

Procedimientos en Microbiología Clínica

Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades
Infecciosas y Microbiología Clínica

21.

Diagnóstico microbiológico de las micosis y estudios de sensibilidad a los antifúngicos

2 0 0 6

Editores: Emilia Cercenado y Rafael Cantón

Coordinador: Ignacio Gadea Gironés

Autores: Manuel Cuenca Estrella

Ignacio Gadea Gironés

Estrella Martín Mazuelos

Javier Pemán García

José Pontón

Juan Luis Rodríguez Tudela



ISBN: 84-611-3540-7

INDICE DEL DOCUMENTO CIENTIFICO

- 1. Introducción**
- 2. Consideraciones clínicas**
 - 2.1. Micosis superficiales y cutáneas
 - 2.2. Micosis subcutáneas
 - 2.3. Micosis tropicales endémicas
 - 2.4. Criptococosis
 - 2.5. Aspergilosis
 - 2.6. Candidosis
 - 2.7. Otras micosis oportunistas
 - 2.8. Estudios de sensibilidad
- 3. Recogida de la muestra**
- 4. Transporte**
- 5. Manejo**
- 6. Procesamiento de la muestra**
 - 6.1. Preparación de las muestras
 - 6.1.1. Tejidos
 - 6.1.2. Esputo y secreciones respiratorias
 - 6.1.3. Líquidos orgánicos (LCR, pleural, peritoneal, articular, etc.)
 - 6.1.4. Fragmentos ungueales
 - 6.1.5. Orina
 - 6.1.6. Biopsias
 - 6.2. Exámen directo
 - 6.2.1. Observación macroscópica
 - 6.2.2. Observación microscópica
- 7. Selección de medios y condiciones de incubación**
 - 7.1. Clasificación
 - 7.2. Preparación
 - 7.3. Control de calidad
 - 7.4. Soporte
 - 7.5. Almacenamiento
 - 7.6. Elección de los medios de cultivo
 - 7.7. Incubación
- 8. Identificación**
 - 8.1. Hongos filamentosos
 - 8.2. Levaduras
 - 8.2.1. Identificación convencional
 - 8.2.2. Medios comerciales basados en la asimilación de nutrientes, en pruebas enzimáticas o inmunológicas
- 9. Informe de los resultados**
- 10. Estudios de sensibilidad**
 - 10.1. Recogida, transporte y conservación de la muestra
 - 10.2. Manejo de la muestra a su recepción en el laboratorio
 - 10.3. Procesamiento de la muestra
 - 10.4. Selección de medios y condiciones de incubación. Cultivos
 - 10.5. Criterios para la interpretación de los resultados
 - 10.6. Procedimientos adicionales a realizar en situaciones especiales
 - 10.7. Información de los resultados
 - 10.8. Métodos rápidos aceptados para la determinación de la sensibilidad a antifúngicos
 - 10.9. Procedimientos no aceptables
- 11. Métodos de diagnóstico rápido. Técnicas no convencionales**
 - 11.1. Transporte, manejo y conservación de la muestra
 - 11.2. Criterios para interpretación de resultados
 - 11.3. Descripción de las diferentes indicaciones
 - 11.3.1. Diagnósticos de la criptococosis
 - 11.3.2. Diagnósticos de la aspergilosis
 - 11.3.3. Diagnóstico de la candidosis
 - 11.4. Detección de componentes no antigénicos
 - 11.5. Información de los resultados
 - 11.6. Procedimientos no aceptados
- 12. Bibliografía**

DOCUMENTOS TÉCNICOS

1. **PNT-MIC-01.** Exámen microscópico con hidróxido potásico
2. **PNT-MIC-02.** Exámen microscópico con blanco de calcoflúor
3. **PNT-MIC-03.** Exámen microscópico con tinta china
4. **PNT-MIC-04.** Tinción argéntica rápida (Gomori-Grocott modificada)
5. **PNT-MIC-05.** Diagnóstico micológico por cultivo convencional
6. **PNT-MIC-06.** Identificación de levaduras mediante medios de cultivo cromogénicos
7. **PNT-MIC-07.** Identificación de levaduras mediante sistemas enzimáticos
8. **PNT-MIC-08.** Identificación de levaduras mediante asimilación de nutrientes. Métodos comerciales
9. **PNT-MIC-09.** Identificación de levaduras mediante criterios inmunológicos
10. **PNT-MIC-10.** Pruebas de diagnóstico rápido y no convencional de las micosis invasoras
11. **PNT-MIC-11.** Pruebas de sensibilidad a los antifúngicos. Microdilución en caldo
12. **PNT-MIC-12.** Pruebas de sensibilidad a los antifúngicos. Método de difusión en agar; E-test y difusión con discos (fluconazol y voriconazol)

Procedimientos en Microbiología Clínica

Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades

Infecciosas y Microbiología Clínica

Editores: Emilia Cercenado y Rafael Cantón

21. DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO DE LAS MICOSIS Y ESTUDIOS DE SENSIBILIDAD A LOS ANTIFÚNGICOS. 2006

Coordinador: Ignacio Gadea Gironés

**Autores: Manuel Cuenca Estrella
Ignacio Gadea Gironés
Estrella Martín Mazuelos
Javier Pemán García
José Pontón
Juan Luis Rodríguez Tudela**

1. INTRODUCCIÓN

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

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

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

En los últimos años se han desarrollado nuevas técnicas diagnósticas independientes del cultivo con la intención de mejorar la sensibilidad y reducir el tiempo necesario para realizar el diagnóstico. Las principales técnicas podemos clasificarlas de la siguiente manera: a) detección en sangre de antígenos y/o anticuerpos, y b) detección de otros componentes fúngicos. Algunas de estas técnicas se han convertido en herramientas básicas en el laboratorio de Microbiología Clínica para el diagnóstico de las infecciones fúngicas invasoras, como la detección del antígeno capsular de *Cryptococcus neoformans*, la detección de antígeno galactomanano en pacientes con aspergilosis invasora, la detección de antígeno manano, anticuerpos anti-manano y anticuerpos anti-micelio para el diagnóstico de la candidosis invasora, y por último, la detección de otros componentes fúngicos no antigénicos, como el (1 \rightarrow 3)- β -D-glucano, para la detección de las infecciones fúngicas invasoras en general (excepto criptococosis y mucormicosis). Junto a estos métodos rápidos, que podríamos denominar no convencionales, coexisten métodos clásicos que permiten el diagnóstico rápido, en ocasiones permitiendo la diferenciación entre colonización e infección, si bien con baja sensibilidad. Nos referimos a los distintos métodos de tinción, incluyendo las preparaciones histológicas.

En la última década se han desarrollado varios métodos para realizar pruebas de sensibilidad *in vitro* a los antifúngicos. Estas técnicas han mostrado una buena reproducibilidad inter-laboratorio y cierta capacidad para detectar la resistencia *in vitro* a estos fármacos, por lo que la mayoría de los expertos creen que las pruebas de sensibilidad a los antifúngicos tienen utilidad clínica. Existen varios métodos de referencia para realizar estas pruebas con levaduras y con hongos filamentosos. Los más difundidos son los del CLSI estadounidense (*Clinical and Laboratory Standards Institute*, antiguo NCCLS), aunque otras sociedades e instituciones también han desarrollado métodos de referencia, como el EUCAST, *European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing* perteneciente a la Sociedad Europea de Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas (ESCMID).

Las pruebas de sensibilidad a los antifúngicos están basadas en las técnicas de microdilución en caldo, que se desarrollaron para conocer la actividad *in vitro* de los antibacterianos. Estas técnicas determinan la CMI (concentración mínima inhibitoria), que se obtiene calculando porcentajes de inhibición respecto a un control de crecimiento. Los estándares incluyen recomendaciones para la conservación, la preparación y la interpretación de las pruebas, así como un sistema para controlar la calidad de los resultados. La introducción de estas técnicas produjo un cambio cualitativo en los estudios de sensibilidad a los antifúngicos. Por primera vez se disponía de métodos reproducibles para detectar la resistencia *in vitro* a estos antimicrobianos, por lo que se podía evaluar su utilidad clínica. La aplicabilidad práctica de una técnica de determinación de sensibilidad reside en la fiabilidad de sus resultados; si estos no son reproducibles no pueden establecerse puntos de corte que guíen las recomendaciones terapéuticas. Además, la aparición de estos estándares ha permitido diseñar y validar varios métodos de difusión en agar y técnicas comerciales para realizar pruebas de sensibilidad a los antifúngicos, que pueden utilizarse para detectar la resistencia a los azoles, particularmente la resistencia a fluconazol en levaduras, que es el reto asistencial más destacable en este campo. En el presente documento también se describen los procedimientos de referencia más utilizados en la actualidad para realizar estas pruebas de sensibilidad. Además, se recogen las técnicas comerciales que se podrían utilizar, dada su buena correlación con los métodos de referencia.

2. CONSIDERACIONES CLÍNICAS

Las infecciones fúngicas pueden causar un gran número de entidades clínicas, con manifestaciones variadas que dependen del lugar de infección y del tipo de paciente. En general, podrían clasificarse según un criterio de profundidad, en superficiales, cutáneo-mucosas, subcutáneas y profundas (endémicas y oportunistas). Son las micosis profundas oportunistas las que han adquirido un protagonismo especial en los últimos tiempos debido, entre otros motivos, al aumento de

incidencia, gravedad y trascendencia del diagnóstico precoz, a lo que habría que añadir la dificultad para diferenciar la colonización de la infección invasora. El aumento significativo de las infecciones fúngicas sistémicas oportunistas es debido, entre otras causas, a las medidas de soporte vital, al aumento del uso de antibióticos de amplio espectro, a la implantación de material protésico, a la terapia con corticoides y, en general, cualquier tipo de inmunosupresión (terapéutica o adquirida). Sin el tratamiento adecuado, la mortalidad de las infecciones fúngicas sistémicas es muy alta, lo que unido a los costes de hospitalización que este tipo de infecciones genera, las convierten en entidades de gran trascendencia en la práctica diaria en el medio hospitalario.

El diagnóstico micológico tradicional, basado en el cultivo, se caracteriza por su lentitud y, en el caso de las micosis sistémicas, por su baja sensibilidad y por la necesidad de obtener muestras por métodos invasores. El hemocultivo, por ejemplo, es, sin lugar a duda, un buen método diagnóstico de las micosis sistémicas; pero requiere incubación prolongada y posee una sensibilidad global de alrededor del 50% en el caso de la infección producida por levaduras, que en el caso de la aspergilosis invasora no llega al 10%. Sigue siendo, sin embargo, el método de elección para el diagnóstico de las micosis superficiales y mucocutáneas. En los últimos años se han desarrollado nuevas técnicas diagnósticas independientes del cultivo con la intención de mejorar la sensibilidad y reducir el tiempo necesario para realizar el diagnóstico. El papel del laboratorio de microbiología es de gran importancia, siendo fundamental para la elección de un tratamiento adecuado la identificación del agente causal de la infección.

2.1. MICOSIS SUPERFICIALES Y CUTÁNEAS

Estas micosis incluyen infecciones muy frecuentes que afectan al estrato córneo de la piel, a la epidermis y a los anejos cutáneos: pelo y uñas. Son infecciones que constituyen una parte importante de las consultas dermatológicas y cuyo diagnóstico de elección sigue siendo el examen directo y el cultivo de las muestras de piel y anejos cutáneos.

2.2 MICOSIS SUBCUTÁNEAS

Están causadas por hongos ambientales inoculados directamente en el tejido celular subcutáneo mediante un traumatismo. Presentan una agresividad local variable. Característicamente no se diseminan a distancia. Entre ellas se incluyen la cromoblastomicosis, esporotricosis, micetomas y una serie de cuadros raros: rinosporidiosis, entomofthoromicosis y lobomicosis. El diagnóstico de estas infecciones suele realizarse por examen microscópico directo y cultivo. En algunas de ellas, como la lobomicosis, el hongo causal no ha podido cultivarse y el diagnóstico es histológico.

2.3. MICOSIS TROPICALES ENDÉMICAS

Conforman un grupo de infecciones cuyos agentes causales acumulan una serie de características curiosas: 1) presentan dimorfismo de temperatura, 2) son patógenos primarios, 3) causan patología diseminada, incluso en pacientes no inmunocomprometidos, 4) tienen una distribución geográfica característica. Aunque pueden afectar a individuos inmunocompetentes, las infecciones en pacientes inmunodeprimidos son más frecuentes y graves. El diagnóstico se realiza por una combinación de métodos convencionales: histología, cultivos y serología; y no convencionales, como la detección de antígenos específicos en sangre y orina (histoplasmosis).

2.4. CRIPTOCOCOSIS

La criptococosis es una enfermedad infecciosa generalmente sistémica que afecta a animales y al hombre, sobre todo en situaciones de inmunosupresión. La criptococosis se adquiere por vía inhalatoria. El hongo responsable es una levadura capsulada, que posee gran afinidad por el sistema nervioso central, siendo la meningoencefalitis la presentación clínica más habitual. Otras presentaciones menos frecuentes son las afectaciones cutánea, ocular, ósea, articular y de la próstata, entre otras, que suelen ser consecuencia de una criptococosis diseminada. La criptococosis adquirió una importancia mayor coincidiendo con la aparición de la infección por el VIH, previamente era una complicación característica de los pacientes hematológicos. Con la introducción de los tratamientos antirretrovirales de alta eficacia, la criptococosis ha vuelto a su situación de micosis rara.

2.5. ASPERGILOSIS

Las aspergilosis son un amplio y heterogéneo grupo de enfermedades oportunistas causadas por hongos filamentosos del género *Aspergillus*. Tiene un ciclo biológico muy simple, con alta capacidad de esporulación y por ello alcanza altas concentraciones de conidias en el aire. La inhalación continua de conidias por el hombre no supone en condiciones normales ningún problema, ya que son eliminadas muy eficazmente por los diferentes mecanismos de defensa. Existen presentaciones clínicas de diferente gravedad, siendo las formas viscerales y diseminadas de extrema gravedad y evolución aguda, principalmente en pacientes que presentan neutropenias graves y prolongadas. Todas ellas exigen un diagnóstico y tratamiento precoces.

2.6. CANDIDOSIS

Las levaduras del género *Candida* poseen una amplia distribución y pueden originar infecciones de distinta localización y gravedad, generalmente asociado a factores predisponentes por parte del huésped, por lo que se las considera patógenos oportunistas. La infección endógena tiene gran importancia y suele suceder a la colonización de diferentes localizaciones del paciente predisuesto.

Las manifestaciones clínicas más frecuentes son la candidosis superficial, estomatitis crónica, candidosis mucocutánea, vulvovaginitis, y en ocasiones cuadros más graves con manifestaciones de diseminación en el paciente crítico o inmunocomprometido, apareciendo como entidades características, la candidosis diseminada, candidemia, endoftalmitis y peritonitis.

