Medically Important Fungi. 7ma ed. Washington DC: Wiley, ASM Press; 2023.

Módulo 13: Diagnóstico micológico de muestras de médula ósea

FASE PREANALÍTICA

Solicitud de análisis: Cuadros clínicos asociados

El estudio de la médula ósea es muy útil para la determinación de micosis diseminadas como histoplasmosis, criptococosis y en algunos casos la candidiasis invasiva. Generalmente, estas micosis y su invasión a médula ósea se observan en pacientes con severa inmunosupresión, pacientes con HIV con depleción de linfocitos CD4+ a menos de 200 células, pacientes sometidos a tratamientos prolongados con inmunosupresores como los pacientes trasplantados con insuficiencia renal, lupus, artritis reumatoidea, por citar algunas de las enfermedades asociados a estas micosis invasivas (1).

En nuestro país, según lo observado en los laboratorios clínicos, el microorganismo más aislado en médula ósea es *Histoplasma capsulatum*. En los pacientes inmunocomprometidos, el espacio intraóseo puede ser ocupado por hongos como *Cryptococcus* spp., *Candida* spp., *Aspergillus* spp., *Talaromyces marneffei,* entre otros que se han documentado con una menor incidencia (2).

En nuestro sistema de salud, por lo general, la toma de muestras de médula ósea se realiza en Hospitales Nacionales con el equipo, personal y espacio adecuado. Si se tiene alguna duda adicional sobre el procesamiento de este tipo de muestras se puede realizar la consulta con el micólogo de la red de apoyo institucional de la región correspondiente.

Diagnóstico diferencial con diferentes agentes infecciosos y no infecciosos:
Infecciones por bacterias, virus, parásitos, enfermedades autoinmunes, micobacterias tuberculosas y no tuberculosas (3).

Diagnóstico diferencial estructural de *Histoplasma capsulatum* con otros agentes fúngicos y no fúngicos (según lo observado en el examen directo):

Formas intracelulares: *Nakaseomyces glabratus (Candida glabrata)* cuando ha sido fagocitada, amastigotos de *Leishmania* spp., amastigotos de *Toxoplasma gondii.*
Formas extracelulares: *N. glabratus (C. glabrata) y* otras especies de *Candida* de pequeño tamaño (3)

Muestras clínicas, transporte y conservación (2,3)
Con el fin de poder realizar un diagnóstico adecuado y brindar el tratamiento correcto, se debe de realizar una correcta toma de muestra.

Tabla Resumen. Información requerida para el procesamiento	
Datos del paciente	-Nombre completo, número de identificación, sexo y fecha de nacimiento. -Posible diagnóstico o cuadro clínico. -Fecha de inicio de síntomas. -Terapia recibida. -Lugar de procedencia.
Datos de la muestra	-Fecha y hora de la toma de muestra. -Técnica de obtención de la muestra. -Sitio de la toma de muestra. -Tipo de muestra. -Servicio que envía la muestra. -Responsable de la toma de muestra.
Muestras clínicas indicadas	
-Médula ósea tomada de hueso, realizada únicamente por el personal médico calificado.	
Criterios de rechazo	
-Debido a la naturaleza crítica de la muestra, la misma no se puede rechazar. Si hace falta algún dato de los mencionados anteriormente, el personal de laboratorio debe de llamar al servicio y recabar la información faltante. -Incongruencia entre la información consignada en los tubos y la boleta con la información del paciente.	

-Si la muestra presenta coágulo este no será un criterio de rechazo, sin embargo, es importante que el laboratorio notifique por escrito la calidad de la muestra. -Muestras hipocelulares deberán de procesarse, este tampoco es un criterio de rechazo. Dejar consignado lo observado en el extendido sanguíneo.
Observaciones
-La médula ósea debe de ser tomada siempre que sea posible previo a la administración de antifúngicos. **En el caso de estas muestras su procesamiento debe ser de manera preferencial el mismo día, en condiciones ideales dentro de las dos primeras horas, para obtener óptimos resultados en la identificación y recuperación de agentes etiológicos, ya que la demora en el procesamiento de estas muestras puede resultar en un crecimiento excesivo de contaminantes bacterianos e impedir la recuperación de patógenos fúngicos** (1,2).
Recipiente indicado para la recolección
-Tubos con EDTA -Tubos de heparina -Tubos especiales para lisis centrifugación con saponina[1].
Condiciones de transporte
-Las muestras de médula ósea deben de ser transportadas al laboratorio clínico de inmediato a temperatura ambiente. -Las muestras no deben de refrigerarse. -Las muestras deben de procesarse de manera prioritaria.

1. Estos tubos son los recomendados en las guías internacionales de procesamiento de muestras de médula ósea. Sin embargo, de no contar con ellos se pueden utilizar los tubos de EDTA o de heparina.

FASE ANALÍTICA

Consideraciones generales de procesamiento de muestras de médula ósea

Es importante trabajar las muestras en un ambiente aséptico para evitar la contaminación con hongos ambientales. Se recomienda el procesamiento en cámara de flujo laminar o con mechero, de ser posible utilizar cubrebocas y no hablar encima de las muestras para no contaminarlas.

Cuadro 13.1 Equipos e insumos requeridos		
Activos base	**Analizadores base**	**Activos adicionales**
Cámara de bioseguridad Incubadora a 30 °C (o caja en un cuarto a temperatura ambiente en su defecto) Centrífuga ventilada (con alcance de 3000 rpm)	Microscopio de luz, con objetivos de 10X o 20X, 40X y 100X Sistema automatizado para ID y PSA	Sistema MALDI-TOF[1] Microscopio de fluorescencia[1]
Medios de cultivo	**Insumos**	**Pruebas complementarias**
Agar Sabouraud glucosado (SDA)	Portaobjetos Cubreobjetos Azul de lactofenol Lactofenol claro Asa bacteriológica Bisturí Hoja para bisturí Placa de Petri estéril Reactivos para tinción con algún derivado de Romanowsky (Wright, Giemsa)	Blanco de calcofluor[1] Técnicas moleculares[1] Prueba de detección de antígeno urinario de *Histoplasma*[1] Tina China

1. Según la disponibilidad en el centro de salud.

Procesamiento de la muestra para diagnóstico microbiológico

Entrega de material al personal médico

Previo a la recolección de la muestra se debe entregar al personal médico el material necesario:

1. Entregar 2 Tubos de EDTA o heparina y/o 1 tubo con saponina (según disponibilidad del Centro).

2. Entregar al menos 3 portaobjetos para hacer los extendidos con estroma medular, los cuales son realizados por el personal médico en el momento de la extracción de la muestra.
3. Los portaobjetos con los extendidos deben colocarse en placas de Petri o en algún contenedor especial para mantener su integridad hasta la llegada al laboratorio para su posterior análisis.
4. Todo debe ser entregado en bolsa de bioseguridad, será devuelto al laboratorio junto con la solicitud de EDUS y de diagnóstico microbiológico.

Procesamiento de la muestra en el laboratorio (4)

1. Recoger asépticamente aproximadamente 0.5 mL (pacientes pediátricos) a 3 mL (adultos) en tubos heparinizados o de EDTA. Idealmente, se recomienda la recolección de la muestra en dos tubos de EDTA para tener suficiente volumen de muestra y así aumentar el porcentaje de recuperación del o los microorganismos presentes en la muestra.
2. Centrifugar la muestra a 2500 rpm por 30 minutos para obtener la capa de leucocitos (buffy coat).
3. Durante el tiempo de centrifugación se pueden preparar los extendidos con las tinciones que estén disponibles en el centro de salud (Giemsa, Wright, blanco de calcoflúor). Estas técnicas se encuentran descritas con mayor claridad en el Módulo 1 de este Manual.
4. Revisar los extendidos en microscopía de luz o fluorescencia, utilizando los objetivos de 20X, 40X y 100X, según corresponda al tipo de tinción.
5. Reportar la ausencia o presencia de estructuras fúngicas (si son blastosporas con cápsula, blastosporas intracelulares, blastosporas con pseudomicelio, micelio hialino septado entre otros).

Examen directo

Estas técnicas se encuentran descritas con mayor claridad en el Módulo 1 de este Manual. Se recomienda la utilización en primera instancia de la tinción de Giemsa o algún otro derivado de Romanowsky como Wright o Leishman cuando se sospecha de histoplasmosis. Si el centro de salud cuenta con blanco de de calcoflúor esta tinción es muy recomendable para la búsqueda de *Histoplasma capsulatum.*

Nota: En el caso de la histoplasmosis no se recomienda la observación del KOH por el tamaño de las blastosporas y su naturaleza intracelular. Es necesario recurrir a tinciones para su observación, se debe recurrir en primera instancia a las técnicas antes descritas para el estudio de médula ósea.

NOTA: se debe ser exhaustivo al analizar el examen directo, ya que la carga fúngica puede ser muy baja. Por esta razón se debe observar todo el extendido hasta el final hasta que se logren descartar la presencia de estructuras fúngicas.

Cuadro 13.2 Posibles resultados que se pueden obtener al visualizar los frotis de médula ósea (3)

Estructura observada	**Posible agente etiológico (se debe de esperar al resultado del cultivo para confirmar diagnóstico)**
Blastosporas intracelulares, 2 - 5 µm Se puede observar un espacio (pseudocápsula en las tinciones de Giemsa o Wright).	*Histoplasma capsulatum*
Blastosporas encapsuladas, 2 - 15 µm. Observación en tinta china.	*C. neoformans* /*C. gattii*
Pseudomicelio hialino, micelio y/o blastosporas de 2.5 - 7.5 µm. Observación en Gram, blanco de calcoflúor, Giemsa o Wright.	*Candida* spp.

Cultivo de las muestras:

Inoculación (3,4)

1. De previo a la inoculación de las muestras clínicas, es importante dejar que el medio alcance la temperatura ambiente, este debe secarse para eliminar el exceso de humedad de la superficie.
2. Rotular la placa de SDA con la identificación en la base.
3. Descartar el sobrenadante después de la centrifugación y tomar la capa de leucocitos con una pipeta estéril o con micropipeta.
4. Inocular la muestra por goteo en la placa de cultivo, evitando los bordes. También se puede inocular la muestra en el centro de la placa y rayarla en tres direcciones. En cualquiera de los casos es importante que el volumen de muestra sea generoso, para aumentar la recuperación de los agentes fúngicos presentes en la muestra. En ambos casos, colocar la mayor cantidad de muestra posible (entre 0.25 a 0.5 mL), para aumentar la probabilidad de recuperar el agente etiológico si se encuentra en baja carga.
5. Dejar que el agar absorba un poco la muestra. No voltear la placa, pues puede derramarse la muestra.
6. Sellar la placa con cinta permeable de celulosa o Parafilm para evitar que se sequen o sufran de una infestación de ácaros. Incubar los medios a 30 ± 2 °C en un ambiente aerobio y se cuenta con incubadora, de lo contrario incubar a temperatura ambiente en bolsas de bioseguridad.