2.7 OTRAS MICOSIS OPORTUNISTAS

Constituyen un grupo muy heterogéneo de enfermedades que tienen en común la situación del paciente, la gravedad y la relativa dificultad de diagnóstico. Por otra parte, el diagnóstico etiológico es muy importante, pues la respuesta a los distintos antifúngicos varía con las especies implicadas. En este grupo se incluyen: pneumocistosis, fusariosis, penicilinosis, zigomicosis, pseudallescheriasis, pitosis, infecciones por *Dipodascus capitatus*, trichosporonosis, infecciones por *Scedosporium prolificans* y otras. Algunas de estas infecciones se diagnostican con más facilidad, porque los hongos crecen en abundancia de muestras accesibles, como ocurre en la infección por *Penicillium marneffeii*, mientras que otras requieren procedimientos muy invasores y cierta dosis de fortuna.

2.8. ESTUDIOS DE SENSIBILIDAD

Existe una cierta controversia sobre la utilidad clínica de las pruebas de sensibilidad a los antifúngicos. La mayoría de los expertos coinciden en señalar que los estudios de sensibilidad no son necesarios en todos los enfermos, ya que la información epidemiológica establece cuál puede ser el tratamiento empírico más adecuado. Otros especialistas opinan que estas pruebas deberían realizarse en todas las cepas procedentes de infecciones profundas, particularmente cuando se aíslan en hemocultivos o en muestras tisulares. Por tanto, es difícil decidir cuándo se deben realizar estas pruebas por parte de un laboratorio asistencial. Quizá deberían hacerse rutinariamente en cepas procedentes de enfermos en los que se ha producido un fracaso terapéutico, en casos de pacientes que han recibido profilaxis o tratamiento antifúngico previo, y en cepas pertenecientes a especies poco frecuentes, de las que se desconoce su espectro de sensibilidad *in vitro*. En estos casos, el estudio de sensibilidad puede ayudar a elegir la mejor alternativa terapéutica. Tampoco debe olvidarse que las personas que suelen desarrollar micosis graves son pacientes debilitados, con enfermedades crónicas o con inmunodepresión. En estos casos, el diagnóstico y el manejo de la infección fúngica es muy complicado, por lo que los resultados de los estudios de sensibilidad deben considerarse como un dato más a la hora de tratar la infección, un dato que debe integrarse entre las variables a tomar en consideración cuando nos enfrentamos a una micosis.

3. RECOGIDA DE LA MUESTRA

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

Consejos generales para optimizar la recogida de las muestras:

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

historia clínica, fecha de nacimiento y sexo); datos clínicos (orientación diagnóstica, tratamiento antimicrobiano, enfermedad de base y antecedentes de interés); datos del médico solicitante.

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

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

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

4. TRANSPORTE

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

Las condiciones de transporte y almacenamiento vienen reflejadas en la tabla 1, considerando ciertas variaciones según el agente probable.

5. MANEJO

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

6. PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA

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

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

Consejos generales para optimizar el procesamiento de muestras

1. Comprobar que el etiquetado de la muestra es correcto.
2. Registrar toda la información necesaria que pudiera afectar a la calidad de la muestra y que represente interés diagnóstico (aspecto, color, olor, consistencia, coágulos, etc.), así como todo lo relacionado con su recogida, transporte y conservación.
3. Durante el procesamiento, deben seguirse todas las medidas de seguridad necesarias, tanto para el personal como para la muestra.
4. El procesamiento debe llevarse a cabo tan pronto como sea posible para garantizar la viabilidad del hongo, utilizando el medio de cultivo y la temperatura de incubación más adecuada.
5. La recuperación de los hongos es imprescindible para su identificación y la realización de pruebas de sensibilidad.
6. El tipo de procesamiento y los medios utilizados dependen de las características de cada muestra.

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

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

	Gránulo negro: <i>Exophiala jeanselmei</i> , <i>Leptosphaeria senegalensis</i> , <i>Madurella grisea</i> , <i>Madurella mycetomatis</i> , <i>Pyrenochaeta romeroi</i>			
Heces	Sólo se recomienda en caso de candidosis diseminada.	Si las heces son formes, homogenizar con suero fisiológico estéril. Para el diagnóstico de infecciones fúngicas del tracto gastrointestinal es más útil tomar muestras de biopsia.	Transporte inmediato. Almacenamiento a 4 °C.	
Herida	Levaduras, micetomas, actinomicosis y esporotricosis	Muestra aspirada de la parte profunda y transporte en jeringa sin aguja. Remitir en contenedor estéril	Transporte inmediato.	Muestra del margen activo. Si la muestra se recoge por cirugía, remitir también una porción de la pared del absceso. Si se utiliza hisopo, deberían remitirse varios.
Lentes de contacto:		Siempre que sea posible enviar la lente al laboratorio, si no es posible prescindir de la lente, frotar con torunda la superficie de contacto corneal.	Almacenamiento a 4 °C.	
Líquido intraocular	Endoftalmitis celulitis orbitaria	y Las muestras tienen que recogerse por el oftalmólogo en el quirófano, mediante punción y aspiración del fluido. Si la muestra es muy densa se recoge con bisturí y se coloca en contenedor de boca ancha estéril. También se recomienda inoculación directa en los medios de cultivo y la preparación de dos o más preparaciones para tinción.	≤ 24 h TA.	Si es lavado intraocular, centrifugar antes de sembrar.
Líquidos estériles (LCR, pleural, peritoneal...)	<i>Candida</i> spp. <i>H. capsulatum</i> , <i>C. neoformans</i>	Tras la preparación adecuada de la zona, obtener el líquido con jeringa en condiciones de esterilidad. Transferir a tubo estéril. Recoger como para bacterias, al menos 2 ml en contenedor estéril.	Procesamiento inmediato. ≤ 24h, TA. Nunca refrigerar.	El aspirado o biopsia cerebral pueden ser necesarios
Médula ósea	Histoplasmosis, candidosis, criptococosis. (<i>C. neoformans</i> , <i>H. capsulatum</i>)	Preparar para incisión quirúrgica. Lisis centrifugación. Medio apropiado en la cabecera del enfermo	Como la sangre.	Si se usa un sistema automatizado, revisar las normas del fabricante.
Oído externo	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Aspergillus flavus</i>	Girar con firmeza el hisopo en el canal externo.	<2 h, TA <24 h, 4°C	
Oral	<i>Candida</i> spp., <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	Tomar con hisopo de la lesión activa; enjuagar con solución salina para <i>Candida</i> . Medio de	≤ 24 h, TA	Medio selectivo para levaduras.

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

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

6.1. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Para optimizar tanto la observación microscópica como el cultivo, es necesario preparar la muestra, aunque algunas se pueden inocular directamente sin que sea necesaria su manipulación previa. Todas las muestras deben observarse macroscópicamente y seleccionar la parte más representativa. Buscándose en los tejidos las zonas con pus, caseificación o necrosis.

6.1.1. Tejidos. Deben ser troceados e inoculados en pequeños trozos en el medio de cultivo con el fin de facilitar el crecimiento o la penetración de algunos colorantes como el blanco de calcoflúor. La utilización de homogenizadores no está aceptada ya que puede destruir a los hongos no septados. El troceado puede realizarse con tijeras o bisturí, el proceso puede realizarse en una placa de Petri añadiendo unas gotas de agua destilada estéril.

6.1.2. Espujo y secreciones respiratorias. El espujo y las secreciones respiratorias claramente purulentas, hemáticas o caseificadas pueden sembrarse directamente en los medios de cultivo. Las fluidas deben concentrarse por centrifugación (1500xg durante 10 minutos) desechando el sobrenadante y sembrando el sedimento resuspendido en solución salina. Cuando la muestra sea muy viscosa habrá que fluidificarla, sin diluirla excesivamente, usando un agente mucolítico, como N-acetil cisteína al 0,5% o ditioeritrol, (mezclada con igual volumen de la muestra y dejándola actuar a temperatura ambiente hasta que se consiga la fluidificación), posteriormente puede concentrarse la muestra por centrifugación.

6.1.3. Líquidos orgánicos (LCR, PLEURAL, PERITONEAL, ARTICULAR, etc.) Deben concentrarse por centrifugación (1500-2500xg durante 10 min.) o filtración (0,2 µm de poro), siempre que haya suficiente cantidad. Sembrar el sedimento. Estas muestras pueden requerir un procesamiento especial, o sembrarse directamente en el medio de cultivo.

6.1.4. Fragmentos ungueales. Se trocean progresivamente con un bisturí y se pulverizan.

6.1.5. Orina. No está claro qué recuento de levaduras en orina es significativo. Para algunos, un recuento $\geq 10^3$ UFC/ml sería indicativo de patología; pero algunos autores sostienen que cualquier recuento sería válido, sobre todo si se acompaña de signos de enfermedad. Por ello, se puede hacer la siembra directamente para recuento (igual que para bacterias, con un asa calibrada) o bien centrifugar y sembrar el sedimento.

6.1.6. Biopsias. Cortar con escarpelo en pequeñas fracciones de 1 mm, sobre todo si no hay sospecha de ningún hongo en concreto o si la sospecha es de un mucoral. En el caso de sospecha de *Histoplasma*, hay que macerar y homogeneizar el tejido, como en el caso de investigación de bacterias. Hacer improntas para tinciones. Contar también con el estudio anatomopatológico.

6.2. EXAMEN DIRECTO

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

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

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

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

El examen microscópico directo proporciona un diagnóstico definitivo si se observan elementos fúngicos patognomónicos: cápsula de *Cryptococcus neoformans*, células fumagoides en cromoblastomicosis, levaduras pequeñas intracelulares de *Histoplasma capsulatum*, quistes/ascas típicos de *P. jiroveci*, levaduras con brotes de base ancha de *Blastomyces dermatitidis*, levaduras con gemación multipolar en rueda de timón de *Paracoccidioides brasiliensis* o las esférulas de *Coccidioides immitis*. En algunos casos, el diagnóstico microscópico puede ser la única evidencia de infección fúngica y, en otros, su negatividad puede sustentar la interpretación de aislamientos como contaminantes. La escasez de la muestra es, en la práctica, la única razón para no

efectuar la observación microscópica en beneficio del cultivo. El examen microscópico puede también orientar la técnica de cultivo (medios, temperatura, tiempo de incubación, precauciones especiales de bioseguridad) e, incluso, su inutilidad por tratarse de patógenos enigmáticos no cultivables como *Rhinosporidium seeberi*, *Lacazia loboi* o *Pneumocystis jiroveci*.

Los métodos usados para la visualización fúngica difieren en algunos aspectos de los de las bacterias; el mayor tamaño de los hongos hace, generalmente, innecesarios la tinción de frotis secos; en su lugar son más utilizadas las preparaciones directas en fresco con o sin líquidos de montaje y clarificación. La observación microscópica se realiza con bajo aumento, seguida de alto aumento en seco y, si es necesario, con aceite de inmersión. Las dos formas observadas habitualmente son levaduras y/o elementos miceliares. La mayoría de los hongos se pueden detectar sin tinción, en la mayor parte de las muestras clínicas como esputos, orinas, exudados y LCR, usando siempre que sea posible microscopia de contraste de fases. No obstante, se han desarrollado una serie de tinciones (tinta china, Giemsa, argénticas, agentes quimiofluorescentes, etc.) para mejorar la sensibilidad de la técnica. Las técnicas microscópicas directas son de gran utilidad en el estudio de muestras clínicas de pacientes con micosis que afectan a la piel y mucosas, pero también son muy útiles en el diagnóstico de micosis subcutáneas y profundas.

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

Los procedimientos de preparación de los colorantes y los diferentes métodos de tinción se desarrollan en los documentos técnicos correspondientes de este procedimiento (PNT-MIC-01, PNT-MIC-02, PNT-MIC-03, y PNT-MIC-04).

Las limitaciones y los problemas del examen microscópico también deben tenerse en cuenta:

- a.- Un examen directo negativo nunca descarta una infección fúngica. La sensibilidad de la técnica puede estar entre 10^3 - 10^5 elementos fúngicos por ml y puede depender del lugar anatómico, tipo de paciente, tinción y experiencia del observador.
- b.- El examen microscópico puede originar falsos positivos al confundirse ciertas estructuras con elementos fúngicos (linfocitos lisados que se

confunden con *C. neoformans* en la tinción con tinta china, fibras de colágeno o del hisopo que se confunden con elementos fúngicos, gotas de grasa con levaduras en gemación, etc.). Estos posibles errores pueden minimizarse con un segundo examen o con la experiencia del observador.

c.- El examen microscópico debe realizarse, al menos, en todas las muestras con alta sospecha de micosis; aunque lo ideal sería realizarlo siempre que fuese posible.

d.- Posee una relativamente baja sensibilidad diagnóstica.

e.- En la mayoría de los casos, no es posible identificar la especie fúngica.

f.- No permite la realización de estudios de sensibilidad a los antifúngicos.

7. SELECCIÓN DE MEDIOS Y CONDICIONES DE INCUBACIÓN

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

7.1. CLASIFICACIÓN

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

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

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

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

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

Tabla 2. Exámenes microscópicos más frecuentes

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

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

7.2. PREPARACIÓN

La buena calidad de los medios es indispensable para conseguir el aislamiento y la identificación de los hongos; por lo tanto, cuando se utilicen medios comerciales es necesario tener en cuenta la garantía que aporta el proveedor y la calidad de la distribución. Cuando se prepara un medio deshidratado deben seguirse rigurosamente las instrucciones del fabricante, evitando errores en la forma de disolverlos o suspenderlos, en la temperatura y duración de la esterilización para que no se afecte la calidad del producto final. Algunos antibióticos deben añadirse al medio una vez esterilizado y a la temperatura adecuada, para que no se inactiven por las altas temperaturas de la esterilización.

7.3. CONTROL DE CALIDAD

Para asegurar la correcta utilización de los medios, deben controlarse periódicamente sus características más importantes: apariencia, esterilidad, pH y funcionamiento. El funcionamiento se puede evaluar utilizando las cepas de control adecuadas para cada medio (ver PNT-MIC-05).

7.4. SOPORTE

El soporte habitual para los medios de cultivo en Micología suelen ser tubos de cristal o placas de Petri (90 mm). Los tubos tienen la ventaja de soportar incubaciones prolongadas y aumentan la seguridad en el caso de sospecha de micosis endémicas. Si se utilizan tubos, deben incubarse en posición horizontal las primeras 24 horas para que el inóculo no se concentre en el fondo. Los tubos deben de ser de boca más ancha que los habituales en bacteriología, porque en ellos, las colonias no son fáciles de aislar. Si los tubos utilizados son de tapón de rosca, el cierre debe mantenerse parcialmente abierto para garantizar las mejores condiciones atmosféricas. Cuando se eligen placas, es conveniente que contengan 40 ml de medio para evitar que se sequen, y deben cerrarse con cinta adhesiva para que no se abran involuntariamente,

protegiendo al personal de los hongos patógenos y evitando la contaminación con hongos externos. El precintado debe ser permeable al aire, ya que cuando el aire circula libremente se favorece la producción de pigmento y la superficie del agar se seca, permitiendo el desarrollo de micelio aéreo y esporas.