Observaciones sobre el procesamiento:

- El método recomendado o método de elección para el aislamiento de *Histoplasma capsulatum* en médula ósea, es la lisis centrifugación en tubos que contienen saponina entre otros agentes. Esto con el fin de lisar las células y aumentar la sensibilidad de los cultivos. En caso de no tener estos tubos usar los que contienen EDTA o heparina como anticoagulante (2,5)

- También se deben de considerar otras micosis sistémicas que pueden diseminar hacia médula ósea, tales como *Aspergillus* spp., *Coccidioides* spp., hongos del orden de los mucorales y hongos negros. El aislamiento de estos microorganismos aunque es excepcional no debe de descartarse y debe reportarse de inmediato.

Tiempo de incubación

Las placas se deben de incubar por cuatro semanas, sin embargo, si se sospecha de una infección por un hongo dimórfico, como *Histoplasma capsulatum*, el tiempo de incubación se puede extender hasta por 6 semanas (2,4).

Lectura de placas

Cuadro 13.3 Tiempos de lectura de placas de cultivo por hongos

Lectura	Observaciones
-Diaria durante la primera semana -Una vez por semana durante 4 semanas	Para que un aislamiento sea considerado de importancia debe mostrar crecimiento sobre el sitio de inoculación en el agar. En el caso de patógenos como *Histoplasma capsulatum* y *Cryptococcus* spp. Cualquier crecimiento que se observe debe reportarse, independientemente de las colonias observadas en las placas de cultivo.

FASE POSTANALÍTICA

Análisis e interpretación de cultivos

- Observar de forma periódica las placas en búsqueda de evidencia de crecimiento colonial.
- **Realizar estudios micológicos de las colonias observadas dentro de la cámara de bioseguridad. NUNCA abrir las placas fuera de la cabina de bioseguridad. Adicionalmente, utilizar mascarilla de bioseguridad N95 y realizar los montajes cuando no se encuentren otras personas en el laboratorio para evitar exposición innecesaria al hongo.**

- **Las láminas de montaje de los cultivos deben ser desechadas en un descartador desechable de bioseguridad, que debe contener desinfectante con fenol o cloro, preferiblemente dentro de la cámara de bioseguridad hasta que se cierre el descartador para autoclavar.**
- Es importante determinar la identidad del crecimiento en las placas y diferenciar entre hongos colonizantes, contaminantes y patógenos. Es importante tomar en cuenta la clínica del paciente y el resultado del examen directo al momento de analizar los cultivos.
- Se debe de observar el crecimiento del hongo a partir del sitio de inoculación realizado, de lo contrario el crecimiento debe de ser considerado como un posible contaminante. RECORDAR QUE LOS PATÓGENOS PRIMARIOS NUNCA DEBEN SER CONSIDERADOS CONTAMINANTES.
- Se debe considerar el crecimiento de otros microorganismos como micobacterias no tuberculosas del complejo MAC y otras bacterias como por ejemplo *Salmonella* spp.
- Es importante tomar en cuenta la clínica del paciente y el resultado del examen directo en el momento de examinar los cultivos.
- Para la identificación de las blastosporas se debe de hacer uso del sistema automatizado ID disponible en el centro de salud. Por su parte la identificación de los hongos filamentosos se basa en la observación de las características tanto macroscópicas como microscópicas del microorganismo.
- Complementar el diagnóstico con otras pruebas en caso de ser necesario como inmunocromatografía para *C. neoformans,* detección de antígeno urinario de *H. capsulatum,* entre otros.
- Reportar de inmediato en el sistema de información de cada centro de salud.

Nota: En algunas ocasiones la identificación mediante métodos bioquímicos o por observación de las características macroscópicas y microscópicas de un hongo no son suficientes para lograr una correcta identificación del microorganismo, ya sea blastospora u hongo filamentoso. En dichos casos se pueden usar otras metodologías como el sistema MALDI-TOF, que pueden ser útiles en casos de difícil identificación.

Características macroscópicas

Tomar en consideración:

1. Producción de pigmento en la placa.
2. Color de la colonia.
3. Aspecto de la colonia (algodonosa, pulverulenta, harinosa, entre otros).
4. Tiempo de incubación.

NOTA: si se observa el crecimiento de un hongo filamentoso, con características coloniales algodonosas o ligeramente pulverulentas, con pigmento amarillento o rojizo que difunde al medio, puede ser una colonia de *Histoplasma capsulatum.* De nuevo recordar el uso de cámara de bioseguridad para la manipulación de estos cultivos.

Características microscópicas

Realizar el montaje de colonias sospechosas en azul de lactofenol o lactofenol claro según sea el caso.

Se puede realizar el montaje utilizando cinta adhesiva o con el asa entre porta y cubre, intentando no alterar el hongo para poder visualizar las características microscópicas de cada género:

1. Tipo de conidias.
2. Tipo de conidióforos.
3. Características del micelio.

Estas técnicas se encuentran descritas con mayor claridad en el Módulo 1 de este Manual.

Cuadro 13.4 Principales microorganismos aislados de cultivos de médula ósea

Grupo	Microorganismo
Blastosporas con presencia de cápsula (muy visible o poco visible).	*C. neoformans*/*C. gattii*
Presencia de blastosporas con o sin pseudomicelio	*Candida* spp.
Hongos dimórficos y filamentosos a temperatura ambiente (macroconidias tuberculadas y microconidias en presencia de micelio hialino septado). NOTA: si la muestra de médula ósea se incuba a 37 ºC se observaría el desarrollo de blastosporas de pequeño tamaño de 2-5 um.	*Histoplasma capsulatum*
Hongos filamentosos hialinos	*Aspergillus* spp.

Reporte de resultados

Reporte de examen directo

1. En el examen directo reportar según las características observadas
    a. **“Se observan blastosporas intracelulares.”**
    b. **“Se observan blastosporas encapsuladas.”**
    c. **“Se observa micelio hialino septado.”**
    d. **“Se observan blastosporas.”**
    e. **“Se observa micelio hialino septado y pseudomicelio.”**

2. Si al examen directo no se observan estructuras fúngicas, reportar:
    a. **“No se observan estructuras fúngicas”**

Reporte de cultivo

1. Si el cultivo está negativo y el examen directo está negativo, reportar:
    a. **"Cultivo negativo por hongos".**
2. Si se logra aislar el agente causal e identificarlo, reportar:
    a. **"Positivo por (género y especie) o sólo género.**
3. Si se logra aislar varios agentes causales e identificarlos, reportar:
    a. **"Positivo por: (género y especie) o sólo género".**
    (género y especie) o sólo género".
4. Si el cultivo está negativo y el examen directo está positivo, reportar:
    a. **"No se obtuvo crecimiento del agente causal".**
5. Si se observa crecimiento de 1 o más microorganismos que se consideran que no son de importancia clínica, reportar:
    a. **"Cultivo negativo por hongos".**

REFERENCIAS

1. Bonifaz A. Micología Médica Básica. 6ta ed. Ciudad de México: McGraw-Hill interamericana editores; 2020.
2. Carroll K, Pfaller M. Manual of Clinical Microbiology. Vol. 1. 13ra ed. Washington DC: ASM Press; 2023.
3. Wengenack NL. CLSI M54 Principles and Procedures for Detection and Culture of Fungi in Clinical Specimens. 2da ed. Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI); 2021.
4. Gross N, Salas Campos I. Métodos diagnósticos en Micología Médica. 1ra ed. 2da reimpresión. San José, Costa Rica: Editorial UCR; 2015.
5. Mahon CR, Lehman DC. Textbook of Diagnostic Microbiology. 7ma ed. St Louis, Missouri. Elsevier Health Sciences; 2022.

Módulo 14: Diagnóstico micológico de muestras de tracto urinario

FASE PREANALÍTICA

Solicitud de análisis: Cuadros clínicos asociados

Este análisis se envía a pacientes que presenten sintomatología de infección del tracto urinario por *Candida* spp. y géneros asociados, principalmente (1). En otros casos se utiliza esta muestra para determinar la presencia de antígenos de hongos que producen infecciones sistémicas como *Histoplasma capsulatum* (2).

Sin embargo, los urocultivos forman parte de la rutina de trabajo de bacteriología, por lo que las orinas no suelen ser una muestra habitual en Micología para el estudio por hongos en tracto urinario. Aun así, en este apartado se describen técnicas útiles en el caso de sospecha de otras micosis en tracto urinario.

Cuadro 14.1 Cuadros clínicos a los cuales está indicada una muestra de orina (1,2,3)

Enfermedad	Agente causal	Aspectos clínicos
Infección urinaria por *Candida* spp.	*Candida* spp. y géneros asociados	**Se debe de evidenciar la presencia de Candiduria con un segundo cultivo** y el médico tratante debe de definir si el paciente presenta candiduria asintomática o sintomática. En el caso de la candiduria asintomática en pacientes de comunidad ambulatorios, se debe analizar la presencia de factores predisponentes como diabetes, enfermedad renal u otros factores predisponentes. El médico tratante debe evaluar cada caso en particular. Por el contrario, en pacientes hospitalizados con factores de riesgo, el médico debe de sospechar de candidiasis diseminada, y la colonización de dispositivos médicos, esto según las guías internacionales que se utilizan para el manejo de pacientes en riesgo de sepsis (pacientes de UCI, neonatos,, larga estancia hospitalaria

		con dispositivos médicos como catéteres o neutropénicos) Por otra parte, en pacientes masculinos sintomáticos se debe de sospechar de una cistitis, pielonefritis, prostatitis o epididimoorquitis.
Infecciones sistémicas	*C. neoformans/ C. gattii, Aspergillus* spp., Mucorales, *Histoplasma capsulatum, Blastomyces* spp., *Coccidioides immitis/ Coccidioides posadasii*	Si se aíslan estos hongos de orina, indica infección de tracto urinario como parte de una infección sistémica. Además, existen pruebas de determinación de antígeno de *Histoplasma capsulatum* o cual permite mejorar el diagnóstico de la enfermedad sistémica.

Diagnóstico diferencial

Infecciones urinarias bacterianas (1).

Muestras clínicas, transporte y conservación

Tabla Resumen. Información requerida para el procesamiento	
Datos del paciente	-Nombre completo, número de identificación, sexo y fecha de nacimiento. -Posible diagnóstico o cuadro clínico. -Fecha de inicio de síntomas. -Terapia recibida. -Lugar de procedencia.
Datos de la muestra	-Fecha y hora de la toma de muestra. -Técnica de obtención de la muestra. -Tipo de muestra.

	-Sitio de la toma de muestra. -Servicio que envía la muestra. -Responsable de la toma de muestra.
Muestras clínicas indicadas	
-Orina a medio chorro (micción media) -Orina recolectada a medio chorro con técnica aséptica limpiando genitales antes de la recolección de la muestra -Orina por catéter urinario -Orina por punción suprapúbica -Orina por sonda Foley u otros sistemas de sondaje	
Criterios de rechazo	
-Muestras que su rotulación sea inadecuada o no coincida con los datos de la orden médica. -Orina 24 horas. -Muestras recolectadas a partir de la bolsa colectora en pacientes con sonda. -Frascos lavados no estériles. -Puntas de sonda Foley. -Muestras abiertas o derramadas. -Muestras con más de dos horas de recolección	
Observaciones	
-Siempre que sea posible, para aumentar la probabilidad de recuperación de un organismo fúngico, la muestra debe recolectarse antes de administrar un agente antimicótico.	
Recipiente indicado para la recolección	
-Frasco de orina estéril	
Condiciones de transporte	
-Las muestras deben transportarse inmediatamente al Laboratorio Clínico en el contenedor donde se recolectó, a temperatura ambiente donde se permita mantenerla en condiciones adecuadas de humedad. -Si el análisis de inmediato no es posible, se recomienda mantener en refrigeración de 4 a 8 °C por 24 horas como máximo (4). -Si debe enviarse a otros centros para su procesamiento, la muestra debe ir correctamente embalada en hielera con cadena de frío de 4 a 8 °C.	

FASE ANALÍTICA

Consideraciones generales de procesamiento muestras urinarias

Es importante trabajar las muestras en un ambiente aséptico para evitar la contaminación con hongos ambientales. Se recomienda el procesamiento en cámara de flujo laminar o con mechero, de ser posible utilizar cubrebocas y no hablar encima de las muestras para no contaminarlas.

Equipos e insumos requeridos

Cuadro 14.2 Equipos e insumos requeridos

Activos base	Analizadores base	Activos adicionales
Cámara de bioseguridad Incubadora a 30 °C (O caja en un cuarto a temperatura ambiente en su defecto) Centrífuga ventilada para tubos cónicos de 15 mL o 50 mL (con alcance de 3000 rpm)	Microscopio de luz, con objetivos de 10X, 20X, 40X y 100X Sistema automatizado para ID y PSA	Sistema MALDI-TOF[1] Microscopio de fluorescencia[1]
Medios de cultivo	**Insumos**	**Pruebas complementarias**
Agar Sabouraud glucosado (SDA) Agar Mycosel (MYC) Agar Sabouraud con antibiótico[2] (SGC)	Asa micológica Asa bacteriológica Portaobjetos Cubreobjetos KOH 10 - 20 % Mechero de Bunsen o lámpara con alcohol	Antígeno urinario de *Histoplasma capsulatum*[1] Blanco de calcoflúor[1]

1. Según la disponibilidad en el centro de salud.
2. Se recomienda la utilización de este medio sobre el SDA ya que evita el crecimiento de bacterias que pueden afectar la recuperación del hongo, esto aplica a zonas no estériles.

Recolección de la muestra para diagnóstico micológico:

1. Para la orina de medio de micción media: recolectar la primera orina de la mañana a medio chorro, con los genitales lavados y secos. En el caso de las mujeres se debe separar los labios mayores y menores; en los varones, se debe de retraer completamente el prepucio para recoger la muestra.

2. Para la orina por catéter urinario, orina por punción suprapúbica o la orina por sonda Foley (u otros sistemas de sondaje), el encargado de la recolección de la muestra es el personal de enfermería.

Procesamiento de la muestra para diagnóstico microbiológico

Examen directo:

1. Centrifugar la muestra de orina a 2000 g por 10 minutos.
2. Colocar una gota del sedimento en el portaobjetos, colocar KOH al 10 - 20 % y colocar cubreobjetos sobre la preparación.
3. Examinar la muestra en busca de estructuras fúngicas, como las descritas abajo.

Cuadro 14.3 Resultados que se pueden obtener al visualizar KOH (1,3)

Estructura observada KOH	Cuadro clínico sugestivo (se debe de esperar al resultado del cultivo para confirmar diagnóstico)
Pseudomicelio hialino, micelio y blastosporas de 2.5 - 7.5 µm.	Candidiasis
Blastosporas esféricas, 2 - 15 µm, base de implantación estrecha, con cápsula o poco encapsuladas, con variación de tamaños si se sospecha de infección por *Cryptococcus* spp. se recomienda realizar tinta china al sedimento).	Criptococosis
Blastosporas de 2 - 5 µm, uniformes e intracelulares (si se sospecha se recomienda hacer Giemsa al sedimento).[1]	Histoplasmosis diseminada
Blastosporas de 8 - 15 µm, uniformes, con base de implantación ancha	Blastomicosis diseminada[2]
Esférulas de 10 - 80 µm, con o sin endosporas 2 - 5 µm	Coccidiomicosis diseminada[2]

1. Debido a su tamaño las blastosporas de *H. capsulatum* son de difícil observación en microscopía de luz tradicional
2. Debido a la epidemiología la blastomicosis y la coccidioidomicosis no son endémicas en nuestro país, su hallazgo es raro.

El estudio de orina por hongos normalmente es incidental como parte de los análisis de urocultivos en Bacteriología. Con un hallazgo frecuente de *Candida* spp., frente a otros hongos. En pacientes con inmunosupresión pueden ocurrir hallazgos poco frecuentes de agentes como *Cryptococcus* spp.

Cultivo de las muestras:

Inoculación

1. Dejar que el medio alcance la temperatura ambiente, secar para eliminar el exceso de humedad de la superficie previo a la inoculación de las muestras.
2. Rotular las placas en la base (y no en la tapa) con el número asignado a esa muestra.
3. Centrifugar la muestra a 2000 g por 10 minutos.
4. Separar el sobrenadante y trabajar el sedimento.
5. Inocular un mínimo de 0.5 mL en los medios de cultivo.
6. Incubar los medios a 30 ± 2 °C en un ambiente aerobio (1,3).

NOTA: como los urocultivos forman parte de la rutina de trabajo en Bacteriología, es habitual la siembra en agar sangre, esta práctica es correcta y se debe continuar con el protocolo descrito en el Manual de Procedimientos de Bacteriología de la Caja Costarricense del Seguro Social MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023.

Tiempo de incubación

Las placas se deben incubar hasta tres semanas (1,3).

Lectura de placas

Cuadro 14.4 tiempos de lectura de placas de cultivo por hongos en orina (1,3).

Lectura	Observaciones
• Dos a tres veces por semana	Se deben analizar todas las colonias que crezcan y determinar sus características microscópicas y macroscópicas para identificar el agente causal.

Prueba de antígeno de *Histoplasma capsulatum* en orina

Existen pruebas que permiten detectar la prueba de antígeno de *H. capsulatum* en orina, sin embargo, es importante leer el incierto del producto para poder realizar esta prueba según indicaciones de la casa comercial. En el caso de la determinación de antígenos del complejo de *H. capsulatum* se pueden presentar falsos positivos con pacientes con blastomicosis, paracoccidioidomicosis y talaromicosis, y se pueden dar falsos negativos en esta prueba en histoplasmosis muy localizadas (2).

Esta prueba se recomienda efectuar en pacientes con alta sospecha de histoplasmosis y condiciones subyacentes que la justifiquen, como pacientes trasplantados (renal, hepático, etc) pacientes lúpicos, pacientes portadores de HIV con conteos de CD4 inferiores a 200 células/mL o pacientes con sintomatología asociada e historial de permanencia en sitios de riesgo de contagio (5).

En esos casos, la muestra urinaria debe ser enviada con la respectiva solicitud al Centro de Salud de la Red de laboratorios de la CCSS que corresponda y cuente con disponibilidad de realizar la prueba.

FASE POSTANALÍTICA

Análisis e interpretación de cultivos

Es importante determinar cuál es el crecimiento en la placa y diferenciar entre hongos colonizantes, contaminantes y patógenos Es importante tomar en cuenta la clínica del paciente y el resultado del examen directo al momento de analizar los cultivos.

En caso de duda ante el crecimiento que se observe en los medios de cultivo y los resultados del examen directo, se puede llamar al paciente o al médico para coordinar una segunda toma de muestra.

Para un conteo por *Candida* spp. en orina sea significativo se requiere del recuento de 10 000 UFC/mL mínimo. Siguiendo los procedimientos habituales de bacteriología. (3)

En casos de crecimiento de otros hongos distintos de *Candida* spp. los recuentos no son significativos, pues todo aislamiento deber ser considerado de importancia.

Para la identificación de las blastosporas se debe de hacer uso del sistema automatizado para ID disponible en el centro de salud, no es necesario realizar PSA a menos de que el médico lo solicite (3).

Nota: En algunas ocasiones la identificación mediante métodos bioquímicos o por observación de las características macroscópicas y microscópicas de un hongo no son suficientes para lograr una correcta identificación del microorganismo, ya sea blastospora u hongo filamentoso. En dichos casos se pueden usar otras metodologías como el sistema MALDI-TOF, que pueden ser útiles en casos de difícil identificación.

Para la identificación morfológica de los hongos se deben de buscar las características tanto macroscópicas como microscópicas del hongo.

Características macroscópicas

Tomar en consideración:

1. Producción de pigmento en la placa.
2. Color de la colonia.
3. Aspecto de la colonia (algodonosa, pulverulenta, harinosa, entre otros).
4. Tiempo de incubación.

Es importante al momento de interpretar las placas tomar en cuenta la clínica y el resultado del examen directo de la muestra.

Reporte de resultados

Reporte de examen directo

1. En el examen directo se debe de reportar según las características observadas:
    a. **“Se observan blastosporas”.**
    b. **“Se observa micelio hialino septado y/o pseudomicelio”.**
2. Si no se observan estructuras fúngicas se reporta de la siguiente manera:
    a. **“No se observan estructuras fúngicas”.**

Reporte de cultivo

1. Si el cultivo está negativo y el examen directo está negativo, reportar:
    a. **“Cultivo negativo por hongos”.**
2. Si se logra aislar el agente causal e identificarlo, reportar:
    a. **“Positivo por (género y especie) o sólo género”.**
3. Si se logra aislar varios agentes causales e identificarlos, reportar:
    a. **“Positivo por: (género y especie) o sólo género”.**
    (género y especie) o sólo género”.

4. Si el cultivo está negativo y el examen directo está positivo, reportar:
    a. **“No se obtuvo crecimiento del agente causal”.**
5. Si se observa crecimiento de 1 o más microorganismos que se consideran que no son de importancia clínica, reportar:
    a. **“Cultivo negativo por hongos”.**

REFERENCIAS

1. Fisher JF, Sobel JD, Kauffman CA, Newman CA. Candida Urinary Tract Infections Treatment. Clin Infect Dis. 2011; 52(suppl_6):S457–66.
2. Wengenack NL. CLSI M54 Principles and Procedures for Detection and Culture of Fungi in Clinical Specimens. 2da ed. Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI); 2021.
3. Gross N, Salas Campos I. Métodos diagnósticos en Micología Médica. 1ra ed. 2da reimpresión. San José, Costa Rica: Editorial UCR; 2015.
4. Leber AL (Ed.). Clinical Microbiology Procedures Handbook. 4ta ed. Washington, D.C.: American Society for Microbiology (ASM); 2024.
5. Organización Mundial de la Salud. Guidelines for Diagnosing and Managing Disseminated Histoplasmosis among People Living with HIV. Washington, D.C.: OPS; 2020.