7.5. ALMACENAMIENTO

Los medios se deben guardar refrigerados a 2-8°C. Para mejorar su conservación y prevenir la desecación, es aconsejable invertir las placas e introducirlas en bolsas de plástico. Las placas de Petri suelen conservarse en buen estado unos tres meses, mientras que los medios semisólidos o líquidos en tubo de tapón de rosca se conservan bien hasta 6 meses. Sin embargo, ciertos medios, al contener sustancias inestables (antibióticos, vitaminas, sangre, etc.), no se conservan en buen estado tanto tiempo. También hay que tener presente que algunos componentes de ciertos medios pueden verse afectados por la luz, por lo que estos medios deben almacenarse en contenedores opacos. Como norma general, todos los medios deben utilizarse antes de la fecha de caducidad indicada por el fabricante y, antes de su utilización, deben atemperarse, durante unos minutos, a temperatura ambiente.

7.6. ELECCIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

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

Los medios de cultivo más empleados en micología pueden agruparse en dos categorías en

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

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

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

7.6.3. Agar de Staib. Agar semillas de níger (*Guizottia abyssinica*): utilizado para aislar *Cryptococcus* spp. y *C. neoformans*. Este último es el único que posee fenol oxidasa, que le permite la formación de un pigmento similar a la melanina a partir del ácido cafeico, un catecol, que posee la semilla. El cloranfenicol lo convierte en medio selectivo. Existen medios semisintéticos que incorporan el ácido cafeico y evitan la utilización de esta semilla.

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

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

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

7.6.7. Agar inhibidor de mohos: es un medio enriquecido que contiene cloranfenicol o gentamicina, pero no actidiona. Se utiliza en el aislamiento de hongos sensibles a la cicloheximida (*Cryptococcus*, zigomicetos, etc.) a partir de

muestras contaminadas. Permite el desarrollo de la mayoría de los mohos y de las levaduras.

7.6.8. Agar Leeming y Notman (ALN): utilizado en el cultivo de *Malassezia* spp. Puede modificarse añadiendo cloranfenicol o bien cloranfenicol y cicloheximida.

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

7.6.10. Agar Trichophyton (1 a 7): son siete medios que se utilizan en la identificación de especies de *Trichophyton* basándose en sus requerimientos nutricionales.

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

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

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

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

7.7. INCUBACIÓN

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

37°C. La temperatura de 37°C debe reservarse para hongos dimórficos o algún hongo que se desarrolle mejor a esta temperatura. No obstante, también es necesaria una estufa a 37°C para verificar la tolerancia a esta temperatura. Sin embargo, utilizar 37°C para el aislamiento del estadio levaduriforme de *Histoplasma* o *Blastomyces* no aporta ventajas y, además, son morfológicamente indistinguibles de otras levaduras. Los cultivos de hongos deben incubarse durante 3-4 semanas antes de ser desechados, y no deben desecharse cuando se aísla un hongo, sino que debe completarse el periodo de incubación. Sin embargo, hay muestras que se pueden eliminar antes (por ejemplo, exudado vaginal), a los 7 días, cuando se realizan cultivos habituales.

8. IDENTIFICACIÓN

8.1. HONGOS FILAMENTOSOS

Cuando el crecimiento detectado corresponda a un hongo filamentoso, la identificación se hará: 1) examen macroscópico de la colonia: forma, color, textura, velocidad de crecimiento y reverso. 2) Si el hongo tiene abundantes formas de reproducción se emplea la técnica del *scotch* o papel de celofán, que consiste en tocar la superficie de la colonia con la cinta adhesiva y colocarla sobre un porta, en el que se ha depositado una gota de azul de lactofenol y observar al microscopio. Mejora ostensiblemente la visión microscópica si se añade, además, una gota de azul de lactofenol sobre el celofán y se deposita un cubre sobre ella.

Cuando no se puede conseguir una buena observación de las formas de reproducción por las técnicas anteriores, es necesario hacer un microcultivo. Esta técnica consiste en depositar sobre un porta un trozo de agar de Sabouraud, o del medio recomendado según el género de hongo filamentoso que se presume, de 1 cm² de superficie aproximadamente, en cuyos extremos se inocula el hongo problema (en profundidad). Posteriormente se le coloca un cubre encima y se incuba en cámara húmeda a 25°C hasta observar crecimiento; entonces se toma el cubre, que es donde se han depositado las formas de reproducción, y se coloca sobre un porta que lleva una gota de azul de lactofenol y se observa al microscopio.

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

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

enzimas de restricción, que permite la elaboración de árboles filogenéticos.

8.2. LEVADURAS

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

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

8.2.1. Identificación convencional. Si se visualiza crecimiento en cualquier medio que sugiera posibilidad de levaduras, se realiza una extensión en fresco. Si en la misma se observan levaduras, se procede a la identificación mediante subcultivo a un medio cromogénico, de los que hay varios comercializados. En el caso que no se trate de ninguna de las especies que este medio identifica, se procede a hacer la identificación mediante auxonograma de carbono preparado en el propio laboratorio, o mediante alguno de los métodos comerciales basados en él. La identificación bioquímica debe completarse con una identificación morfológica mediante un subcultivo al medio agar harina de maíz con o sin Tween 80.

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

8.2.1.1. Otros medios diagnósticos complementarios

- **Prueba del tubo germinal o filamentación precoz:** el tubo germinal es una extensión filamentosa de la levadura, sin estrechamiento en su origen, cuyo ancho suele ser la mitad de la célula progenitora y su longitud tres o cuatro veces mayor que la célula madre. Sólo *C. albicans*,

y en menor medida *C. dubliniensis*, son capaces de producir verdaderos tubos germinales; sin embargo, otras especies como *C. tropicalis* pueden producir pseudohifas precoces de aspecto similar a los tubos germinales pero con una zona de constricción característica adyacente a la célula madre, por lo que esta prueba es útil para diferenciar *C. albicans* y *C. dubliniensis* del resto de las especies de *Candida*.

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

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

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

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

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

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

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

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

Interpretación: el desarrollo de una pigmentación marrón oscura alrededor del crecimiento es característico de *C. neoformans*.

8.2.2. Medios comerciales basados en la asimilación de nutrientes, en pruebas enzimáticas o inmunológicas.

- **AUXACOLOR:** en la galería Auxacolor (Bio-Rad) la asimilación se visualiza por el cambio de un indicador de pH. Además, incorpora una prueba de resistencia a la actidiona y otra para la detección de la actividad fenol-oxidasa de *C. neoformans*.

- **Sistema UNI-YEAST-TEK:** el sistema Uni-Yeast Tek (Remel) está constituido por una placa plástica con múltiples compartimentos que contienen un medio con agar para la asimilación diferencial de siete hidratos de carbono. También incorpora una cubeta central con agar harina de maíz-Tween 80 para determinar el crecimiento micelial y la producción de clamidosporas. Además, está provisto de agar urea, agar para la asimilación y reducción de nitratos y de un caldo con extracto de carne al 2,6% (con 0,05% de glucosa) para realizar la prueba del tubo germinal.

- **API 20 C AUX:** la galería API 20 C AUX (bioMérieux) se compone de 20 cúpulas con sustratos deshidratados que permiten realizar 19 pruebas de asimilación. Las cúpulas se inoculan con un medio mínimo semisólido y las levaduras sólo se reproducen si son capaces de utilizar el sustrato correspondiente. Permite identificar un total de 34 especies diferentes. La lectura de estas reacciones se hace por comparación con un control de crecimiento y la identificación se obtiene, a partir de un código numérico, mediante un catálogo analítico o un programa informático.

- **Galería ID 32 C:** la galería ID 32 C (bioMérieux) está compuesta por diferentes pruebas de asimilación y por una base de datos especialmente adaptada. Permite identificar 63 especies diferentes de organismos levaduriformes o relacionados y puede ser utilizada manualmente o bien de forma automatizada mediante los sistemas ATB Expresión o mini API. La galería se compone de 32 cúpulas: 29 contienen cada una un sustrato carbonado deshidratado, 1 es el control negativo, 1 detecta la sensibilidad a la cicloheximida y la última es una prueba colorimétrica para la esclulina.

- **Sistema Vitek 2:** el sistema Vitek 2 (bioMérieux) es un sistema totalmente automático para la detección del metabolismo fúngico que puede identificar levaduras y organismos afines en tan sólo 15 horas. Está basado en tecnología de fluorescencia y se compone de las tarjetas de análisis con 63 pocillos, una consola satélite para la recogida de información, un módulo incubador, un módulo principal donde se procesa la información gracias a un software de análisis y un sistema experto avanzado. Permite la identificación de 51 especies diferentes, incluida *C. dubliniensis*, y, al igual que los sistemas semiautomáticos, requiere pruebas adicionales (fundamentalmente morfológicas) en caso de baja discriminación.

- **Sistema Biolog YT MicroPlate:** el sistema Biolog YT MicroPlate (Biolog) permite la identificación de organismos levaduriformes mediante 94 pruebas bioquímicas, llegando a

identificar hasta un total de 267 especies diferentes pertenecientes a 53 géneros.

- **Rapid Yeast Identification Panel MicroScan:** el Rapid Yeast Identification Panel MicroScan (Dade Behring) es un método automatizado para la identificación rápida de 40 especies de levaduras y otros microorganismos afines. Se basa en la utilización de pruebas convencionales y cromogénicas en una placa de microdilución de 96 pocillos que utiliza 27 sustratos deshidratados.

- **RapID Yeast Plus System:** el RapID Yeast Plus System (Innovative Diagnostic Systems) es un sistema compuesto por un panel de 18 pocillos; cada uno contiene un sustrato convencional o cromogénico que detecta la asimilación de carbohidratos, ácidos orgánicos o aminoácidos, así como la hidrólisis de la urea y de ácidos grasos. Permite identificar hasta 43 especies diferentes de levaduras.

- **Fungiscreen 4H:** Fungiscreen 4H (BIO-RAD) es un sistema basado en el estudio del perfil enzimático de algunas levaduras, permitiendo identificar en 4 horas *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* y *C. neoformans*. La utilización de sustratos deshidratados por las enzimas fúngicas se manifiesta por un cambio de color, ya sea espontáneamente o después de añadir un reactivo de revelado.

- **BICHRO-LATEX ALBICANS** (Fumouze): es un método para la identificación rápida de aislados de *C. albicans* por aglutinación de partículas de látex utilizando un anticuerpo monoclonal específico de *C. albicans*. La prueba se realiza con dos reactivos distintos: a) bolas de látex recubiertas con anticuerpos monoclonales que reaccionan específicamente con el antígeno de *C. albicans* localizado en su pared celular, y b) un agente disociante que permite la exposición al antígeno.

- **KRUSEI-COLOR** (Fumouze): es un método para la identificación de aislamientos de *C. krusei* por aglutinación de partículas de látex, mediante un anticuerpo monoclonal específico que reacciona específicamente con el antígeno localizado en su pared. El kit contiene un reactivo Krusei-color y 5 portaobjetos.

- **BICHRO-DUBLI** (Fumouze): es un método para la identificación rápida de *C. dubliniensis* basado en la coaglutinación de blastosporas de esta especie con partículas de látex recubiertas con anticuerpos monoclonales, el cual permite la detección específica de un antígeno de *C. dubliniensis* localizado en la superficie de la célula. La emulsión de colonias de *C. dubliniensis* en el reactivo Bichro-Dubli revela una coaglutinación, visible a simple vista, entre las blastosporas que portan el antígeno y las partículas de látex sensibilizadas con anticuerpos monoclonales, aglutinados azules que progresivamente se extienden hacia la periferia, formando un borde azul alrededor de un área central roja/rosa.

9. INFORME DE LOS RESULTADOS

El diagnóstico micológico no acaba con el aislamiento y la identificación del agente causal. Finaliza cuando la información sobre el mismo llega al conocimiento del médico responsable del paciente. Esta última etapa del procedimiento diagnóstico no es menos importante que las anteriores, por lo que deben cuidarse al máximo todos los detalles de la misma.

- **Observación microscópica:** debe informarse en el día ya que aporta una importante ayuda al clínico; sus pacientes pueden salir de la consulta de dermatología con un diagnóstico presuntivo (dermatofitosis), que habrá que confirmar con el cultivo, o definitivo (pitiriasis versicolor). Otras observaciones positivas permiten una orientación terapéutica (mucormicosis, aspergilosis, etc.).

- **Cultivo:** el cultivo negativo se informa, generalmente, a las cuatro semanas de incubación, con las excepciones citadas en el tiempo de lectura. La prolongación de la incubación después de tres semanas aporta poca información adicional y, dependiendo del sistema de lectura, puede suponer una sobrecarga de trabajo que hay que valorar adecuadamente en cada laboratorio. Los cultivos positivos se informan de la misma manera que la observación microscópica en el momento en el que se disponga del crecimiento. Cuando el significado del aislamiento del hongo sea dudoso o se requieran aislamientos sucesivos, debe hacerse constar así en el informe.

En todo informe escrito debe figurar si es un informe provisional o un informe definitivo.

En los aislamientos poco habituales, un pequeño resumen de las características del hongo puede ser fundamental para el manejo clínico.

10. ESTUDIOS DE SENSIBILIDAD

10.1. RECOGIDA, TRANSPORTE Y CONSERVACION DE LA MUESTRA

Todo el proceso de recogida de muestras, transporte y conservación de las cepas/muestras sigue los procedimientos habituales del laboratorio de microbiología. Obviamente, la forma de procesamiento de las cepas dependerá de si el estudio de sensibilidad se realiza para aportar información terapéutica en un caso individual o si se hace diferido en el tiempo con el objetivo de obtener información epidemiológica en nuestro medio.

10.2. MANEJO DE LA MUESTRA A SU RECEPCIÓN EN EL LABORATORIO

Las especies fúngicas en las que se realizan estudios de sensibilidad están clasificadas en el grupo-2 desde el punto de vista de la bioseguridad, por lo que no deben manejarse en condiciones especiales. Si las pruebas de sensibilidad se hacen para conocer la mejor alternativa terapéutica en un enfermo concreto, deberían realizarse de forma rápida, intentando ofrecer una información útil para el manejo del enfermo. Esta capacidad de respuesta rápida sólo suelen tenerla las instituciones sanitarias

que hacen las pruebas de forma habitual. En los laboratorios en los que se hacen estudios epidemiológicos diferidos, las cepas deben conservarse siguiendo procedimientos habituales. Pueden mantenerse alrededor de ocho semanas a 4°C en un subcultivo en medios para hongos como agar Sabouraud o agar patata glucosado. Si se van a conservar durante más tiempo deben emplearse la liofilización, medios de congelación comerciales, glicerol, leche, agua destilada u otros procedimientos, según especies y posibilidades del laboratorio. Si se van a remitir las cepas/muestras a un laboratorio de referencia, debe utilizarse un sistema de envío homologado, que cumpla la normativa europea sobre transporte de muestras y cepas clínicas. El envío debe acompañarse de un impreso o volante con información para identificar la muestra, indicando el nivel de bioseguridad que debe aplicarse en su procesamiento.