Módulo 15: Diagnóstico micológico de muestras de heces

FASE PREANALÍTICA

Solicitud de análisis: Cuadros clínicos asociados

Este análisis se envía a pacientes sospechosos de enfermedad gastrointestinal por microsporidios o *Candida* spp. en situaciones de disbiosis gastrointestinal. Cabe resaltar que los agentes fúngicos no son la primera causa a descartar cuando se trata de enfermedad diarréica aguda.

Cuadro 15.1 Cuadros clínicos asociados a micosis superficiales de la piel

Enfermedad	*Agente causal*	Aspectos clínicos
Microsporidiosis	*Enterocytozoon spp., Encephalitozoon spp.*	Genera diarrea crónica con síndrome de malabsorción, diarrea acuosa sin sangre, anorexia, pérdida de peso y edema; en pacientes con inmunodeficiencias en especial pacientes portadores de VIH, trasplantados o con quimioterapia (1).

Diagnóstico diferencial:

Diarrea bacteriana, diarreas por protozoarios, diarreas virales (1).

Muestras clínicas, transporte y conservación

Tabla Resumen. Información requerida para el procesamiento	
Datos del paciente	-Nombre completo, número de identificación, sexo y fecha de nacimiento. -Posible diagnóstico o cuadro clínico. -Fecha de inicio de síntomas. -Terapia recibida. -Lugar de procedencia.

Datos de la muestra	-Fecha y hora de la toma de muestra. -Técnica de obtención de la muestra. -Tipo de muestra. -Sitio de la toma de muestra. -Servicio que envía la muestra. -Responsable de la toma de muestra.
Muestras clínicas indicadas	
-Muestra de heces recolectada en frasco estéril -Recomendable al menos 3 muestras seriadas -Evitar contaminación con orina	
Criterios de rechazo	
-Muestra contaminada con orina. -Muestra tomada directamente del servicio sanitario.	
Observaciones	
-Siempre que sea posible, para aumentar la probabilidad de recuperación de un organismo fúngico, la muestra debe recolectarse antes de administrar un agente antimicótico.	
Recipiente indicado para la recolección	
-Frasco estéril	
Condiciones de transporte	
-Llevar inmediatamente al laboratorio para su procesamiento -Si el análisis de inmediato no es posible, se recomienda mantener en refrigeración de 4 a 8 °C (5). -Si debe enviarse a otros centros para su procesamiento, la muestra debe ir correctamente embalada en hielera con cadena de frío 4 a 8 °C. Aunque para análisis de heces siempre es mejor una muestra fresca.	

FASE ANALÍTICA

Consideraciones generales de procesamiento muestras de heces

Es importante trabajar las muestras en un ambiente aséptico para evitar la contaminación con hongos ambientales. Se recomienda el procesamiento en cámara de flujo laminar o con mechero, de ser posible utilizar cubrebocas y no hablar encima de las muestras para no contaminarlas.

Equipos e insumos requeridos

Cuadro 15.2 Equipos e insumos requeridos

Activos base	Analizadores base	Activos adicionales
Cámara de bioseguridad	Microscopio de luz, con objetivos de 10X, 20X, 40X y 100X	Microscopio de fluorescencia[1]
Insumos		
Blanco de calcoflúor[1] Portaobjetos Cubreobjetos Solución salina Lugol doble Mechero de Bunsen o lámpara de alcohol Reactivos tinción de Weber[1]		

1. Según la disponibilidad en el centro de salud

Recolección de la muestra para diagnóstico micológico:

1. Recolectar muestra de heces en frasco estéril, sin contacto con servicio sanitario y sin contaminación con orina. Con una muestra de aproximadamente 5 gramos es suficiente.

Procesamiento de la muestra para diagnóstico microbiológico

Examen directo:

1. Realizar un montaje de heces en solución salina y lugol doble, en estos se puede observar las blastosporas, micelio y pseudomicelio de *Candida* spp.
2. Si se sospecha de microsporidiosis: realizar un frotis delgado de la muestra en portaobjetos y realizar la tinción de Weber para microsporidios.

Tinción de Weber

Esta tinción permite la observación de las esporas de microsporidios, ya que favorece un buen contraste con blastosporas y otros elementos que se pueden encontrar en heces. Las esporas de los microsporidios se tiñen de color rojo violeta y en algunas es posible observar la zona vacuolar. La visualización es más fácil cuando se encuentran grupos de esporas (1,2). Referirse al procedimiento en módulo 1.

Asimismo, se puede realizar un montaje con blanco de calcoflúor para la observación de esporas en microscopio de fluorescencia. Referirse al procedimiento en módulo 1.

Nota: En caso de no contar con los reactivos y sospechar por Microsporidiosis enviar la muestra al laboratorio de la Red de la CCSS correspondiente.

Cuadro 15.3 Resultados que se pueden obtener al visualizar en frotis directo de heces

Estructura observada	Cuadro clínico sugestivo
Micelio hialino, pseudomicelio y blastosporas	Candidiasis. En este caso es importante mencionar que la observación de estas estructuras en heces no implica infección ya que forma parte de la microbiota intestinal. Su presencia debe ser analizada de acuerdo a la clínica del paciente y factores de riesgo. Para poder asegurar la presencia de candidiasis intestinal, se requiere de una biopsia intestinal que demuestre la presencia de micelio invadiendo el tejido (2,3)

Cuadro 15.4 Resultados que se pueden obtener al visualizar en tinción de Weber	
Estructura observada	**Cuadro clínico sugestivo**
Esporas de 1 - 4 µm, en grupos, teñidas de color fucsia	Microsporidiosis.

Nota: Se requiere de ser posible material de control, utilizar alto poder con inmersión (1000X) y personal entrenado para la revisión de estas muestras, pues no son microorganismos de fácil observación.

Cultivo

No se recomienda el cultivo de heces por hongos (2).

FASE POSTANALÍTICA

Análisis e interpretación de cultivos

Es importante mencionar que *Candida* spp. es microbiota normal de intestino, por lo que su reporte se debe de hacer con precaución debido a que depende de la condición clínica del paciente.

Reporte de resultados

Reporte de examen directo de heces

1. Si en el examen directo de heces, se observan blastosporas semejantes a *Candida* spp., reportar de forma semicuantitativa en campos de 400X, siguiendo la siguiente escala:
    a. **De 1 a 2: Pocas**
    b. **De 3 a 9: Moderadas**
    c. **Más de 10: Muchas**

2. Si en el examen directo de heces, se observa micelio y/o pseudomicelio semejante a *Candida* spp., reportar:
    a. **Se observa micelio y/o pseudomicelio**

Reporte de tinción de Weber

1. Si se observan esporas, reportar:
    a. **Cantidad de esporas en 100 campos de 1000X**
2. Si no se observan estructuras semejantes a microsporidios
    a. No se observan estructuras semejantes a Microsporidios en heces

REFERENCIAS

1. Noda Albelo AL, Cañete R, Brito Pérez K. Microsporidiosis gastrointestinal: una actualización. Rev Méd Electrón. 2013, 35(2):167–81.
2. Wengenack NL. CLSI M54 Principles and Procedures for Detection and Culture of Fungi in Clinical Specimens. 2da ed. Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI); 2021.
3. Gross N, Salas Campos I. Métodos diagnósticos en Micología Médica. 1ra ed. 2da reimpresión. San José, Costa Rica: Editorial UCR; 2015.

Módulo 16: Diagnóstico micológico de infecciones poco frecuentes

FASE PREANALÍTICA

Solicitud de análisis: Cuadros clínicos asociados

Existen micosis cuya incidencia en Costa Rica y la región es baja, por lo que no suelen formar parte del trabajo diario en los laboratorios clínicos. Sin embargo, dado las características de la época de globalización, siempre se debe de estar atento a la aparición de alguna de estas micosis, principalmente en pacientes que tengan algún factor de riesgo asociado a dicha infección.

Algunos de los agentes etiológicos que se van a desarrollar ya han sido mencionados en distintos capítulos de este manual.

Diagnóstico diferencial

Al tratarse de agentes etiológicos variados, los diagnósticos diferenciales pueden ser múltiples, tanto infecciosos como no infecciosos.

Muestras clínicas, transporte y conservación

Con el fin de poder realizar un diagnóstico adecuado y brindar el tratamiento correcto, se debe de realizar una correcta toma de muestra.

Tabla Resumen. Información requerida para el procesamiento	
Datos del paciente	-Nombre completo, número de identificación, sexo y fecha de nacimiento. -Posible diagnóstico o cuadro clínico. -Fecha de inicio de síntomas. -Terapia recibida. -Lugar de procedencia.
Datos de la muestra	-Fecha y hora de la toma de muestra. -Técnica de obtención de la muestra. -Sitio de la toma de muestra. -Tipo de muestra. -Servicio que envía la muestra. -Responsable de la toma de muestra.

Observaciones
-La mayoría de las muestras en las que se buscan los agentes etiológicos de este capítulo ya han sido discutidos en capítulos previos, referirse a dichos capítulos para ver las características de dichas muestras. -Cualquier característica o consideración especial con las muestras para alguno de los agentes etiológicos propios de este capítulo se indicará más adelante. -En el caso de estas muestras su procesamiento debe ser de manera preferencial el mismo día, en condiciones ideales dentro de las dos primeras horas, para obtener óptimos resultados en la identificación y recuperación de agentes etiológicos, ya que la demora en el procesamiento de estas muestras puede resultar en un crecimiento excesivo de contaminantes bacterianos e impedir la recuperación de patógenos fúngicos (1,2).

FASE ANALÍTICA

Consideraciones generales de procesamiento de muestras

- Es importante trabajar las muestras en un ambiente aséptico para evitar la contaminación con hongos ambientales. Se recomienda el procesamiento en cámara de flujo laminar o con mechero, de ser posible utilizar cubrebocas y no hablar encima de las muestras para no contaminarlas.
- Para que el rendimiento de las pruebas diagnósticas microbiológicas en las muestras de micosis poco frecuentes sea óptimo, es esencial una buena colaboración entre el laboratorio de microbiología y el servicio que envía la muestra
- El microbiólogo clínico debe tener conocimiento básico sobre los posibles agentes etiológicos que pueden encontrarse en las distintas muestras.
- El personal médico por su parte debe conocer los procedimientos microbiológicos básicos para seleccionar la muestra adecuada, rotular la muestra con los datos del paciente y del espécimen recolectado y transportar la muestra sin demora al laboratorio.