10.3. PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA

El procesamiento de las cepas a las que se les va a hacer el estudio de sensibilidad no requiere consideraciones especiales. En las muestras cutáneas, de mucosas o de exudados es conveniente asegurarse de que no existe un cultivo mixto, con varias especies fúngicas. En el caso de las levaduras, los agares cromogénicos pueden ayudar a distinguir las infecciones mixtas.

Para preparar el inóculo debe partirse siempre de un subcultivo fresco de la cepa en cuestión. No deben utilizarse subcultivos más antiguos ni preparar el inóculo a partir de reservas de levaduras o conidias refrigeradas o congeladas. Los subcultivos para preparar el inóculo se realizan en medios habituales para hongos.

10.4. SELECCIÓN DE MEDIOS Y CONDICIONES DE INCUBACIÓN. CULTIVOS

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

Los métodos de referencia describen con precisión todo el proceso de preparación de soluciones madre de los antimicrobianos, de las placas o tubos con concentraciones decrecientes, del inóculo, de la forma de inoculación y de lectura. Se aconseja realizar recuentos en placa a partir de

las suspensiones inoculadas para comprobar que no se han cometido errores en la preparación del inóculo. Deben incluirse cepas control (ver PNT-MIC-05) en todas las pruebas para poder validar los resultados. Si se decide utilizar un método comercial deben seguirse fielmente las instrucciones del fabricante. Las condiciones de incubación no son especiales. Generalmente se cultivan en atmósfera normal, a 30 ó 35°C, durante 24-72 horas, dependiendo del método y de las especies fúngicas.

10.5. CRITERIOS PARA LA INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Una de las finalidades de los estudios de sensibilidad *in vitro* es la detección de las resistencias de los microorganismos a los antimicrobianos y, de esta forma, poder predecir la resistencia clínica. Sin embargo la correlación entre los resultados de las pruebas de sensibilidad *in vitro* a los antifúngicos y la respuesta al tratamiento de los enfermos con micosis no es muy buena, por lo que no existen unos criterios claros para su interpretación. El CLSI ha establecido puntos de corte para interpretar los resultados de estas pruebas con fluconazol, itraconazol, fluorocitosina y voriconazol (tabla 3). Estos puntos de corte sólo son aplicables en infecciones por levaduras y tienen una utilidad clínica limitada. Se basan en datos farmacocinéticos, estudios realizados en pacientes con candidosis orofaríngeas y datos de pacientes con infecciones profundas. En la mayoría de los estudios sobre candidosis orofaríngea, se observa falta de respuesta clínica a los azoles cuando se emplean estos antifúngicos para tratar infecciones por cepas que presentan CMI elevadas, >16 mg/l para el fluconazol y >0,25 mg/l para el itraconazol. Sin embargo no se ha encontrado una correlación tan clara en las infecciones profundas. Las causas de esta incoherencia residen en las numerosas variables que influyen en la respuesta al tratamiento y en la complejidad de los enfermos que presentan micosis invasoras. Los estudios de correlación en pacientes con infecciones profundas se han realizado sin estratificación por enfermedad de base e incluyendo pocas cepas con resistencia *in vitro*. Otros comités como el EUCAST van a proponer puntos de corte en breve, que serán muy similares a los del CLSI y también de utilidad limitada.

Otros expertos prefieren interpretar los resultados de estas pruebas con variables farmacodinámicas. Los cocientes entre la concentración plasmática o el área bajo la curva (AUC) y la CMI se están empezando a emplear como factores predictivos de la respuesta a los antifúngicos.

Tabla 3. Puntos de corte para interpretar las pruebas de sensibilidad en levaduras, según el CLSI estadounidense. Datos en mg/l.

Antifúngico	Sensible	Sensible dependiente de la dosis	Intermedio	Resistente
Fluconazol	≤ 8	16-32	-	≥ 64
Itraconazol	≤ 0,125	0,25-0,5	-	≥ 1
Voriconazol	≤ 1	2	-	≥ 4
Flucitosina	≤ 4	-	8-16	≥ 32

Así para fluconazol, un cociente AUC/CMI >25 se asocia con índices de respuesta superiores al 90%, mientras que un cociente <6,5 reduce la probabilidad de respuesta al 57%. Basándose en estas cifras deberían emplearse dosis de 800 mg al día, para tratar una infección por una cepa que presenta una CMI de fluconazol de 32 mg/l. Los estudios de correlación con anfotericina B se encuentran en fases menos avanzadas de desarrollo. Sólo se ha encontrado una cierta correlación entre el fracaso terapéutico y CMIs >2 mg/l en modelos murinos de candidosis diseminada. Respecto a los hongos filamentosos debe señalarse que no existen puntos de corte para interpretar las pruebas de sensibilidad. No obstante, en los últimos años se han comunicado fallos terapéuticos con itraconazol en infecciones producidas por cepas de *Aspergillus* con CMI de ≥8 mg/l. Para anfotericina B, algunos autores han comprobado que cepas de *Aspergillus* spp. y de *Rhizopus* spp. se comportan como resistentes en modelos animales, cuando tienen una CMI de anfotericina B ≥ 2 mg/l.

10.6. PROCEDIMIENTOS ADICIONALES A REALIZAR EN SITUACIONES ESPECIALES

Una de las principales limitaciones de las actuales pruebas de sensibilidad a los antifúngicos es que no son aplicables a todas las especies. Los hongos de crecimiento lento como *Cryptococcus*, *Geotrichum*, *Trichosporon* y muchas especies filamentosas no crecen bien en los medios de cultivo recomendados para hacer estudios de sensibilidad, lo que influye sobre la fiabilidad de la CMI, disminuyendo su utilidad terapéutica. Por ello se han propuesto modificaciones para hacer pruebas con estas especies, como cambios en el medio de cultivo, el inóculo, el pH, la molaridad o incubaciones en agitación continua. Ninguna de estas modificaciones ha sido validada, por lo que si se decide utilizarlas, los resultados deberían ser interpretados con prudencia.

10.7. INFORMACIÓN DE LOS RESULTADOS

Los resultados de los estudios de sensibilidad a los antifúngicos deben informarse como los de otros antibiogramas, dando el valor de la CMI. En caso de utilizar el método del CLSI, podría informarse como *sensible* o *resistente*, siguiendo los puntos de corte recogidos en la tabla 3. Sin embargo, dadas las limitaciones antes expuestas sobre la correlación de estas pruebas con la clínica, se aconseja que los laboratorios que realicen estas pruebas de sensibilidad mantengan una relación estrecha con los médicos que las solicitan, individualizando cada caso y colaborando en la toma de decisiones terapéuticas. En caso de realizar estudios epidemiológicos periódicos, se debería informar a toda la institución sanitaria sobre la distribución de especies y el perfil de sensibilidad, lo que ayudaría a elegir los tratamientos empíricos más adecuados.

10.8. METODOS RÁPIDOS ACEPTADOS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD A ANTIFÚNGICOS

La determinación de la CMI por técnicas de dilución en caldo no es un método aplicable para laboratorios clínicos que deben hacer estudios de sensibilidad a diario, que sufren la presión asistencial y que deben ofrecer información rápida para que tenga utilidad terapéutica. Por ello se han desarrollado técnicas de difusión en agar, como la descrita en el documento M44-A del CLSI, y métodos comerciales con la intención de ofrecer una alternativa rápida, práctica y barata para realizar estudios de sensibilidad a los antifúngicos.

El documento M44-A recoge un procedimiento de difusión sencillo y práctico, validado para realizar estudios con fluconazol y voriconazol, que utiliza discos cargados con el antimicrobiano. El medio de cultivo recomendado es Mueller-Hinton con un 2% de glucosa y con azul de metileno, ya que parece mejorar la lectura de las placas, al aumentar la nitidez de los halos de inhibición. En lo que se refiere a los métodos comerciales, debe destacarse que para que un procedimiento de este tipo pueda ser

utilizado en los laboratorios asistenciales tiene que existir una buena correlación entre la técnica de referencia y la comercial, ya que en teoría, los puntos de corte sobre sensibilidad o resistencia se establecen con las técnicas de referencia. Si una técnica comercial no se correlaciona con la de referencia, no debería emplearse en los laboratorios asistenciales, ya que las recomendaciones terapéuticas pueden tener escasa credibilidad. Existen varios métodos comerciales que han demostrado una buena correlación con los estándares de referencia. Esta correlación es aun más apreciable con los azoles, fármacos para los que se han descrito la mayor parte de las resistencias. Por tanto, los laboratorios asistenciales pueden emplear estos métodos para detectar con fiabilidad y rapidez la resistencia a los azoles, sobre todo la resistencia *in vitro* a fluconazol en levaduras. Entre los métodos comerciales que pueden emplearse en un laboratorio clínico destacan las técnicas de difusión en agar con discos o tabletas de antifúngicos como el NeoSensitabs (A/S Rosco) o el BIOMIC V3 (Giles Scientific Inc.), un método de lectura automatizado para las pruebas realizadas siguiendo la técnica M44-A del CLSI. Otro método de difusión es el E-test (AB Biodisk), que consiste en una tira de plástico con un gradiente de concentraciones del antifúngico, lo que permite que el resultado incluya la CMI. Otras técnicas incorporan una adaptación de la microdilución en caldo con o sin colorantes como el Sensititre YeastOne (TREK Diagnostic Systems Ltd.), el Fungitest (Bio-Rad) y el ATB Fungus 2 (bioMérieux). Todas ellas han mostrado una fiabilidad elevada para detectar la resistencia a fluconazol. Otras galerías comerciales menos evaluadas, pero que también podrían utilizarse son el ASTY (Kyokuto Pharmaceutical Industrial Co), el Mycostandard (Institut Pasteur, Paris, France), el Mycototal (Behring Diagnostic), el Candifast (International Microbiol) y el Integral System Yeasts (Liofilchem Diagnostics). Por último, un enfoque novedoso es automatizar la lectura de las placas de microdilución mediante una cámara de video y un programa informático. Esta técnica es la que incorpora el sistema WIDER I (Soria Melguizo), que también ha mostrado una gran fiabilidad en la detección de resistencias en levaduras.

10.9. PROCEDIMIENTOS NO ACEPTABLES

Deben considerarse como inaceptables todos los resultados obtenidos mediante modificaciones no validadas de las técnicas de referencia. Los cambios en el inóculo, los medios de cultivo o el método de lectura pueden tener efectos notables sobre la CMI, alterando la fiabilidad del resultado. Debe evitarse toda modificación salvo que se realice un proceso comparativo de estandarización. Tampoco deben realizarse pruebas de sensibilidad sin incluir cepas control, pues es el único modo de validar los resultados. Estos no deben aceptarse si las CMIs de las cepas control no coinciden con los recogidos por los estándares. Debe evitarse realizar pruebas de sensibilidad con preparados comerciales de los

antifúngicos, ya que los excipientes y otras sustancias presentes en la formulación pueden modificar los resultados obtenidos *in vitro*. Las pruebas deben realizarse con sustancia valorada. Es aconsejable que todo el procedimiento de las pruebas esté sometido a un control de calidad riguroso de los antifúngicos, lotes de medios y otros reactivos, así como de las cepas control. No deben utilizarse reactivos sin validar o sin conocer su fecha de caducidad. Por último, si se va a utilizar un método comercial, deben seguirse estrictamente las recomendaciones del fabricante. Variaciones en el protocolo pueden alterar significativamente los resultados de la prueba, reduciendo su aplicabilidad.

11. MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO RÁPIDO. TÉCNICAS NO CONVENCIONALES

11.1. TRANSPORTE, MANEJO Y CONSERVACIÓN DE LA MUESTRA

Las técnicas de diagnóstico rápido que hemos denominado no convencionales suelen utilizar el suero y el LCR como muestras de elección. Todas las muestras deben enviarse rápidamente al laboratorio. La conservación de las muestras también es importante que se realice adecuadamente, mediante refrigeración o congelación, dependiendo del tipo de determinación y la periodicidad con que se realice. Por último es importante realizar una seroteca con los sueros procesados, que será el reflejo de la situación clínica del paciente en ese momento para poder confirmar posibles resultados atípicos o dudosos. El suero y el LCR pueden almacenarse a 2-8°C si se van a procesar en las primeras 24 h. Si la determinación solicitada se va a demorar por más tiempo se recomienda la congelación, a -80°C, si es posible. El procesamiento de la muestra va a depender de la determinación solicitada y de la técnica que se vaya a realizar, por lo que se recomienda seguir fielmente las instrucciones del fabricante, si se trata de un "kit". Para más información consultar el documento técnico correspondiente (PNT-MIC-10).

11.2. CRITERIOS PARA LA INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Es importante recordar que, aunque la sensibilidad y especificidad absolutas son parámetros que debemos considerar en cada técnica, los valores predictivos positivo y negativo, que variarán en función de la población estudiada, son los más importantes en la práctica clínica. También destacar que el laboratorio de microbiología ha de emitir un informe que interprete el conjunto de resultados obtenidos en el estudio de cada muestra.

11.3. DESCRIPCIÓN DE LAS DIFERENTES INDICACIONES

11.3.1.- Diagnóstico de la criptococosis

La detección de antígeno capsular en líquidos orgánicos y especialmente en líquido cefalorraquídeo es de especial interés ante la sospecha de meningitis criptocócica. Ello se debe en gran parte a la rapidez, sencillez técnica y especificidad de la prueba que

permite el diagnóstico, en 10-15 minutos, de aproximadamente el 99% de las meningitis criptocócicas y el 67% de las criptococosis diseminadas, mientras que el cultivo e identificación de *C. neoformans* puede requerir varios días. Habitualmente se utilizan dos tipos de técnicas, una cualitativa y otra cuantitativa. La técnica cualitativa se emplea para diagnosticar nuevos casos de criptococosis o para confirmar reinfección especialmente en el paciente infectado por el VIH. La técnica consiste en la detección de antígeno capsular criptocócico, que es de naturaleza polisacáridica, mediante anticuerpos mono-específicos dirigidos frente a él y unidos a partículas de látex. La aglutinación de las partículas de látex tras la reacción antígeno-anticuerpo se detecta a simple vista. Esta técnica emplea como control de aglutinación (látex de control) partículas de látex con inmunoglobulinas inespecíficas de conejo con el fin de detectar reacciones positivas falsas y así aumentar la especificidad de la técnica. La técnica cuantitativa se emplea habitualmente para el seguimiento de la evolución de pacientes ya diagnosticados mediante el título de antígeno capsular presente en la muestra clínica, que generalmente es suero o LCR. Es útil para conocer la eficacia del tratamiento antifúngico aplicado.