Equipos e insumos

Cuadro 16.1 Equipos e insumos requeridos

Activos base	Analizadores base	Activos adicionales
Cámara de bioseguridad Incubadora a 30 °C (o caja en un cuarto a temperatura ambiente en su defecto)	Microscopio de luz, con objetivos de 10X, 20X, 40X y 100X Sistema automatizado para ID	Sistema MALDI-TOF[1] Microscopio de fluorescencia[1]
Medios de cultivo	**Insumos**	**Pruebas complementarias**
Agar Sabouraud glucosado (SDA) Agar Mycosel (MYC) Agar Sabouraud con antibiótico[2] (SGC)	Portaobjetos Cubreobjetos Azul de lactofenol Lactofenol claro KOH 10 - 20 % Mechero Bunsen o lámpara de alcohol[3] Bisturí Hojas para bisturí Placa de Petri estéril Reactivos para tinción con algún derivado de Romanowsky (Wright, Giemsa)	Blanco de calcofluor[1]

1. Según la disponibilidad en el centro de salud
2. Se recomienda la utilización de este medio sobre el SDA ya que evita el crecimiento de bacterias que pueden contaminar el crecimiento del hongo si aplica a zonas no estériles
3. Si no cuenta con Cámara de bioseguridad, puede utilizar un Mechero bunsen o una lámpara de alcohol.

Procesamiento de muestras clínicas para el diagnóstico microbiológico:

Cuadro 16.2 Agentes etiológicos, características clínicas, muestras indicadas, examen directo y cultivo de infecciones poco frecuentes en el país (1,2,3)

Cuadro clínico y agentes etiológicos	Características clínicas y factores de riesgo	Muestras	Examen directo	Cultivo
Coccidioidomicosis *Coccidioides immitis* y *Coccidioides posadasii*	Micosis profunda que se suele presentar como un cuadro pulmonar, pero puede diseminar la piel, SNC y otros órganos. Esos hongos son endémicos de las zonas semidesérticas del continente americano, siendo los sitios más importantes, la frontera oeste entre México y Estados Unidos y la zona de El Chaco.	Esputo inducido LBA Biopsias Raspado de piel LCR	Se realiza en KOH 10 - 20 %, se observan esférulas de entre 10 - 80 µm, con o sin endosporas de 2 - 5 µm.	Colonias blancas algodonosas de crecimiento rápido. Al microscopio se observa artrosporas aladas alternadas.[1]
Blastomicosis Complejo *Blastomyces dermatitidis*	Micosis sistémica capaz de causar un cuadro primario a nivel pulmonar, pero puede diseminar a piel, huesos, tracto genitourinario y otros órganos. El hongo es endémico de Canadá y el este de Estados Unidos. También se han descrito pequeños focos en México, Centroamérica, África y Europa.	Esputo inducido LBA Líquido sinovial Orina Biopsia Exudado óseo	Se realiza en KOH 10 - 20 %, se observan blastosporas monogemantes, con base de implantación ancha, de tamaño homogéneo 8 - 15 µm.	Colonias planas o vellosas, de color blanco a canela oscura. Al microscopio se observa micelio hialino septado con conidióforos simples, laterales o al final de la hifa.
Talaromicosis *Talaromyces* (anteriormente *Penicillium*) *marneffei*	Micosis sistémica que es endémica del sudeste asiático. Afecta principalmente a pacientes inmunosupresos como pacientes VIH positivo con conteos bajos de CD4+. Se presenta con cuadros a nivel pulmonar, piel, médula ósea y del sistema reticuloendotelial.	LBA Esputo inducido Biopsia Médula ósea Sangre	El examen directo en KOH es de poca utilidad. En tinciones como Giemsa o PAS, se observan blastosporas intracelulares de 2 - 4.5 µm con un septo central.	Colonias vellosas, granulares, gris-verdosas, con pigmento difusible al reverso de color rojizo. Al microscopio se observa un conidióforo ramificado, similar al de *Penicillium* sp.

Basidiobolomicosis (Entomoftoromicosis) *Basidiobolus ranarum*	Micosis que genera cuadros a nivel cutáneo e intestinal. Los cuadros cutáneos se dan principalmente en extremidades. Las lesiones se suelen observar como una placa eritematosa, de bordes definidos. Por su parte los cuadros intestinales, se presentan con dolor y distensión abdominal.	Biopsia En los casos en los que haya sospecha de este agente etiológico, no mantener las muestras en refrigeración.	Se realiza en KOH 10 - 20 %. Se observa micelio hialino espaciadamente septado.	Colonias de crecimiento rápido, de color blanquecino, que suele plegarse en el centro. Al microscopio se observan las balistosporas de 7 - 15 µm, y se pueden observar también las zigosporas de 20 - 50 µm, de pared gruesa y con un ápice prominente.
Conidiobolomicosis *Conidiobolus coronatus*	Micosis subcutánea propia de climas cálidos y húmedos. Se presenta como masas infiltradas a nivel de mucosa nasal y tejido subcutáneo. Ocasionalmente puede diseminar a otros órganos.	Biopsia	Se realiza en KOH 10 - 20%. Se observa micelio hialino espaciadamente septado.	Colonia glabra de color crema o café, de crecimiento rápido. Al microscopio se observan las balistosporas de 10 - 30 µm, una papila prominente, por lo que se les describe con forma de limón, y pueden presentar vellosidades o no.
Adiaspiromicosis *Emmonsia parva* y *Emmonsia crescens*	Micosis rara que se presenta como una afectación pulmonar o conjuntivitis, principalmente. La mayoría de los casos se ha reportado en sitios cercanos al río Amazonas.	Biopsia	Se utilizan tinciones como hematoxilina y eosina o PAS. Se observan las adiasporas, estructuras redondas de pared gruesa y vacías que van de 150 - 400 µm para *E. crescens* y de 10 - 40 µm para *E. parva*.	No se ha logrado obtener un crecimiento de este agente etiológico a partir de muestras provenientes de pacientes.
Emergomicosis *Emergomyces* spp.	Micosis rara, que afecta principalmente a pacientes inmunosuprimidos principalmente pacientes VIH positivo, con conteos bajos de CD4+. Se presenta como un cuadro pulmonar, aunque el hongo puede diseminar a varios órganos.	LBA Esputos inducidos Biopsia	Examen directo de poca utilidad. Se recomienda el uso de tinciones como Pas y Grocott. Se observan blastosporas intra y extracelulares de 2 - 5 µm.	Colonias beige de crecimiento lento (20 - 30 días), y filamentosas. A nivel de microscopio se observa microconidias, que se forman directamente de la hifa o a partir de conidióforos cortos.
Pitiosis *Pythium insidiosum*	Micosis subcutánea endémica de zonas tropicales y subtropicales, se relaciona con nichos acuáticos. Afecta principalmente a animales. Se suele presentar en	Biopsia Exudados de lesiones En los casos se sospecha de este	Se realiza en KOH 10 - 20%. Se observa micelio hialino espaciadamente septado, poco ramificado, con 3 - 10 µm de diámetro (ligeramente más ancho	Colonias de crecimiento rápido y color blanco. Al microscopio se observa el micelio hialino espaciadamente septado, por lo que no es posible realizar su identificación a nivel de microscopía. Se recomienda el uso de MALDI-TOF, en caso de

	extremidades con gangrena progresiva y arteritis crónica. También puede causar cuadros a nivel ocular, similar a una queratitis micótica.	agente etiológico, no mantener las muestras en refrigeración.	que el observado en los casos de mucormicosis).	no contar con esta herramienta en el centro de salud, dirigirse al hospital clase A más cercano.
Infecciones pocos frecuentes por microorganismos no fúngicos				
Rinosporidiosis *Rhinosporidium seeberi*	Infección subcutánea causada por un protozoario. Se sospecha que el hábitat de este microorganismo es el fondo de ríos, lagos y estanques. Esta enfermedad es endémica del subcontinente indio. También se han descrito casos en Brasil, Colombia, Venezuela y la región de El Chaco. El cuadro más común lo causa a nivel nasal, en el cual se observa lesiones polipoides de aspecto irregular, color rosa y sésiles. También se han descrito cuadros en laringe, faringe, ojos, piel y a nivel genital.	Biopsia	Se realiza en KOH 10 - 20 %. Se observa un esporangio de 300 - 350 µm, con endosporas de 6 - 10 µm.	Microorganismo no cultivable.
Prototecosis *Prototheca* spp.	Infecciones por algas aclorófilas. Genera cuadros a nivel cutáneo, las lesiones son polimorfas y de desarrollo lento. Se han descrito casos con diseminación a distintos órganos.	Biopsia	Se realiza en KOH 10 - 20 %. Se observan esporangios de 6 - 26 µm, con pocas endosporas o sin estos, no produce gemaciones.	Colonias levaduriformes de color blanco, amarillento o crema. Al microscopio se observa el esporangio con divisiones internas, produciendo de 2 a 20 endosporas. Para la identificación a nivel de especie es necesario el uso de sistemas automatizados de asimilación de carbohidratos.

1. Los cultivos sospechosos y positivos por estos agentes etiológicos deben ser trabajados en cámara de bioseguridad nivel III. Se recomienda realizar los cultivos en tubos.

Cultivo de las muestras:

Las características de inoculación, tiempo de incubación y lectura de placas depende del tipo de muestra procesado, y está indicado según el tipo de muestra en los capítulos correspondientes de este manual.

FASE POSTANALÍTICA

Análisis e interpretación de cultivos

El análisis e interpretación de cultivos se realiza según el tipo específico de muestra y está descrito en cada capítulo correspondiente de este manual.

Reporte de resultados

Reporte de examen directo

1. En el examen directo reportar según las características observadas
    a. **“Se observan esférulas.”**
    b. **“Se observan blastosporas con base de implantación ancha.”**
    c. **“Se observan blastosporas intracelulares con un septo central.”**
    d. **“Se observan blastosporas intracelulares.”**
    e. **“Se observa micelio hialino espaciadamente septado.”**
    f. **“Se observan adiasporas.”**
    g. **“Se observan esporangios.”**

2. Si al examen directo no se observan estructuras fúngicas, reportar:
    a. **“No se observan estructuras fúngicas.”**

Reporte de cultivo

1. Si el cultivo está negativo y el examen directo está negativo, reportar:
    a. **"Cultivo negativo por hongos."**
2. Si se logra aislar el agente causal e identificarlo, reportar:
    a. **"Positivo por (género y especie) o sólo género."**
3. Si se logra aislar varios agentes causales e identificarlos, reportar:
    a. **"Positivo por: (género y especie) o sólo género**

    (género y especie) o sólo género."
4. Si el cultivo está negativo y el examen directo está positivo, reportar:
    a. **"No se obtuvo crecimiento del agente causal".**
5. Si se observa crecimiento de 1 o más microorganismos que se consideran que no son de importancia clínica, reportar:
    a. **"Cultivo negativo por hongos".**

REFERENCIAS

1. Mahon CR, Lehman DC. Textbook of Diagnostic Microbiology. 7ma ed. St Louis, Missouri. Elsevier Health Sciences; 2022.
2. Gross N, Salas Campos I. Métodos diagnósticos en Micología Médica. 1ra ed. 2da reimpresión. San José, Costa Rica: Editorial UCR; 2015.
3. Bonifaz A. Micología Médica Básica. 6ta ed. Ciudad de México: McGraw-Hill interamericana editores; 2020.