11.3.2. Diagnóstico de la aspergilosis

11.3.2.1. Detección del antígeno. La detección de galactomanano, un antígeno específico del género *Aspergillus*, se considera la posibilidad más interesante para el diagnóstico de la aspergilosis invasora en pacientes neutropénicos. La detección de galactomanano mediante un ELISA comercializado, Platelia *Aspergillus* de Bio Rad, permite el diagnóstico de la aspergilosis invasora con una especificidad del 89,6 % y una sensibilidad del 87,5 %. Esta prueba es más sensible que el látex Pastorex *Aspergillus* y en algunos estudios se ha demostrado que es positiva antes de que aparezca la sintomatología clínica. Actualmente se han modificado los puntos de corte establecidos, unificando el criterio americano y el europeo, y facilitándose de esta manera los estudios comparativos sin modificarse la especificidad y sensibilidad de la técnica.

En la última década se ha avanzado mucho en la caracterización de los antígenos de *A. fumigatus* (el agente etiológico más importante). Entre los cientos de antígenos descritos se ha conseguido caracterizar 4 de los más importantes: la catalasa CAT1 (90 kDa), la dipeptidil dipeptidasa también llamada quimotripsina (79 kDa), la restrictocina (18 kDa) y el galactomanano (residuo polisacárido unido a distintas proteínas). Los dos primeros son fuertemente inmunogénicos y se utilizan ampliamente para la detección de anticuerpos. En la aspergilosis broncopulmonar alérgica (ABPA) se detectan anticuerpos anti *A. fumigatus* específicos de la clase IgG en casi el 100% de los casos.

11.3.2.2. Detección de anticuerpos. La detección de anticuerpos frente a organismos del género *Aspergillus* en el suero es, desde hace muchos años,

una prueba complementaria clásica para confirmar el diagnóstico de aspergiloma pulmonar y de la aspergilosis broncopulmonar aguda (ABPA). Las técnicas empleadas han sido muy diversas, siendo la más clásica la inmunodifusión (ID) en sus diferentes variantes y modificaciones. Sin embargo, estas técnicas clásicas disponibles comercialmente presentan una serie de problemas:

- i) Falta de estandarización en los procedimientos de extracción de los antígenos de *Aspergillus*, debido a los medios de cultivo empleados, las condiciones de incubación (tiempo de incubación, temperatura, etc.) y a los procedimientos de extracción y purificación.
- ii) Variabilidad antigénica generada por estas mismas causas, que origina una falta de concordancia en los resultados obtenidos por los diferentes laboratorios y reacciones cruzadas entre diferentes especies de *Aspergillus* o con otros hongos.

Se pueden utilizar varias técnicas para poner en evidencia la presencia de anticuerpos específicos frente a *Aspergillus* en pacientes con aspergiloma pulmonar. Las más utilizadas se basan en la inmunoprecipitación y detectan la formación de líneas de precipitación llamadas precipitinas que se forman por la reacción antígeno-anticuerpo. Hay numerosas variantes de esta técnica, pero las dos más ampliamente empleadas son la inmunodifusión (doble difusión, técnica de Ouchterlony) y la contraelectroforesis, que es una aceleración de la anterior utilizando campos eléctricos.

11.3.3. Diagnóstico de la candidosis

11.3.3.1. Detección de antígeno. A pesar del gran número de antígenos estudiados, la detección de antígeno en pacientes con candidosis invasora no ha permitido solucionar el problema diagnóstico que presenta esta micosis y no existe una prueba aceptada universalmente. La detección de manano por ELISA es más sensible y específica que por aglutinación de partículas de látex. La comercialización de pruebas para la detección de antígenos de *Candida* debería de haber facilitado el diagnóstico serológico de la candidosis invasora al disponerse de pruebas estandarizadas, sin embargo, los resultados obtenidos hasta el momento son poco esperanzadores. Dado que la antigenemia en los pacientes con candidosis invasora es transitoria, es posible que se necesite la combinación de técnicas que detecten diferentes antígenos o epitopos para aumentar la sensibilidad diagnóstica.

11.3.3.2. Detección de anticuerpos. En los últimos años, se ha cuestionado la utilidad de la detección de anticuerpos anti-*Candida* en pacientes con candidosis invasora debido a que puede presentar dos limitaciones importantes:

- i) La detección de títulos altos de anticuerpos en pacientes que están solamente colonizados por *Candida*.
- ii) La respuesta de anticuerpos puede estar retrasada, reducida o no existir en pacientes inmunodeprimidos.

Sin embargo, estos problemas podrían resolverse eligiendo los antígenos apropiados y utilizando técnicas lo suficientemente sensibles para detectar títulos bajos de anticuerpos. Las pruebas comercializadas actualmente detectan anticuerpos contra el manano y la enolasa y los antígenos del micelio de *C. albicans*. Estas pruebas deben utilizarse para estudiar muestras seriadas del paciente, lo que permite analizar la evolución de los títulos de anticuerpo y su correlación con los datos clínicos y microbiológicos. La detección simultánea de manano y anticuerpos anti-manano mejora ostensiblemente la sensibilidad y especificidad en el diagnóstico de candidosis invasora.

11.4. DETECCIÓN DE COMPONENTES NO ANTIGÉNICOS

La detección de componentes no antigénicos liberados por los hongos durante la infección es otra posibilidad en el diagnóstico de las micosis. Esta posibilidad es más reciente que la detección de anticuerpos y antígenos y se encuentra en desarrollo. Actualmente se basa en la detección de D-arabinitol, (1→3)-β-D-glucano y ADN. El D-arabinitol es un metabolito producido por *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* y *C. kefyr* que puede detectarse mediante cromatografía gas-líquido o mediante una técnica enzimática comercializada en Japón. Se han detectado niveles elevados de D-arabinitol en pacientes con candidosis invasora y su monitorización se ha mostrado útil en el seguimiento de estos pacientes. La técnica presenta falsos positivos en pacientes con insuficiencia renal o en tratamiento con esteroides y suele ser necesario ajustar las concentraciones de D-arabinitol con respecto a las de creatinina o L-arabinitol. El D-arabinitol también puede detectarse en orina. La detección de (1→3)-β-D-glucano en plasma es otra posibilidad diagnóstica en las micosis producidas por *Candida*, *Aspergillus*, *Pneumocystis* y otros hongos. No es eficaz para la detección de *C. neoformans*, Mucorales, *Trichosporon* y basidiomicetos, en general. El ser humano carece de glucanasas para digerir (1→3)-β-D-glucano y por tanto su eliminación es lenta. Existen varias pruebas comercializadas para la detección (1→3)-β-D-glucano, siendo el Fungitell® (anteriormente denominada GlucateLL®, Associates of Cape Cod) la más recientemente comercializada y la que puede obtenerse en nuestro país. Las pruebas para detectar (1→3)-β-D-glucano pueden presentar falsos positivos en pacientes sometidos a hemodiálisis con aparatos que tengan membranas de acetato de celulosa, o en tratamiento con albúmina, inmunoglobulinas, algunos agentes anticancerosos y sulfamidas. La aparición de nuevas técnicas moleculares abre un nuevo camino en el diagnóstico de la infección fúngica, la detección de ácidos nucleicos. Se utilizan métodos de hibridación y amplificación convencionales junto a nuevos sistemas de PCR a tiempo real (Light Cycler). El inconveniente fundamental de dichas técnicas es el elevado coste, la necesidad de personal

especializado, falta de pruebas normalizadas comerciales y la falta de estudios que demuestren que tipo de muestra y procedimiento es el más indicado.

11.5. INFORMACIÓN DE LOS RESULTADOS

El laboratorio de microbiología no ha de ser un emisor de datos cualitativos o cuantitativos de las determinaciones realizadas, ha de emitir un informe que interprete el conjunto de dichos datos, sobre todo cuando aparezcan resultados dudosos o de difícil interpretación. El microbiólogo ha de conocer la situación clínica del paciente en estudio para de esta manera realizar una adecuada interpretación y realizar una certera explicación. La mayoría de estos resultados serológicos han de ir acompañados de una alta sospecha clínica y de la utilización simultánea de distintas técnicas para aumentar la sensibilidad diagnóstica. La realización de las técnicas serológicas descritas anteriormente no supone una gran demora a la hora de emitir el resultado, el único inconveniente es, en alguna de ellas, la necesidad de procesar sueros seriados de cada paciente, como es el caso del antígeno galactomanano y manano. Esto no es así en el caso de la detección de antígenos capsulares de *Cryptococcus neoformans*, en el que un único resultado positivo es suficiente para realizar el diagnóstico.

11.6. PROCEDIMIENTOS NO ACEPTADOS

No se deben aplicar para el diagnóstico ensayos fabricados en el propio laboratorio que no garanticen la adecuada calidad de los resultados. Se deben seguir las instrucciones del fabricante en los ensayos comerciales y, en caso contrario, se deben notificar los cambios que se produzcan en el procedimiento normalizado de trabajo. No deben ser aceptables informes que no sean inteligibles para el clínico o no quede reflejado claramente el ensayo que se ha realizado con la adecuada interpretación.

12. BIBLIOGRAFIA

1. Clinical Laboratory Standards Institute. Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts. Approved Guideline, M44-A. Wayne, Pa. 2004.
2. Clinical Laboratory Standards Institute Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Approved standard, M38-A. Wayne Pa. 2002.
3. Clinical Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved Standard, M27-A2. Wayne, Pa. 2002.
4. Cuenca-Estrella M. Infecciones por *Candida* spp. Infecciones superficiales y profundas, 8ª ed, vol. 68. Ediciones Doyma S.L., Barcelona. 2002.
5. Cuenca-Estrella M. Infecciones profundas por otros hongos patógenos humanos, 8ª ed, vol. 68. Ediciones Doyma S.L., Barcelona. 2002.
6. Cuenca-Estrella M, Moore CB, Barchiesi F, Bille J, Chryssanthou E, Denning DW, Donnelly JP, Dromer F, Dupont B, Rex JH, Richardson MD, Sancak B, Verweij PE, Rodriguez-Tudela JL. Multicenter

- evaluation of the reproducibility of the proposed antifungal susceptibility testing method for fermentative yeasts of the Antifungal Susceptibility Testing Subcommittee of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (AFST-EUCAST). *Clin Microbiol Infect* 2003; 9:467-474.
7. Cuenca-Estrella M, Rodríguez-Tudela JL. ¿Pueden basarse las indicaciones de los antifúngicos en los estudios de sensibilidad? *Rev Iberoam Micol* 2002; 19:133-138.
 8. De Hoog GS, Guarro J. Atlas of clinical fungi. Centralbureau voor Schimmelcultures/ Universitat Rovira y Virgili. Baarn and Delf, The Netherlands, Universitat Rovira y Virgili, Reus, Spain. 2000.
 9. Edson RS, Fernandez-Guerrero ML, Roberts GD, Van Scoy RE. Clinical and laboratory features of cryptococcosis. A five-year experience. *Minn Med* 1987; 70:337-342.
 10. Espinel-Ingroff A, Barchiesi F, Cuenca-Estrella M, Pfaller MA, Rinaldi M, Rodríguez-Tudela JL, Verweij PE. International and multicenter comparison of EUCAST and CLSI M27-A2 broth microdilution methods for testing susceptibilities of *Candida* spp. to fluconazole, itraconazole, posaconazole, and voriconazole. *J Clin Microbiol* 2005; 43:3884-3889.
 11. Gadea I. Dermatomicosis y micosis tropicales, p. 47-56, *MEDICINE*, 8ª ed, vol. 68. Ediciones Doyma S.L., Barcelona. 2002
 12. Gavalda Santapau J, Ausina V. Infecciones por *Aspergillus*, 8ª ed, vol. 68. Ediciones Doyma S.L., Barcelona. 2002
 13. Gómez-López A, Aberkane A, Petrikkou E, Mellado E, Rodríguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M. Analysis of the influence of Tween concentration, inoculum size, assay medium, and reading time on susceptibility testing of *Aspergillus* spp. *J Clin Microbiol* 2005; 43:1251-1255.
 14. Isenberg HD. Clinical microbiology procedures handbook. American Society for Microbiology, Washington D.C. 1992.
 15. Kaufman L, Reiss E. Serodiagnosis of fungal diseases. In E. Lennette, A. Balows, W. J. J. Hausler, and H. J. Shadomy (ed.), *Manual of Clinical Microbiology*. American Society for Microbiology, Washington D.C. 1985.
 16. Lopez-Medrano R, Ovejero MC, Calera JA, Puente P, Leal F. An immunodominant 90-kilodalton *Aspergillus fumigatus* antigen is the subunit of a catalase. *Infect Immun* 1995 63: 4774-4780.
 17. Maertens J, Theunissen K, Verbeken E, Lagrou K, Verhaegen J, Boogaerts M, Eldere JV. Prospective clinical evaluation of lower cut-offs for galactomannan detection in adult neutropenic cancer patients and haematological stem cell transplant recipients. *Br J Haematol* 2004.126:852-860.
 18. Merz WG, Roberts GD. Detection and recovery of fungi from clinical specimens. En: P. R. Murray, E. J. Baron, M. A. Pfaller, F. C. Tenover, and R. H. Tenover (ed.), *Manual of Clinical Microbiology*. American Society for Microbiology, Washington D.C. 1999. p. 588-600.
 19. Odabasi Z, Mattiuzzi G, Estey E, Kantarjian H, Saeki F, Ridge RJ, Ketchum PA, Finkelman MA, Rex JH, Ostrosky-Zeichner L. Beta-D-glucan as a diagnostic adjunct for invasive fungal infections: validation, cutoff development, and performance in patients with acute myelogenous leukemia and myelodysplastic syndrome. *Clin Infect Dis* 2004; 39: 199-205.
 20. Pemán J, Martín-Mazuelos E, Rubio MC. Guía práctica de identificación y diagnóstico en Micología Clínica, 2 ed. Revista Iberoamericana de Micología, Bilbao. 2006.
 21. Pontón J, Moragues MD, Quindos G. Diagnóstico de la candidiasis invasora detectando anticuerpos anti-micelio. *Revista Iberoamericana de Micología*, Bilbao. 2004.
 22. Ponton J, Moragues MD, Quindos G.. Non-culture based diagnostics. En: R. Calderone (ed.), *Candida and Candidiasis*, vol. 1. American Society for Microbiology, Washington D.C. 2002 p. 395-425
 23. Prella M, Bille J, Pugnale M, Duvoisin B, Cavassini M, Calandra T, Marchetti O. Early diagnosis of invasive candidiasis with mannan antigenemia and antimannan antibodies. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2005; 51:95-101.
 24. Rex JH, Pfaller MA, Walsh TJ, Chaturvedi V, Espinel-Ingroff A, Ghannoum MA, Gosey LL, Odds FC, Rinaldi MG, Sheehan DJ, Warnock DW. Antifungal susceptibility testing: practical aspects and current challenges. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14: 643-658.
 25. Rodríguez-Tudela JL, Barchiesi F, Bille J, Chryssanthou E, Cuenca-Estrella M, Denning DW. Method for the determination of minimum inhibitory concentration (MIC) by broth dilution of fermentative yeasts. *Clinical Microbiology and Infection* 9:I-VIII. 2003.
 26. Rodríguez-Tudela JL, Chryssanthou E, Petrikkou E, Mosquera J, Denning DW, Cuenca-Estrella M. Interlaboratory evaluation of hemacytometer method of inoculum preparation for testing antifungal susceptibilities of filamentous fungi. *J Clin Microbiol* 2003; 41:5236-5237.
 27. Rodríguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M, Rodero L, Carpintero Y, Gorgojo B. Influence of shaking on antifungal susceptibility testing of *Cryptococcus neoformans*: a comparison of the NCCLS standard M27A medium, buffered nitrogen base, and RPMI-2% glucose. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 44:400-404.
 28. Rüchel R, Behe M, Torp B, Laatsch H. Usefulness of optical brighteners in medical mycology. *Rev Iberoam Micol* 2001; 18:147-9.
 29. Ruiz MP, Gadea I, Soriano F. 1993. [Utility of calcofluor white stain in the direct diagnosis of cutaneous fungal infections]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 11:109-10.
 30. Sendid B, Tabouret M, Poirot JL, Mathieu D, Fruit J, Poulain D. New enzyme immunoassays for sensitive detection of circulating *Candida albicans* mannan and antimannan antibodies: useful combined test for diagnosis of systemic candidiasis. *J Clin Microbiol* 1999 ; 37:1510-7

Servicio de Microbiología Hospital.....	Examen microscópico con hidróxido potásico (KOH)	PNT-MIC-01	
		Edición N° 01	Página 2 de 3

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

Definir la metodología para la realización del examen microscópico con hidróxido potásico (KOH) de muestras clínicas para detectar la presencia de elementos fúngicos. Este procedimiento es aplicable a todos los laboratorios de microbiología clínica.