Módulo 17: Diagnóstico micológico de infecciones en sangre total (fungemia)

FASE PREANALÍTICA

Solicitud de análisis: Cuadros clínicos asociados

La detección de bacteriemia y fungemia en el laboratorio es una de las funciones más importantes y complejas, ya que resulta ser un indicador de enfermedad diseminada, y la mortalidad atribuible a estas dos condiciones sigue siendo superior al 12 %, por lo que una identificación rápida, precisa y confiable de estos pacientes es crítica, pues los resultados del hemocultivo van a guiar la terapia farmacológica, los procedimientos quirúrgicos posteriores, la eliminación de las vías de acceso vascular y otras intervenciones clínicas que el paciente requiera. Los signos y síntomas propios de una infección sanguínea son los deben alertar al clínico para la solicitud de este análisis (fiebre, malestar general, hipotensión, lesiones periféricas, disfunción multiorgánica…).

El procesamiento de muestras para la recuperación de hongos se realiza habitualmente junto con el procedimiento para la recuperación de bacterias, como una extensión de este, la principal diferencia es la selección de los medios de cultivo para la siembra primaria si las botellas de hemocultivo son positivas.

Al igual que en bacteriología, el volumen de sangre agregado a cada botella, la relación sangre-medio de cultivo y la cantidad de botellas de hemocultivos de los diferentes sitios anatómicos son factores importantes, siendo el volumen de sangre, la variable más importante (1), ya que existe una relación directa entre dicho volumen y la probabilidad de recuperación de patógenos (2).

Por otro lado, se deben obtener simultáneamente varias botellas de diversos sitios anatómicos para detectar bacteriemia o fungemia, ya que una sola botella de hemocultivo carece de la sensibilidad suficiente, y brinda información que es difícil de interpretar, a menos que el patógeno aislado sea uno que rara vez, o nunca, se recupera como contaminante (por ejemplo, hongos patógenos como *Histoplasma capsulatum*), sin

embargo, aquellos microorganismos que si se van a considerar patógenos suelen aparecer en más de una de las botellas de hemocultivo de una serie (2).

Se debe tomar en cuenta que incluso las muestras de sitios normalmente estériles pueden contaminarse con microbiota cutánea durante la recolección y/o el transporte y la preparación, por lo que para valorar su importancia se debe considerar la identidad del aislado, la recuperación a partir de múltiples muestras o la presencia del microorganismo en múltiples medios medios de cultivo (en lugar de una sola colonia) que pueden aumentar la sospecha cuando otros criterios no son evidentes (3).

Diagnóstico diferencial

Diversas infecciones sanguíneas causadas por parásitos, virus, bacterias, entre otros (2).

Muestras clínicas, transporte y conservación

Tabla Resumen. Información requerida para el procesamiento	
Datos del paciente	-Nombre completo, número de identificación, sexo y fecha de nacimiento. -Posible diagnóstico o cuadro clínico. -Fecha de inicio de síntomas. -Terapia recibida. -Lugar de procedencia.
Datos de la muestra	-Fecha y hora de la toma de muestra. -Técnica de obtención de la muestra. -Sitio de la toma de muestra. -Tipo de muestra. -Servicio que envía la muestra. -Responsable de la toma de muestra.
Muestras clínicas indicadas	
-Sangre venosa periférica, obtenida ya sea por venopunción o por extracción de sangre a través de catéter.	

Criterios de rechazo
-Muestras que su rotulación sea inadecuada o no coincida con los datos de la orden médica. -Muestras que no estén rotuladas. -Frascos dañados, rotos, en mal estado o cumplida su fecha de expiración (no se deben de recibir frascos de hemocultivos que estén a menos de 5 días de expiración, por los tiempos de incubación). -Frascos de hemocultivo entregados 12 horas posterior a la toma de la muestra. -Muestras obtenidas con anticoagulante (diferente de SPS que tiene la botella). -Los hemocultivos no deben refrigerarse después de la recolección de la muestra (3).
Observaciones
*Si los frascos recibidos en el laboratorio no cumplen los criterios de aceptación, pero por la criticidad de la muestra, se recomienda procesar los frascos y siempre indicar la anomalía presentada en el reporte final. -Debido a la naturaleza de la muestra si hace falta algún dato de los mencionados anteriormente, el personal de laboratorio debe de llamar al servicio y recabar la información faltante (4). -Siempre que sea posible, para aumentar la probabilidad de recuperación de un organismo fúngico, la muestra debe recolectarse antes de administrar un agente antimicótico.
Recipiente indicado para la recolección
-Toma con jeringa y aguja para su trasvase inmediato en frascos de hemocultivo.
Condiciones de transporte
-Las botellas de hemocultivo deben transportarse al Laboratorio Clínico lo más pronto posible a temperatura ambiente; idealmente en un tiempo menor de 2 horas luego de inoculada la botella para su incubación. De esta manera, evita retrasos en la detección o impedir el crecimiento de los microorganismos (1,5). -Los equipos automatizados utilizan señales basales para detección de crecimiento bacteriano, por lo que el retraso en su ingreso al sistema puede ocasionar lecturas erróneas de señales basales y positividad (1).

FASE ANALÍTICA

Consideraciones generales de procesamiento de muestras de sangre total

1. No es recomendable el procesamiento de hemocultivos manuales, ya que no permiten la monitorización continua, así como agitación constante, se recomienda que estos sean sustituidos por equipos automatizados como Bactec [BD Diagnostics, Sparks, MD], BacT/ALERT [bioMérieux, Durham, NC], VersaTREK [TREK Diagnostic Systems, Cleveland, OH] (1). Incluso sin medios específicos para hongos, los sistemas automatizados y de monitoreo continuo pueden recuperar *Candida* spp.*, Cryptococcus* spp.*, Rhodotorula* spp. *y Trichosporon* spp. (1). Todas las blastosporas (excepto la mayoría de las especies de *Malassezia* spp.) se pueden recuperar en sistemas de hemocultivo de rutina. Sin embargo, se debe tener en cuenta que la recuperación de

hongos miceliales se mejora cuando se utilizan medios fúngicos especiales como frascos de hemocultivo micológicos especializados, sistema de centrifugación por lisis o BD BACTEC Myco/F lytic (2).

2. El volumen de muestra inoculada en las botellas es la variable más importante para el rendimiento del hemocultivo. El Laboratorio Clínico debe establecer medidas para controlar y registrar este punto. Si el volumen es subóptimo, se recomienda participar activamente en la comunicación a los servicios y capacitación continua (1,4).
3. Se debe trabajar en todo momento dentro de la cámara de bioseguridad, siendo que hay exposición a microorganismos infecciosos por producción de aerosoles. Estos se generan de forma regular en la manipulación y trabajo de botellas de hemocultivo (1).
4. Sólo se recomienda la extracción a intervalos cuando se documenta una bacteriemia persistente (endocarditis infecciosa o infección asociada a catéter) (1).
5. Se recomienda repetir hemocultivos después de 24 - 48 horas si se desconoce el foco infeccioso y la primera serie de hemocultivos es negativa (4).
6. El hemocultivo es una prueba crítica por lo que debe de informar su avance en todo momento. Consecuentemente se requiere atención directa a este proceso en los tres turnos y los 7 días de la semana. Esto incluye el ingreso al sistema automatizado de nuevas botellas, procesamiento de hemocultivos positivos cuando alerte el sistema, así como el informe de resultados preliminares (1,6).

Cuadro 17.1. Equipos e insumos requeridos

Activos base	Analizadores base	Activos adicionales
Cámara de bioseguridad Incubadora a 30 °C (o caja en un cuarto a temperatura ambiente en su defecto)	Microscopio de luz, con objetivos de 10X, 20X, 40X y 100X Analizador automatizado de hemocultivos[1] Sistema automatizado para ID y PSA	Sistema MALDI-TOF [1]
Medios de cultivo	**Insumos**	**Pruebas complementarias**

Botella hemocultivo adulto aerobio Botella hemocultivo pediátrico aerobio Agar Sabouraud glucosado (SDA) Agar cromogénico para *Candida* spp.[1] Agar Dixon.[1]	Portaobjetos Asas bacteriológicas Alcohol 70 % Aguja doble o jeringa Reactivos para tinción Gram Tinta china	Técnicas moleculares[1] Marcadores tempranos de infección fúngica invasiva (β-D-glucanas)[1]

1. Según la disponibilidad en el centro de salud

Volumen de muestra indicado

Pacientes adultos: Se recomienda inocular de 8 a 10 mL por frasco para hemocultivo aerobio de al menos dos sitios anatómicos diferentes para un total de 16 a 20 mL de sangre, para poder obtener la mayor tasa de recuperación en el menor tiempo de detección (1,2).

Pacientes pediátricos: El volumen y número de muestras a obtener depende del peso del paciente (ver cuadro 17.2) (2). La cantidad de hemocultivos extraídos a la vez es fundamental para la interpretación adecuada de los resultados del hemocultivo. Por lo tanto, se deben extraer no menos de dos hemocultivos en estos pacientes (1).

Cuadro 17.2. Volúmenes de sangre recomendados para hemocultivos en pediatría. (1,7)

Peso del paciente (kg)	Total del volumen del paciente (mL)	Punción venosa	Volumen de sangre recomendado		Volumen total recolectado (mL)
			Set 1	Set 2	
≤ 1	50-99	1 sitio	2	-	2
1.1-2	100-200	2 sitios	2	2	4
2.1-12.7	> 200	2 sitios	4	2	6
12.8-36.3	> 800	2 sitios	5	5	10
>36.3*	> 2200	20-30	20-30	20-30	40-60

A partir de 36.3kg se trata como adultos para la toma de muestra y selección de botellas aerobio.

Recolección de la muestra para diagnóstico micológico:

Por su naturaleza estas muestras van a ser recolectadas asépticamente por personal médico (2,8), en general la técnica consiste en:

1. El encargado de la toma se debe lavar las manos, utilizar cubrebocas y guantes.
2. Desinfectar la piel del paciente con tintura de yodo o clorhexidina antes de la punción.
3. Extraer por punción con aguja el volumen requerido de muestra según el tipo de paciente y frasco. Cambiar la jeringa entre sitios anatómicos.
4. Colocar la sangre extraída en frascos estériles para hemocultivo por punción del frasco.
5. Enviar al laboratorio clínico lo más pronto posible a temperatura ambiente.

Procesamiento de la muestra para diagnóstico micológico:

1. Verificar que los datos personales de la solicitud de análisis micológico correspondan con los datos de la muestra enviada.