2. FUNDAMENTO

Es una técnica sencilla que permite la observación inmediata de la muestra clínica. Su utilidad en el diagnóstico de las micosis superficiales y como orientación diagnóstica en las micosis profundas es elevada. Es el medio de montaje de las muestras clínicas más universalmente aceptado. Permite clarificar todo tipo de muestras clínicas con abundantes células y restos celulares y así observar la morfología y la pigmentación fúngica. El KOH disuelve más rápidamente los elementos celulares que los hongos (protegidos por la pared celular). El efecto clarificador del KOH puede demorar desde 10 minutos hasta horas, en el caso de las muestras de uñas, y puede reducirse calentando ligeramente la preparación. Se suelen utilizar dos concentraciones, una mayor, del 20-30% para uñas, y otra del 10% para el resto de muestras. Si no se utiliza con colorantes, las preparaciones deben estudiarse con un microscopio de contraste de fases o, en su defecto, con uno convencional diafragmando el condensador para aumentar el contraste.

Esta técnica es útil para la observación de escamas, pelos, uñas, exudados o biopsias. La adición del glicerol previene la degradación de los elementos fúngicos, evita la formación de cristales y la deshidratación de la preparación entre porta y cubre, convirtiéndola en semipermanente. La solución de KOH/glicerol es la más utilizada.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC n° 10 de "Seguridad en el laboratorio de microbiología clínica", 2000.
- Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC n° 1a de "Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el laboratorio de microbiología", 2003.

4. MUESTRAS

Cualquier tipo de muestra clínica: escamas, pelos, uñas, exudados, secreciones respiratorias, líquidos orgánicos o biopsias.

5. REACTIVOS Y PRODUCTOS

- KOH
- Glicerol
- Agua destilada

6. APARATOS Y MATERIALES

- Portaobjetos
- Cubreobjetos 20x20
- Pipetas desechables
- Microscopio de campo brillante

7. PROCESAMIENTO

7.1. PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE KOH AL 10%

- KOH 10 g.
- Glicerol 20 ml.
- Agua destilada 80 ml.
- Añadir 10 g de KOH a 40 ml de agua destilada y disolver completamente, luego añadir 20 ml de glicerol y, por último, añadir agua destilada hasta completar 100 ml. Mezclar por agitación. La solución no debe almacenarse en un recipiente de vidrio, pues se pueden formar precipitados.

7.2. REALIZACIÓN DE LA TÉCNICA

- Poner la muestra sobre el porta.
- Añadir una gota de KOH.
- Poner un cubre.
- Calentar suavemente en mechero Bunsen o a 55°C durante algunos minutos. En el caso de uñas, dejar toda una noche en estufa de 55°C (el calentamiento favorece la digestión de las células de la muestra, elimina las burbujas y la formación de cristales).
- Observar microscópicamente a bajo aumento (10x) y confirmar con 40x. Las preparaciones negativas se pueden observar al día siguiente.

8. OBTENCIÓN, INTERPRETACIÓN Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

- Los resultados positivos deben informarse: "se observan estructuras fúngicas compatibles con hongo filamentoso" o "se observan estructuras fúngicas compatibles con levaduras".
- Los resultados negativos deben informarse: "no se observan estructuras fúngicas".

9. RESPONSABILIDADES

Deben estar descritas en el manual general de organización del laboratorio de micología y en las fichas de descripción de los puestos de trabajo. El procedimiento deberá llevarse a cabo por personal cualificado con un entrenamiento específico. La supervisión de la técnica y de los resultados emitidos deberá realizarla el facultativo especialista responsable del laboratorio de micología.

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

Todo el personal del laboratorio de microbiología deberá conocer las normas generales de seguridad e higiene. Estas recomendaciones deberán estar recogidas en un documento establecido por el laboratorio de microbiología.

Es preferible que el montaje de las preparaciones se realice en una cabina de flujo laminar con capacidad de proteger al personal que manipula la muestra.

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Los problemas que presenta la interpretación de la visualización microscópica directa tienen que ver, sobre todo con la experiencia del observador, dado que ciertas estructuras presentes en la muestra

Servicio de Microbiología Hospital.....	Examen microscópico con hidróxido potásico (KOH)	PNT-MIC-01	
		Edición Nº 01	Página 3 de 3

(fibrina, gotas de grasa, células, etc.) pueden confundir a observadores inexpertos.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Clinical microbiology procedures handbook. 2ª edición. Editor HD Isenberg. 2005. American Society for Microbiology. Washington DC, USA.
2. Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Jorgensen JH, Tenover FC, Tenover FC (eds). Manual of Clinical Microbiology. 8ª ed. American Society for Microbiology. Washington DC. 2003.
3. Pemán J, Martín Mazuelos E, Rubio MC. (Eds). Guía práctica de identificación y diagnóstico en Micología Clínica. 2ª edición. Bilbao: Revista Iberoamericana de Micología, 2006.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Examen microscópico con blanco de calcoflúor	PNT-MIC-02	
		Edición Nº 01	Página 2 de 3

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

Definir la metodología para la realización del examen microscópico con blanco de calcoflúor de muestras clínicas para detectar la presencia de elementos fúngicos. Este procedimiento es aplicable a todos los laboratorios de microbiología clínica.

2. FUNDAMENTO

Es una técnica sencilla que permite la observación inmediata de la muestra clínica. Su utilidad en el diagnóstico de las micosis superficiales y como orientación diagnóstica en las micosis profundas es elevada.

El blanco de calcoflúor es un agente blanqueador fluorescente que, en solución o aplicado a un sustrato, absorbe la radiación en el ultravioleta cercano (350 nm) y emite la mayoría de la energía absorbida en la región azul del espectro visible (430 nm). Presenta una gran afinidad por las uniones beta-glucosídicas (glucanos, quitina, celulosa) presentes en los hongos y otros organismos, pero ausentes en los tejidos de mamíferos. Su alta afinidad por la quitina, glucono y celulosa los convierte en marcadores ideales de la estructura fúngica, ya sea en la muestra clínica como en el cultivo posterior. Se trata de un método diagnóstico en tiempo real (1-2 min). En el momento actual es una herramienta difícilmente prescindible en los laboratorios de micología.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC nº 10 de "Seguridad en el laboratorio de microbiología clínica", 2000.
- Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC nº 1a de "Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el laboratorio de microbiología", 2003.

4. MUESTRAS

Cualquier tipo de muestra clínica: escamas, pelos, uñas, exudados, secreciones respiratorias, líquidos orgánicos o biopsias.

5. REACTIVOS Y PRODUCTOS

- Blancophor P (Bayer Cat. nº C52349), Calcoflúor White M2R o Fluorescent Brightener 28 (Sigma-Aldrich Cat. nº F3543, ICN Ref. nº 158067).
- Solución de KOH al 20%
- Azul de Evans
- Agua destilada

6. APARATOS Y MATERIALES

- Portaobjetos
- Cubreobjetos 20x20
- Pipetas desechables
- Microscopio de fluorescencia.
- Sistema de iluminación: la intensidad de la fluorescencia de los agentes blanqueadores no hace imprescindible el uso de una lámpara de vapor de

mercurio en el microscopio de fluorescencia, siendo suficiente una lámpara halógena.

- Filtros: es imprescindible utilizar un sistema de filtros adecuado ya que los filtros tradicionalmente usados en laboratorio de microbiología (auramina-naranja de acridina-FITC) con un filtro excitador centrado en 470 nm son totalmente ineficaces con estos fluorocromos. El juego de filtros más ajustado a los datos espectrales básicos de estas moléculas sería un Ultravioleta UV (Exc: 330-380/EspDic: 400/Bar: 420) que origina una fluorescencia del hongo azul-plata. Otra posibilidad es un Violeta V (Exc: 380-420/EspDic: 430/Bar: 450) aunque el hongo se vería de un color verdoso. El Azul-Violeta BV (Exc: 400-440/EspDic: 455/Bar: 470) también sería útil, con la ventaja de que con este filtro también se excitan dos de los fluorocromos más utilizados en laboratorio de microbiología: auramina y naranja de acridina.

7. PROCESAMIENTO

7.1. PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE CALCOFLÚOR

- Calcoflúor (0,05 g), azul de Evans (0,02 g), agua destilada (50 ml).
- Mezclar y calentar suavemente (añadir unas gotas de NaOH al 50% para obtener la total disolución).
- Almacenar a temperatura ambiente en oscuridad.

7.2. REALIZACIÓN DE LA TÉCNICA

- Colocar la muestra en un porta.
- Añadir una gota de calcoflúor.
- Añadir una gota de KOH al 20%.
- Cubrir con un cubre.
- Calentar suavemente el porta.
- Observar al microscopio de fluorescencia a 420 nm a bajo aumento (10X y 40X).
- En el caso de frotis fijados, es conveniente teñir durante 3 min, lavar con agua y montar, de esta forma se reducen la coloración de fondo y los artefactos.

8. OBTENCIÓN, INTERPRETACIÓN Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

- Los resultados positivos deben informarse: "se observan estructuras fúngicas compatibles con hongo filamentoso" o "se observan estructuras fúngicas compatibles con levaduras".
- Los resultados negativos deben informarse: "no se observan estructuras fúngicas".

9. RESPONSABILIDADES

Deben estar descritas en el manual general de organización del laboratorio de micología y en las fichas de descripción de los puestos de trabajo.

El procedimiento deberá llevarse a cabo por personal cualificado con un entrenamiento específico. La supervisión de la técnica y de los resultados emitidos deberá realizarla el facultativo especialista responsable del laboratorio de micología.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Examen microscópico con blanco de calcoflúor	PNT-MIC-02	
		Edición Nº 01	Página 3 de 3

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

Todo el personal del laboratorio de microbiología deberá conocer las normas generales de seguridad e higiene. Estas recomendaciones deberán estar recogidas en un documento establecido por el laboratorio de Microbiología.

Es preferible que el montaje de las preparaciones se realice en una cabina de flujo laminar con capacidad de proteger al personal que manipula la muestra.

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

A diferencia de otras técnicas de microscopía de exámen directo, la alta intensidad de fluorescencia del blanco de calcoflúor y su escaso *fading* (escasa pérdida de intensidad de fluorescencia) permite la detección fúngica, desde mínimos aumentos y a plena luz del día. Se trata, pues, de una técnica de aprendizaje rápido que no requiere de gran experiencia, pues los artefactos son fácilmente reconocidos.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Harrington BJ, Hageage GJ. Calcoflúor white: tips for improving its use. Clin Microbiol Newslet 1991; 13:3-5.
2. Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Jorgensen JH, Tenover FC, Tenover FC (eds). Manual of Clinical Microbiology. 8ª ed. American Society for Microbiology. Washington DC. 2003.
3. Pemán J, Martín Mazuelos E, Rubio MC. (Eds). Guía práctica de identificación y diagnóstico en Micología Clínica. 2ª edición. Bilbao: Revista Iberoamericana de Micología, 2006.
4. Rùchel R, Behe M, Torp B, Laatsch H. Usefulness of optical brighteners in medical mycology. Rev Iber Micol 2001; 18:147-149.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Examen microscópico con tinta china	PNT-MIC-03	
		Edición Nº 01	Página 2 de 2

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

Definir la metodología para la realización del examen microscópico con tinta china de muestras clínicas para detectar la presencia de elementos fúngicos. Este procedimiento es aplicable a todos los laboratorios de microbiología clínica.

2. FUNDAMENTO

Para la detección de la cápsula polisacáridica extracelular de algunos hongos se utilizan suspensiones coloidales de partículas de carbón. Es la técnica de tinción negativa más ampliamente recogida en la literatura para poner de manifiesto la cápsula de *Cryptococcus neoformans*. Muy útil para la búsqueda de esta levadura en LCR tras la centrifugación y en otras muestras (lavado broncoalveolar, biopsias).

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC nº 10 de "Seguridad en el laboratorio de microbiología clínica", 2000.
- Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC nº 1a de "Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el laboratorio de microbiología", 2003.

4. MUESTRAS

LCR, lavado broncoalveolar o biopsias.

5. REACTIVOS Y PRODUCTOS

- Tinta china de buena calidad pues no todas son adecuadas. Se puede añadir Thimerosal (Sigma) al 0,3 % como conservante y una gota de detergente para mantener las partículas de carbón en suspensión.

6. APARATOS Y MATERIALES

- Portaobjetos
- Cubreobjetos 20x20
- Pipetas desechables
- Microscopio de campo brillante

7. PROCESAMIENTO

7.1. REALIZACIÓN DE LA TÉCNICA

- Colocar una gota de la muestra en un portaobjetos limpio y desengrasado.
- Añadir una gota de tinta china.
- Mezclar evitando formar burbujas. Si la tinta es demasiado oscura diluir con agua a 1/3. La preparación debe ser fina y su color marrón, no negro. La cantidad de tinta no debe ser ni excesiva ni escasa, ya que, en ambos casos, el riesgo de artefactos se incrementa. Es importante manipular con cuidado el frasco de tinta evitando todo contacto con la muestra clínica que pueda contaminarlo y así producir falsos positivos.
- Cubrir con un cubre.
- Observar al microscopio a bajo aumento (10X y 40X).

8. OBTENCIÓN, INTERPRETACIÓN Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

- La presencia de formas redondas rodeadas de un halo grande y transparente sobre un fondo negro son sugestivas de *C. neoformans*.
- Los resultados positivos deben informarse: "se observan levaduras capsuladas compatibles con *C. neoformans*".
- Los resultados negativos deben informarse: "no se observan estructuras fúngicas".

9. RESPONSABILIDADES

Deben estar descritas en el manual general de organización del laboratorio de micología y en las fichas de descripción de los puestos de trabajo. El procedimiento deberá llevarse a cabo por personal cualificado con un entrenamiento específico. La supervisión de la técnica y de los resultados emitidos deberá realizarla el facultativo especialista responsable del laboratorio de micología.

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

Todo el personal del laboratorio de microbiología deberá conocer las normas generales de seguridad e higiene. Estas recomendaciones deberán estar recogidas en un documento establecido por el laboratorio de Microbiología.

Es preferible que el montaje de las preparaciones se realice en una cabina de flujo laminar con capacidad de proteger al personal que manipula la muestra.

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Aunque la técnica es muy rápida y sencilla, la sensibilidad de la técnica es del 50% en pacientes no infectados por el VIH y del 70-88% en los infectados por el VIH con meningitis criptocócica.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Clinical microbiology procedures handbook. 2ª edición. Editor HD Isenberg. 2005. American Society for Microbiology. Washington DC, USA.
2. Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Jorgensen JH, Tenover FC (eds). Manual of Clinical Microbiology. 8ª ed. American Society for Microbiology. Washington DC. 2003.
3. Pemán J, Martín Mazuelos E, Rubio MC. (Eds). Guía práctica de identificación y diagnóstico en Micología Clínica. 2ª edición. Bilbao: Revista Iberoamericana de Micología, 2006.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Tinción argéntica rápida (Gomori-Grocott modificada)	PNT-MIC-04	
		Edición Nº 01	Página 2 de 3

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

Definir la metodología para la visualización microscópica de *Pneumocystis jiroveci*, aunque también pueden detectarse otros hongos, mediante tinción argéntica rápida. Este procedimiento es aplicable a todos los laboratorios de microbiología clínica.

2. FUNDAMENTO

P. jiroveci sigue siendo de los pocos agentes infecciosos que se resiste a ser cultivado. Aunque las nuevas técnicas de biología molecular han resuelto su incierta situación taxonómica y ayudan a comprender su biología y epidemiología, e incluso, permiten la detección de genes de resistencia, su diagnóstico todavía recae en su visualización microscópica.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC nº 10 de "Seguridad en el laboratorio de microbiología clínica", 2000.
- Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC nº 1a de "Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el laboratorio de microbiología", 2003.

4. MUESTRAS

Espuito inducido, aspirado bronquial, lavado broncoalveolar o biopsia pulmonar.

5. REACTIVOS Y PRODUCTOS

- Agente mucolítico (Ditiotreitol o N-acetil cisteína).
- Agua destilada.
- PBS.
- Solución de ácido crómico al 10 %.
- Metabisulfito sódico al 1%.
- Solución de metenamina-nitrato de plata (20 ml de metenamina al 3 %, 1 ml de nitrato de plata al 5 %, 1,5 ml de borato sódico al 5 % y 17 ml de agua destilada).
- Solución de cloruro de oro (III) al 1%.
- Solución de tiosulfato sódico al 5%.
- Solución de verde brillante en ácido acético glacial al 0,2%.
- Entellán.

6. APARATOS Y MATERIALES

- Portaobjetos
- Cubreobjetos 20x50
- Cubeta para tinciones
- Vórtex
- Centrífuga
- Estufa de 37°C
- Microondas
- Microscopio de campo brillante

7. PROCESAMIENTO

7.1 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

- El adecuado procesamiento de las muestras es un paso crítico en el diagnóstico microscópico de la neumocistosis.

- Espuito:
 - Añadir a 2-3 ml del esputo el mismo volumen de Ditiotreitol al 0,3% (1,5 g en 500 ml agua destilada).
 - Agitar e incubar 5 min a 37°C.
 - Añadir un volumen igual de PBS y agitar hasta conseguir una buena mezcla.
 - Centrifugar a 1.500xg, 10 min.
 - Retirar el sobrenadante y resuspender el sedimento con 500 µL de PBS.
 Si no se ha eliminado todo el moco de la muestra, se repiten los pasos 1 y 2.
- Aspirado bronquial y LBA:
 - Centrifugar la muestra a 1.500xg, 10 min.
 - Retirar el sobrenadante.
 - Resuspender el sedimento en un pequeño volumen de PBS hasta que la densidad del material no sea excesiva.
- Tras la preparación y concentración, se puede depositar directamente una gota del sedimento en el centro de un portaobjetos o utilizar 200 µL para la citocentrífuga. Secar al aire y fijar con metanol.

7.2. REALIZACIÓN DE LA TÉCNICA

- Cubrir el portaobjetos con la muestra fijada con una solución de ácido crómico al 10%, dejando actuar durante 10 minutos. (Se puede acortar al utilizar un microondas durante 40 segundos).
- Lavar el portaobjetos con agua destilada.
- Cubrir con una solución de metabisulfito sódico al 1% durante 1 min.
- Lavar con agua destilada e introducir el portaobjetos en un recipiente donde se ha preparado previamente, justo en el momento de realizar la tinción, la solución de trabajo de metenamina-nitrato de plata.
- Tapar el recipiente e introducir en un microondas, al 50% de su potencia, durante aproximadamente 60 segundos (si el microondas no tuviese plato giratorio, debe pararse a los 30 segundos, girar el recipiente 90° y volver calentar otros 30 segundos). Posteriormente, mantener la solución caliente durante 2 min (deberá tomar un color marrón oscuro). En caso de que no se disponga de microondas, se puede utilizar un baño de agua a 80°C, donde se coloca el recipiente con la solución de teñido 6 min antes de colocar en el mismo el portaobjetos. Se mantiene en esas condiciones durante otros 5 min, debiendo cambiar el color de la solución, como en el caso anterior, de marrón a negro.
- Transcurrido el tiempo correspondiente, sacar el portaobjetos y lavar con agua destilada.
- Sumergir el portaobjetos en una solución de cloruro de oro al 1% de 2 a 5 segundos; seguidamente, lavar con agua destilada.
- Cubrir el portaobjetos con una solución de tiosulfato sódico al 5% durante 1 min. Lavar de nuevo con agua destilada.
- Cubrir con una solución al 0,2% de verde brillante en ácido acético glacial durante 1 min. Lavar con agua destilada, escurrir el portaobjetos y dejar secar.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Tinción argéntica rápida (Gomori-Grocott modificada)	PNT-MIC-04	
		Edición Nº 01	Página 3 de 3

- Montar la preparación con cubreobjetos y Entellán.
- Examinar la preparación a bajo aumento (20X, 40X) y confirmar a 100X.

8. OBTENCIÓN, INTERPRETACIÓN Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

- La pared de los quistes de *P. jiroveci* se tiñen irregularmente de color gris-marrón, con aspecto de uva pasa.
- El interior de los quistes no se tiñe con esta tinción.
- La presencia de formas redondeadas de color gris o marrón oscuro con la pared engrosada en forma de doble coma es característica de *P. jiroveci*.
- Los resultados positivos deben informarse: "se observan quistes de *P. jiroveci*".
- Los resultados negativos deben informarse: "no se observan quistes de *P. jiroveci*".

9. RESPONSABILIDADES

Deben estar descritas en el manual general de organización del laboratorio de micología y en las fichas de descripción de los puestos de trabajo.

El procedimiento deberá llevarse a cabo por personal cualificado con un entrenamiento específico. La supervisión de la técnica y de los resultados emitidos deberá realizarla el facultativo especialista responsable del laboratorio de micología.

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

Todo el personal del laboratorio de microbiología deberá conocer las normas generales de seguridad e higiene. Estas recomendaciones deberán estar recogidas en un documento establecido por el laboratorio de Microbiología.

Es preferible que el montaje de las preparaciones se realice en una cabina de flujo laminar con capacidad de proteger al personal que manipula la muestra.

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

La tinción argéntica se realiza en aproximadamente 2 horas y requiere experiencia para distinguir la morfología de *P. jiroveci*.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Clinical microbiology procedures handbook. 2ª edición. Editor HD Isenberg. 2005. American Society for Microbiology. Washington DC, USA.
2. Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Jorgensen JH, Tenover FC (eds). Manual of Clinical Microbiology. 8ª ed. American Society for Microbiology. Washington DC. 2003.
3. Pemán J, Martín Mazuelos E, Rubio MC. (Eds). Guía práctica de identificación y diagnóstico en Micología Clínica. 2ª edición. Bilbao: Revista Iberoamericana de Micología, 2006.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Diagnóstico micológico por cultivo convencional	PNT-MIC-05	
		Edición Nº 01	Página 2 de 7

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

Definir la metodología para la el diagnóstico de las micosis mediante cultivo.

Este procedimiento es aplicable a todos los laboratorios de microbiología clínica. Sólo en el caso de sospecha de micosis primaria endémica por hongos dimórficos, serán necesarias unas instalaciones de seguridad determinadas.

2. FUNDAMENTO

El cultivo es el método de referencia para el diagnóstico de las micosis. Tiene el problema de la demora diagnóstica cuando se trata de hongos de crecimiento lento, y actualmente se complementa con otros procedimientos para el diagnóstico de las micosis invasoras. Todavía hoy es prácticamente el único método junto con los exámenes directos para el diagnóstico de las micosis superficiales y cutáneo mucosas.

Según las necesidades, se utilizan diferentes tipos de medios de cultivo:

- **Generales:** no tienen inhibidores. El más característico y clásico es el agar glucosado de Sabouraud (AGS), que se utiliza frecuentemente para la observación y descripción de las características morfológicas de la mayoría de los hongos.
- **Enriquecidos:** se utilizan especialmente en micosis sistémicas endémicas (histoplasmosis, coccidioidomicosis, etc.), un ejemplo es el agar cerebro-corazón con sangre de carnero (BHI).
- **Selectivos:** son medios que favorecen el aislamiento de los microorganismos deseados, impidiendo el de otros. Los componentes más utilizados como agentes selectivos son antibacterianos (cloranfenicol, gentamicina), y también inhibidores de hongos como la cicloheximida (actidiona), que es especialmente útil en las muestras cutáneas y respiratorias, si se sospecha en estas últimas la presencia de hongos dimórficos.
- **Diferenciales:** se utilizan para ayudar a la identificación del hongo según el aspecto que adquieren en ese medio: para ello se añaden sustancias cromógenas e indicadores de pH: son ejemplo los agares cromógenos para el diagnóstico/identificación de levaduras.
- **Especializados:** son aquellos medios que contienen algún componente destinado a aislar un agente concreto o a favorecer su identificación. Es el caso de los medios con extracto de *Guizottia abyssinica* que permiten el aislamiento e identificación de *C. neoformans*.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Documento científico de este procedimiento
- Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC nº 10 de "Seguridad en el laboratorio de microbiología clínica", 2000.

- Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC nº 1a de "Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el laboratorio de microbiología", 2003.

- Procedimientos específicos mencionados en la bibliografía de este PNT (punto 12).

4. MUESTRAS

En el laboratorio de micología se diagnostican infecciones de etiología fúngica de cualquier procedencia. Las distintas muestras que se estudian son:

- Pelos
- Uñas
- Piel
- Espacios interdigitales
- Pus, exudados y drenajes
- Muestras oculares
- Muestras respiratorias
- Líquidos estériles
- Orina
- Biopsias
- Otras muestras.

Quedan excluidas en este apartado las muestras de exudado vaginal/cervical si se realizan la toma de muestras en una consulta específica y los hemocultivos, aunque los posibles aislamientos fúngicos obtenidos a partir de estas muestras deben ser remitidos a este laboratorio de micología para su identificación.

5. REACTIVOS Y PRODUCTOS

- Dextrosa.
- Sacarosa.
- Ácido cafeico.
- Peptona.
- Agar.
- Agua destilada.
- Cloranfenicol.
- Etanol 96%.
- Acetona.
- Actidiona/cicloheximida.
- Azul de bromotimol.
- Extracto de levadura.
- Yeast carbon base.
- Yeast nitrogen base.
- Corn meal agar liofilizado.
- Rice extract agar liofilizado.
- Rojo fenol.
- Fitona.
- Base urea de Christensen.
- HCl.
- NaOH.
- Gentamicina.
- Clortetraciclina.
- Placas de agar con sangre de carnero.

También se puede disponer de medios de cultivos comerciales liofilizados o de tubos y placas con medio de cultivo comercializado.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Diagnóstico micológico por cultivo convencional	PNT-MIC-05	
		Edición Nº 01	Página 3 de 7

6. APARATOS Y MATERIALES

- Incubador de 37 ± 2°C con CO₂.
- Incubador de 30 ± 2°C.
- Incubador de 45 ± 2°C
- Asas bacteriológicas estériles.
- Tubos de vidrio de boca ancha con tapón de rosca.
- Placas de Petri estériles (referencia)
- Autoclave.
- Lavaplatos.
- Pipetas Pasteur estériles.
- Escobillones o torundas estériles.

7. PROCESAMIENTO

7.1. PREPARACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO.

7.1.1. Sabouraud dextrosa agar.

- Dextrosa 40 g
- Peptona..... 10 g
- Agar 15 g
- Agua destilada 1000 ml

Ajustar pH a 5,6.

Disolver los ingredientes mediante ebullición, dispensar en tubos y autoclavar 10 minutos a una atmósfera de presión (121°C). Para la preparación de medios de cultivo en placas, disolver ingredientes mediante ebullición, autoclavar 10 minutos y dispensar en las placas con el espesor suficiente para evitar la desecación.

7.1.2. Sabouraud dextrosa agar. Modificación de Emmons

- Dextrosa 20 g
- Peptona..... 10 g
- Agar 17 g
- Agua destilada 1000 ml

Ajustar pH a 6,9.

Disolver los ingredientes mediante ebullición, dispensar en tubos y autoclavar 10 minutos a una atmósfera de presión. Para la preparación de los medios de cultivo en placas, disolver ingredientes mediante ebullición, autoclavar 10 minutos y dispensar en las placas con el espesor suficiente para evitar la desecación.

7.1.3. Sabouraud dextrosa agar. Modificación de Emmons con inhibidores.

7.1.3.1. Solución madre de cloranfenicol:

- Cloranfenicol base.... 500 mg
- Etanol 100 ml

7.1.3.2. Solución madre de actidiona/cicloheximida:

- Cicloheximida 5 g
- Acetona 100 ml

7.1.3.3. Sabouraud (Emmons) con cloranfenicol:

Preparar como se especifica en el punto 7.1.2, pero añadir 10 ml de solución madre de cloranfenicol por litro de medio antes de autoclavar.