2. Revisar que la muestra haya sido tomada en el frasco de hemocultivo adecuado, verificar la integridad de la botella: que no esté dañada, rota, en mal estado o que esté vencida (no se deben de recibir frascos de hemocultivos que estén a menos de 5 días de expiración, por los tiempos de incubación).

3. Ingresar las botellas de hemocultivo al sistema automatizado. Esta incubación se realiza a 37 °C.

4. **Tiempo de incubación**: Los sistemas automatizados de monitoreo continuo pueden detectar la mayoría de las especies de células levaduriformes dentro de un período de incubación estándar de 5 a 7 días. La incubación prolongada (p. ej., 10 a 14 días) se puede

aplicar en algunos laboratorios cuando se sospecha fuertemente la fungemia y los frascos siguen siendo negativos después de 5 días (1).

Hemocultivos positivos:

a. Extraer la botella del equipo automatizado y registrar el tiempo de positividad en horas.

b. Desinfectar el tapón de hule de la botella con alcohol e insertar la aguja doble o jeringa con aguja.

c. Colocar 1 - 2 gotas sobre un portaobjetos y dispersar por extendido. Dejar secar al aire (no colocar en plancha). Fijar con metanol.

d. Realizar tinción de Gram.

Tinción de Gram:

Esta tinción se utiliza ampliamente en la mayoría de los laboratorios de microbiología para el examen directo de hemocultivos positivos, las hifas, pseudohifas y blastosporas de *Candida* spp. u otros. se pueden visualizar fácilmente ya que se tiñen como Gram positivos (es decir, de color púrpura), sin embargo, se debe recordar que este método no permite un examen morfológico detallado de los hongos (1).

Cuadro 17.3 Resultados que se pueden obtener al visualizar la Tinción de gram

Estructura observada	Cuadro clínico sugestivo (se debe de esperar al resultado del cultivo para confirmar el diagnóstico)
Blastosporas de 2 - 7.5 µm ovaladas o redondeadas, gemantes con pared delgada, sin cápsula, acompañadas o no de pseudomicelio y micelio	Candidiasis o *Saccharomyces* spp.
Blastosporas ovaladas pequeñas características (en su mayoría de ≤ 2 µm de tamaño) con una yema unipolar sin formas hifales (3).	*Malassezia* spp.

Blastosporas y/o artrosporas	*Trichosporon* spp.
Blastosporas con cápsula	Criptococosis
Artrosporas	*Geotrichum* spp.
Blastosporas intracelulares de 2 - 5 µm con aspecto de "media luna" (se observan mejor en una tinción con derivados de Romanowsky que con la tinción de Gram)	Histoplasmosis
Micelio	Hongos filamentosos

Nota:

1. Las blastosporas se presentan como "células en gemación" redondas, ovoides o elipsoides, con o sin pseudohifas, la gemación es una característica importante que se debe utilizar para diferenciar las blastosporas de otros objetos redondos y ovalados que podrían estar presentes en las muestras clínicas, tomar en cuenta el tamaño, el sitio de unión y el número de células hijas, así como la presencia o ausencia de cápsula (1).
2. Realizar tinción con tinta china si la morfología de las blastosporas es sospechosa de *Cryptococcus* spp.
3. En casos de hemocultivos, para la recuperación de *Histoplasma capsulatum* se debería incubar por un tiempo muy prolongado (4 semanas en promedio) por lo que rutinariamente en el laboratorio de Bacteriología, este agente no se aísla. Si se sospecha de este hongo, realizar un método de lisis-centrifugación descrito en el Módulo 13 de este manual.
4. Informar al servicio donde se encuentre el paciente lo observado en el Gram, tiempo de positividad, número de botellas positivas y sitio anatómico. Ejemplo: Hemocultivo positivo a las 48 horas de incubación (1/2 botellas: miembro inferior derecho), se observa blastosporas.
5. Trabajar todas las botellas positivas, ya que pueden existir coinfecciones con diferentes microorganismos o la misma especie con distintos patrones de resistencia a los antifúngicos.
6. Si su centro de salud cuenta con paneles de biología molecular como el Panel de Identificación de Hemocultivo (BCID) de FilmArray® u otras plataformas de

diagnóstico molecular puede proceder a utilizarlo para acelerar el proceso de identificación del microorganismo.

Hemocultivos negativos:

a. Retirar la botella del equipo automatizado al término de la incubación.

b. Reportar el hemocultivo como negativo a los días de incubación establecidos

Cultivo de las muestras positivas:

Inoculación

1. Realizar subcultivos en placas según lo observado en la tinción de Gram (Ver cuadro 17.4). La siembra debe realizarse por dispersión/agotamiento en los cuadrantes con el fin de aislar las colonias.

Cuadro 17.4. Procesamiento inicial de hemocultivos positivos a partir de la observación de tinción Gram

	Tinción de Gram	**Medios de Cultivo**		
		COS	**CHO**	**Medios Micología**
Botella Hemocultivo Aerobios Positiva	Blastosporas gemantes ovaladas o redondeadas, pared delgada, con o sin cápsula, acompañadas o no de pseudomicelio y micelio.	X	X	SDA Agar cromogénico para *Candida* spp.[1]
	Blastosporas ovaladas pequeñas con una gema unipolar sin formas hifales.	X	X	Medio Dixon, si no se tiene utilizar SDA con 10 % de aceite de oliva[1]
	Observación de hongos filamentosos	X	X	SDA

1. Según la disponibilidad en el centro de salud

2. De previo a la inoculación de las muestras clínicas, es importante dejar que el medio alcance la temperatura ambiente, este debe secarse para eliminar el exceso de humedad de la superficie.

3. Sellar con cinta permeable de celulosa o Parafilm para evitar que las placas se sequen o sufran de una infestación de ácaros. Incubar a 30 ± 2 °C en un ambiente aerobio.

Tiempo de incubación:

Los repiques a partir de la botella de hemocultivo requieren de 24 a 48 horas de incubación. En caso de hongos filamentosos o dimórficos, se puede requerir más tiempo.

Lectura de las placas:

Cuadro 17.5. Tiempos de lectura de placas de cultivo por hongos

Lectura (3)	**Observaciones**
-El equipo automatizado realiza lecturas periódicas de las botellas de hemocultivo -Los repiques de placas deben leerse a las 24 h y 48 h -Si es necesario, prolongar el tiempo de incubación del repique y leer diariamente	Algunas veces el repique de la botella a las 24 horas no ha crecido lo suficiente para trabajar el aislamiento. En esos casos, incubar 24 horas más o hasta que se tenga un crecimiento suficiente.

NOTAS:

- Las pruebas moleculares utilizadas como marcadores de infección a partir de muestras directas (suero, plasma o sangre total), son de gran utilidad. Sin embargo, deben ser interpretadas con precaución en el contexto clínico de cada paciente en particular.
- Los marcadores tempranos de infección fúngica como las 1,3-β-D-glucanas son excelentes herramientas diagnósticas. Para efectuarlas se deben seguir las recomendaciones del fabricante. Su solicitud requiere de aprobación de

especialistas médicos y el envío corresponde al centro de salud de referencia según la red de la CCSS, pues no están disponibles en todos los niveles de atención.

FASE POSTANALÍTICA

Análisis e interpretación de cultivos

- Realizar estudios micológicos de las colonias observadas dentro de la cámara de bioseguridad. NUNCA abrir las placas fuera de la cabina de bioseguridad.
- Para la identificación de las blastosporas se debe hacer uso del sistema automatizado para ID y PSA, disponible en el centro de salud. Por su parte la identificación de los hongos filamentosos se basa en la observación de las características tanto macroscópicas como microscópicas del hongo.

Nota: En algunas ocasiones la identificación mediante métodos bioquímicos o por observación de las características macroscópicas y microscópicas de un hongo no son suficientes para lograr una correcta identificación del microorganismo, ya sea blastosporas u hongos filamentosos. En dichos casos se pueden usar otras metodologías como el sistema MALDI-TOF, que pueden ser útiles en casos de difícil identificación

Características macroscópicas

Tomar en consideración:

1. Producción de pigmento en la placa.
2. Color de la colonia.
3. Aspecto de la colonia (algodonosa, pulverulenta, harinosa, entre otros).
4. Tiempo de incubación.

Nota: Si observa el crecimiento de un hongo filamentoso, con colonias algodonosas o ligeramente pulverulentas, con pigmento amarillento o rojizo que difunde al medio puede ser una colonia de *Histoplasma capsulatum*. Recordar el uso de cámara de bioseguridad para la manipulación de estos cultivos.

Características macroscópicas

- Realizar el montaje de colonias sospechosas en azul de lactofenol o lactofenol claro según sea el caso.

- Se puede realizar el montaje utilizando cinta adhesiva o con el asa entre portaobjetos y cubreobjetos, intentando no alterar el hongo para poder visualizar las características microscópicas de cada género:

1. Tipo de conidias.
2. Tipo de conidióforos.
3. Características del micelio.

Cuadro 17.6. Principales microorganismos aislados de cultivos de Sangre	
	Agente causal
Blastosporas (1,2)	*Candida* spp. *Complejo C. neoformans/C. gattii* *Trichosporon* spp., *Geotrichum* spp., *Saccharomyces* spp., *Saprochaete* spp., *Malassezia* spp., *Rhodotorula* spp
Hongos Dimórficos	*Histoplasma capsulatum* *Paracoccidioides* spp.
Hongos Filamentosos (1,2,8)	**Hialinos**
	Fusarium spp. *Scedosporium* spp. *Aspergillus* spp.
	Fuliginosos
	Aureobasidium pullulans

NOTA: En el caso de las *Candida parapsilosis* los sistemas de identificación bioquímica, son insuficientes para separar las especies *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis*, cuyas sensibilidades a antifúngicos son variables y no se encuentran validadas en las tarjetas de PSA. Por lo que, ***Candida parapsilosis*** **aislada de hemocultivos** debe enviarse al Laboratorio de la red de la CCSS que cuente con identificación por MALDI-TOF, y reportar la PSA con una nota “PSA preliminar” hasta su confirmación.

Reporte de resultados

Reporte de tinción de Gram

1. Por frecuencia, en la mayoría de los hemocultivos los reportes son bacterianos, pero si se trata de hongos se debe reportar la tinción de Gram según las características observadas:
    a. **"Se observan blastosporas y/o micelio"**

NOTA: si las blastosporas observadas tienen características particulares que le permiten diferenciar un género puede hacerse la observación en notas, por ejemplo: Se observan blastosporas con cápsula semejantes a *Cryptoccocus* spp.

Reporte de cultivo

1. Si se logra aislar el agente causal e identificarlo, reportar:
    a. **"Positivo por (género y especie) o sólo género + PSA + tiempo de positividad en horas".**

2. Si se logra aislar varios agentes causales e identificarlos, reportar:
    a. **"Positivo por:**

(género y especie) o sólo género + PSA + tiempo de positividad en horas.

(género y especie) o sólo género + PSA + tiempo de positividad en horas".

3. Si la botella completa la incubación requerida y no hubo positividad, reporte:
    a. **"Cultivo negativo a los 5 días de incubación".**

4. Valorar la inclusión de reportes preliminares a las 24 y 48 horas de incubación, de acuerdo al contexto y posibilidades de cada centro, reportar:
    a. **"Cultivo negativo a las 24 horas de incubación".**
    b. **"Cultivo negativo a las 48 horas de incubación".**

REFERENCIAS

1. Leber AL (Ed.). Clinical Microbiology Procedures Handbook. 4ta ed. Washington, D.C.: American Society for Microbiology (ASM); 2024.
2. Carroll K, Pfaller M. Manual of Clinical Microbiology. Vol. 1. 13ra ed. Washington DC: ASM Press; 2023.
3. Wengenack NL. CLSI M54 Principles and Procedures for Detection and Culture of Fungi in Clinical Specimens. 2da ed. Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI); 2021.
4. Miller JM, Binnicker MJ, Campbell S, Carroll KC, Chapin KC, Gonzalez MD, et al. Guide to Utilization of the Microbiology Laboratory for Diagnosis of Infectious Diseases: 2024 Update by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society for Microbiology (ASM). Clin Infect Dis. 2024; ciae104.
5. Guna MR, Larrosa N, Marín M, Rodríguez JC. Diagnóstico microbiológico de la bacteriemia y la fungemia: hemocultivos y métodos moleculares. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2019; 37(5):335–40.
6. Lamy B, Dargère S, Arendrup MC, Parienti JJ, Tattevin P. How to Optimize the Use of Blood Cultures for the Diagnosis of Bloodstream Infections? A State-of-the Art. Front Microbiol. 2016 May 12;7:697.
7. Ombelet S, Barbé B, Affolabi D, Ronat JB, Lompo P, Lunguya O, et al. Best Practices of Blood Cultures in Low- and Middle-Income Countries. Front Med (Lausanne). 2019; 6:131.
8. Gross N, Salas Campos I. Métodos diagnósticos en Micología Médica. 1ra ed. 2da reimpresión. San José, Costa Rica: Editorial UCR; 2015.

Anexos

Sobre referencia de aislamiento a otros centros

Con el fin de facilitar la práctica clínica en micología en cuanto a la aparición de ciertos aislamientos que requieren ser enviados a otros centros debido a su naturaleza, se presenta la siguiente tabla para dirigir el trabajo en el laboratorio.

Cuadro Anexo 1. Resumen de aislamientos micológicos que requieren envío de confirmación a otros Centros Salud

RESULTADO	ACCIÓN A REALIZAR	OBSERVACIONES
Candida parapsilosis (Hemocultivos y líquidos estériles)	Enviar aislamiento al laboratorio de la red correspondiente con MALDI-TOF Reportar PSA preliminar	Solo mediante espectrofotometría de masas es posible diferenciar entre *C. parapsilosis*, *C. metapsilosis* y *C. orthopsilosis.*
Candida (cualquier especie) con R o I a azoles	Enviar a INCIENSA (formulario R86) Reportar PSA preliminar	Alerta resistencia a azoles-INCIENSA junio 2023 *C. krusei* tiene resistencia intrínseca al fluconazol.
Candida auris	Enviar a INCIENSA (formulario R86) Reportar PSA preliminar	Alerta *Candida auris* en Costa Rica - INCIENSA enero 2024
Candida haemulonii (Hemocultivos y líquidos estériles)	Reportar como *C. haemulonii* complejo Enviar a INCIENSA (formulario R86) Reportar PSA preliminar	Solo mediante técnicas moleculares es posible diferenciar entre las especies de este complejo.
Trichosporon *(excepto T. asahii)*	Enviar aislamiento al laboratorio de la red correspondiente con MALDI-TOF	La espectrofotometría de masas tiene una mejor diferenciación de especies. Solo la identificación de *T. asahii* por bioquímica es confiable
Candida de baja frecuencia o que no se logra identificar hasta especie (Hemocultivos y líquidos estériles)	Enviar aislamiento al laboratorio de la red correspondiente con MALDI-TOF Reportar PSA preliminar	La espectrofotometría de masas tiene una mejor diferenciación de especies.

Cuadro Anexo 1. Resumen de aislamientos micológicos que requieren envío de confirmación a otros Centros Salud

RESULTADO	ACCIÓN A REALIZAR	OBSERVACIONES
Aspergillus que no se logra identificar a nivel de sección por métodos convencionales (de muestras de respiratorias, tejidos, líquidos, hemocultivos)	Enviar aislamiento al laboratorio de la red correspondiente con Maldi-Tof Reportar *Aspergillus* sp. (pendiente identificación de especie)	La espectrofotometría de masas tiene una mejor diferenciación de secciones y especies.
Fusarium que no se logra identificar a nivel de especie por métodos convencionales (de muestras de respiratorias, tejidos, líquidos, hemocultivos)	Enviar aislamiento al laboratorio de la red correspondiente con MALDI-TOF Reportar *Fusarium* sp. (pendiente identificación de especie)	La espectrofotometría de masas tiene una mejor diferenciación de complejos y especies.
Aislamientos de dermatofitos que no se logra identificar especie por métodos convencionales	Enviar aislamiento al laboratorio de la red correspondiente con MALDI-TOF Reportar *Género del dermatofito* (pendiente identificación de especie)	La espectrofotometría de masas tiene una mejor diferenciación de especies.

Sobre uso de nomenclatura fúngica actualizada

En microbiología, existe un cambio constante de la nomenclatura de las especies de acuerdo a las revisiones más recientes de la taxonomía basada en la genética; por lo que se recomienda la aplicación de los siguientes cambios en el reporte de los hallazgos clínicos. Esto con el fin de introducir la nueva nomenclatura, sin provocar confusiones en la práctica clínica.

Cuadro Anexo 2. Cambios de nomenclatura en Micología de aplicación en la práctica clínica de la CCSS

NOMENCLATURA ACTUAL	NOMENCLATURA NUEVA	REPORTE
Candida haemulonii	*Candida haemulonii*	*Candida haemulonii* complejo
Candida famata	*Debaromyces hanseii*	*Candida famata* complejo
Candida glabrata	*Nakaseomyces glabratus*	*Nakaseomyces glabratus* (*Candida glabrata*)
Candida guillermondii	*Mellerozyma guillermondii*	*Candida guillermondii* complejo
Candida auris	*Candidozyma auris*	*Candida auris*
Candida krusei	*Pichia kudriavzevii*	*Pichia kudriavzevii* (*Candida krusei*)
Candida kefyr	*Kluyveromyces marxianus*	*Candida kefyr*
Candida parapsilosis (identificación por método automatizado).	*sin cambios*	*Candida parapsilosis* complejo
Microsporum gypseum	*Nannizzia gypsea*	*Nannizzia gypsea* (*Microsporum gypseum*)

Microsporum cookei	*Paraphyton cookei*	*Paraphyton cookei* (*Microsporum cookei*)
Microsporum nanum	*Nannizia nana*	*Nannizia nana* (*Microsporum nanum*)
Complejo *Trichophyton mentagrophytes/interdigitale*	**Trichophyton mentagrophytes* (aislamientos animales) **Trichophyton interdigitale* (aislamientos humanos)	*Trichophyton interdigitale*
Scytalidium dimidiatum	*Neoscytalidium dimidiatum*	*Neoscytalidium dimidiatum*
Aspergillus niger	*Aspergillus sección nigri*	*Aspergillus sección nigri* *(A.niger)*
Aspergillus flavus	*Aspergillus sección flavi*	*Aspergillus sección flavi* *(A.flavus)*
Aspergillus versicolor	*Aspergillus sección versicolores*	*Aspergillus sección versicolores* (*A.versicolor*)
Aspergillus terreus	*Aspergillus sección terri*	*Aspergillus sección terri* (*A.terreus*)
Aspergillus fumigatus	*Aspergillus sección fumigati*	*Aspergillus sección fumigati* (*A.fumigatus*)
Aspergillus clavatus	*Aspergillus sección clavati*	*Aspergillus sección clavati* (*A.clavatus*)
Histoplasma capsulatum	*Complejo Histoplasma capsulatum*	Por convención dado que en la literatura reciente aún se utiliza el término como una especie, se continuará utilizando "*Histoplasma capsulatum*".

		Aunque actualmente se conoce que es un complejo de especies sólo diferenciables por secuenciación.
Paracoccidioides brasiliensis	*Complejo Paracoccidioides brasiliensis*	Por convención dado que en la literatura reciente aún se utiliza el término como una especie, se continuará utilizando "*Paracoccidioides brasiliensis*". Aunque actualmente se conoce que es un complejo de especies únicamente diferenciables por secuenciación.
Lacazia loboi	*Paracoccidioides loboi*	Lacazia loboi (*Paracococcidioides loboi*) Por convención se usará el nombre descrito en los libros de texto de consulta, pues el nuevo todavía no es de uso frecuente.
Pseudalleschaeria boydii	*Scedosporium boydii*	*Scedosporium* (*Pseudallescheria*) *boydii*

Sobre el uso recomendado de los medios de cultivo

Cuadro Anexo 3. Uso de medios de cultivo en Micología de aplicación en la práctica clínica de la CCSS			
Tipo de muestra		**Agar recomendado**	
Superficiales			
Uñas de manos		MYC	SGC
Uñas de pies		MYC	SGC
Piel	Axilas	MYC	SGC
	Inframamario	MYC	SGC
	Ingles	MYC	SGC
	Otro sitio	MYC	DTM (SGC)
Pelo		MYC	SGC
Profundas			
Respiratorio (LBA, AET, Lavado bronquial)		MYC	SGC
LCR		SAB	
Otros líquidos		MYC	SGC
Cultivos varios (biopsia, tejido, abscesos, secreciones, ...)		MYC	SGC
Médula ósea		SAB	AS
Hemocultivo		SAB	Cromogénico de *Candida* spp.
Oculares		SGC	

Declaración de intereses

Los autores de este documento declaran que no ha existido ningún conflicto de interés en su realización. Que no poseen relación directa con fines comerciales con la industria sanitaria y no han recibido dinero procedente de la investigación o promoción de dicho tema. Además, declaran no haber recibido ninguna directriz de parte del solicitante o pagador (CCSS) para evaluar técnicamente los resultados presentados. Cada miembro del grupo elaborador llenó su respectivo formulario de declaración de intereses, los cuales serán custodiados por la Coordinación Nacional de Laboratorios Clínicos durante un periodo de 5 años.

Contacto para consultas

Las consultas sobre este manual de procedimientos deberán ser dirigidas a la Coordinación Nacional de Laboratorios Clínicos de la Caja Costarricense del Seguro Social, correo electrónico de la Dra. Ana Lorena Torres Rosales, coordinadora (atorresr@ccss.sa.cr)