7.1.3.4. Sabouraud (Emmons) con cloranfenicol y actidiona:

Preparar como en el punto 7.1.3.3, pero añadiendo, además, 10 ml de solución madre de actidiona por litro de medio antes de autoclavar.

7.1.4. Preparación de medio de auxonograma de carbono (para levaduras):

- Yeast Nitrogen base 6,7 g
- Agar 20 g
- Agua destilada..... 1.000 ml

Disolver por ebullición y dispensar en tubos a razón de 20 ml, autoclavar y almacenar a 4°C.

7.1.5. Preparación de medio de auxonograma de nitrógeno:

- Yeast carbon base 12 g
- Agar 20 g
- Agua 1000 ml

Disolver por ebullición y dispensar en tubos a razón de 20 ml, autoclavar y almacenar a 4°C.

7.1.6. Preparación el medio agar harina de maíz (Corn meal agar, CMA):

- Corn meal agar 8,5 g
- Agua 500 ml

7.1.7. Preparación del medio de arroz con Tween:

- Rice extract (Referencia) 12,5 g
- Agua 500 ml
- Tween 80 1,5 ml

Disolver por ebullición, dispensar en tubos tapón de rosca a razón de 20 ml por tubo y autoclavar.

7.1.8. DTM (Dermatophyte test medium):

- Fitona 10 g
- Dextrosa 10 g
- Agar 20 g
- Solución de rojo fenol 40 ml
- HCl 0,8 M 6 ml
- Cicloheximida 0,5 g
- Gentamicina (sulfato) 0,1 g
- Clortetraciclina (clorhidrato) 0,1 g
- Agua destilada 1000 ml

- Disolver la dextrosa, la fitona y el agar por ebullición en baño.

- Añadir 40 ml de la solución de rojo fenol (0,5 g de rojo fenol en 15 ml de 15 ml de NaOH 0,1 N y completar hasta 100 ml con agua destilada), sin dejar de agitar.

- Añadir el HCl sin dejar de agitar.

- Disolver la gentamicina en 2 ml de agua y añadir al medio sin dejar de agitar.

- Autoclavar a una atmósfera durante 10 minutos.

- Dejar enfriar hasta aproximadamente 47°C.

- Disolver la clortetraciclina en 25 ml de agua destilada estéril en contenedor estéril y añadir al medio.

- Dispensar en tubos estériles con tapón de rosca a razón de 30 ml por tubo. Conservar a 4°C.

- El medio debe tener color amarillo y un pH final de 5,5 ± 0,1.

7.1.9. Caldo de fermentación para levaduras:

- Azul de bromotimol 0,04 g
- Extracto de levadura 4,50 g
- Peptona 7,50 g
- Agua destilada 1000,00 ml

Servicio de Microbiología Hospital.....	Diagnóstico micológico por cultivo convencional	PNT-MIC-05	
		Edición Nº 01	Página 4 de 7

7.1.9.1. Solución madre de carbohidratos:

- Carbohidrato 6 g
- Agua destilada 100 ml
- Esterilizar mediante filtración por filtro de 0,22 µm de tamaño de poro.
- Disolver el azul de bromotimol en 3 ml de etanol 96% y añadir a los otros ingredientes.
- Dispensar en alícuotas de 2 ml en tubos con tapón de rosca.
- Colocar una campana de Durham (boca abajo) en cada tubo.
- Autoclavar a una atmósfera durante 15 minutos.
- Añadir 1 ml de cada uno de los diferentes carbohidratos a ensayar, un carbohidrato por tubo, lógicamente. Una vez añadido el carbohidrato, los tubos de caldo se pueden conservar en el refrigerador durante un mes.

7.1.10. Czapek dox:

- Sacarosa 30 g
- Nitrato sódico 3 g
- Fosfato dipotásico 1 g
- Sulfato magnésico 0,5 g
- Cloruro potásico 0,5 g
- Sulfato ferroso 0,01 g
- Agar 15 g
- Agua destilada 1000 ml

pH final 7,3

Se disuelven los componentes por ebullición. Autoclavar 15 minutos a una atmósfera de presión (121°C) y dispensar asépticamente en las placas de Petri.

7.1.11. Agar ácido cafeico:

- Glucosa 5 g
- Sulfato amónico 5 g
- Fosfato potásico 0,8 g
- Sulfato magnésico 0,8 g
- Ácido cafeico 0,18 g
- Solución de citrato férrico 4 ml
- Agar 20 g
- Agua destilada 1000 ml

La solución de citrato férrico contiene 10 mg de citrato en 20 ml de agua.

Mezclar todos los ingredientes, autoclavar durante 12 minutos y dispensar en placas.

7.1.12. Urea de Christensen:

- Base de la urea de Christense..... 29 g
- Agua destilada 100 ml

Mezclar y esterilizar por filtración.

- Agar 15 g
- Agua destilada 900 ml

Disolver por ebullición y esterilizar mediante autoclavado 15 min a 121°C.

Cuando el agar está a una temperatura aproximada de 50°C se añaden los 100 ml de la base de urea de Christensen. Mezclar y dispensar en tubos estériles.

7.2 SIEMBRA E INCUBACIÓN:

No existe un único medio de cultivo de elección para realizar todo el diagnóstico micológico, por lo que la sospecha clínica debe orientar sobre los medios a utilizar.

El medio Sabouraud con cloranfenicol y actidiona y el medio DTM son ideales para el cultivo de dermatofitos. En este último, el viraje del pH a alcalino ayuda a reconocer a los dermatofitos. Para recuperar levaduras y otros hongos filamentosos es necesario incluir medios sin actidiona, como el Sabouraud cloranfenicol. Para el cultivo de *Malassezia* spp. serán necesarios medios que contengan ácidos grasos.

Se recomienda la incubación a 30°C, pero la incubación a temperatura ambiente puede ser aceptable. Se deben utilizar preferentemente los cultivos en tubo porque evitan la deshidratación y presentan menos riesgo de dispersión de esporas/conidias. Los tapones de rosca no deben cerrarse herméticamente, pues todos los hongos son predominantemente aerobios. El periodo de incubación debe ser de 4 semanas, salvo que sólo se intenten recuperar levaduras de crecimiento rápido.

7.3. IDENTIFICACIÓN DE LOS AISLAMIENTOS.

7.3.1. Levaduras.

Se puede realizar una identificación presuntiva mediante la utilización de medios cromógenos (ver PNT-MIC-06 de este procedimiento) que prácticamente han desplazado la realización del test de filamentación precoz. Para la identificación definitiva es necesaria la descripción morfológica obtenida en un medio como el agar harina de maíz o el agar arroz con Tween 80. La identificación morfológica requiere experiencia y se basa en la presencia de estructuras de hifas verdaderas, pseudohifas, blastoconidias, clamidoconidias y artroconidias. Con la descripción morfológica se suele obtener una identificación de género y, en ojos expertos, puede ser suficiente para la identificación de las especies de levadura más frecuentes en el laboratorio de microbiología clínica.

La identificación se complementa utilizando las pruebas de asimilación de carbohidratos y compuestos nitrogenados, los denominados auxonogramas de carbono, y de la presencia de fenol oxidasa y, si esto no fuera suficiente, se completaría con pruebas de fermentación de carbohidratos.

El método tradicional para realizar el auxonograma es como sigue:

- Preparar medios libres de fuentes de carbono o de nitrógeno, como los descritos anteriormente.
- Emulsionar la levadura a identificar en el medio, previamente fundido y enfriado a 40°C.
- Dispensar la emulsión se dispensa en placas de Petri.
- Cuando el medio esté solidificado, añadir discos impregnados con diferentes carbohidratos o nitrogenados, según se trate.
- Anotar si hay presencia de crecimiento alrededor de los diferentes discos.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Diagnóstico micológico por cultivo convencional	PNT-MIC-05	
		Edición Nº 01	Página 5 de 7

Los auxonogramas se pueden sustituir por diferentes métodos comerciales que se pueden consultar en el PNT-MIC-06 de este procedimiento.

Para las pruebas de fermentación se utiliza el medio de fermentación con carbohidratos dispensados con campanas de Durham. La fermentación de un carbohidrato determinado se reconoce por la acumulación de gas en la campana que, eventualmente, puede hacerla ascender.

En el caso de sospecha de *C. neoformans*, la levadura a identificar se sembrará en medio con ácido cafeico para la detección de fenol oxidasa, característica de esta especie, y que se reconoce por la aparición de colonias pigmentadas (marrón).

7.3.2. Hongos filamentosos.

La identificación de los hongos filamentosos se fundamenta en la descripción de características morfológicas en medios de cultivo que son diferentes según la sospecha, así:

- El agar Sabouraud, formulación original, es el utilizado en la mayoría de las descripciones de hongos filamentosos y es el de referencia en los dermatofitos.
- El Czapek Dox es el utilizado para la descripción de *Aspergillus* y *Penicillium*.
- Se requieren medios especiales para la estimulación de pigmentos, esporas sexuales y conidias de determinadas especies (consultar el documento científico y la bibliografía de este documento).
- La producción de ureasa puede ser útil para la diferenciación de determinados hongos dermatofitos.

8. OBTENCIÓN, INTERPRETACIÓN Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

- Los cultivos se deben observar diariamente los 3 primeros días desde la siembra. Seguidamente, se procede a realizar una lectura semanal hasta que cumplan su periodo de incubación.
- Los aislamientos sospechosos se deben identificar a nivel de especie, sobre todo si proceden de muestras significativas.
- Salvo los hongos claramente patógenos, los aislamientos de hongos potencialmente contaminantes de muestras poco representativas deben ser valorados complementariamente con los exámenes microscópicos directos, y considerar el análisis de más muestras para la valoración de aislamientos repetidos.
- Se debe transmitir al clínico la sospecha sobre la implicación patogénica de un aislamiento determinado.

9. CONTROL DE CALIDAD

Los programas de "control de calidad" aseguran que la información generada por el laboratorio es reproducible y adecuada. Para ello, es imprescindible controlar la esterilidad de los medios caseros, la eficacia para reproducir las pruebas para las que están diseñados y documentar la validez de todos los medios.

9.1. MEDIDAS GENERALES

Todos los medios, soluciones y reactivos deben ser etiquetados con el nombre, código de catálogo, número de lote y fecha de caducidad. Igualmente, debe anotarse la fecha de primera utilización.

Todos los medios se deben inspeccionar en cuanto al color, desperfectos, humedad y posible contaminación en el momento en que se reciben. El resultado de esta inspección debe quedar reflejada en las hojas del control de calidad.

9.2. CONTROL DE LA ESTERILIDAD DE LOS MEDIOS PREPARADOS EN EL PROPIO LABORATORIO

- Al azar, seleccionar el 5% de las unidades de cada medio preparado.
- Incubar la mitad de ellas a 35°C durante tres días. El resto de las unidades se incuban a 25°C durante tres días.
- Inspeccionar los cultivos diariamente.
- Si el 5% o menos de las unidades cultivadas muestran contaminación, el lote es aceptable para su uso. Las unidades utilizadas para esta prueba no se reutilizarán. Los resultados se documentarán en el formato adecuado.
- Si más del 5% del total de unidades ensayadas muestra contaminación, el lote se debe comprobar de nuevo siguiendo el mismo método y si se confirma más de un 5% de unidades contaminadas el lote debe ser rechazado.

9.3. CONTROL DE LA IDONEIDAD DE LOS LOTES

- Se debe realizar una evaluación de la idoneidad de los medios, soluciones y reactivos con cada nuevo lote. Los medios comerciales que se adquieren ya preparados están exentos de este procedimiento y sólo se requiere la inspección macroscópica, etiquetado y control de la fecha de caducidad.
- Los controles de calidad de los medios comerciales deben ser facilitados por los fabricantes.
- Todos los microorganismos utilizados para los controles de calidad se deben mantener congelados a -70°C por un tiempo indefinido. Para el trabajo habitual, los hongos se mantienen a temperatura ambiente subcultivándose cada tres meses, renovando las cepas cada año a partir de las alícuotas congeladas.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Diagnóstico micológico por cultivo convencional	PNT-MIC-05	
		Edición Nº 01	Página 6 de 7

9.3.1. Control de los diferentes medios.

Test de filamentación:

- 1) *Candida albicans* (ATCC 14053) Control positivo
- 2) *Candida tropicalis* (ATCC 13803) Control negativo

Urea de Christensen:

- 1) *Cryptococcus neoformans* (ATCC 32045)..... Control positivo (rosa)
- 2) *Candida albicans* (ATCC 14053) Control negativo.
- 3) *Trichophyton mentagrophytes* (UTMB 422) Control positivo (rosa)
- 4) *Trichophyton rubrum* (UTMB 417) Control negativo
- 5) No inoculado Medio amarillo. No reacción

Agar harina de maíz/agar arroz con y sin Tween

- 1) *Candida albicans* (ATCC 14053) Crecimiento
- 2) No inoculado No crecimiento

Sabouraud cloranfenicol

- 1) *Candida albicans* (ATCC 14053) Crecimiento
- 2) *Escherichia coli* No crecimiento
- 3) No inoculado No crecimiento

Sabouraud cloranfenicol actidiona

- 1) *Trichophyton mentagrophytes* (UTMB 422) Crecimiento
- 2) *Aspergillus flavus* (CDC B-15) Crecimiento escaso o no crecimiento
- 3) No inoculado No crecimiento

Czapek dox

- 1) *Aspergillus flavus* (CDC B-15)..... Crecimiento
- 2) No inoculado No crecimiento

Agar ácido cafeico

- 1) *Cryptococcus neoformans* (ATCC 32045) Crecimiento. Colonia pigmentada marrón
- 2) *Cryptococcus albidus*. (ATCC 34140) Crecimiento. Colonia no pigmentada
- 3) No inoculado. No crecimiento

Fermentación glucosa (levaduras)

- 1) *C. albicans* (ATCC 14053) Control positivo
- 2) *C. lypolytica* (ATCC 9773) Control negativo

Fermentación maltosa (levaduras)

- 1) *C. albicans* (ATCC 14053) Control positivo
- 2) *C. lypolytica* (ATCC 9773) Control negativo

Fermentación sacarosa (levaduras)

- 1) *C. tropicalis* (ATCC 13803) Control positivo
- 2) *C. albicans* (ATCC 14053) Control negativo

Fermentación lactosa (levaduras)

- 1) *C. kefir* (ATCC 28838) Control positivo
- 2) *C. albicans* (ATCC 14053) Control negativo

Fermentación galactosa (levaduras)

- 1) *C. albicans* (ATCC 14053) Control positivo
- 2) *C. lypolytica* (ATCC 9773) Control negativo

Fermentación trehalosa (levaduras)

- 1) *C. albicans* (ATCC 14053) Control positivo
- 2) *C. lypolytica* (ATCC 9773) Control negativo

Fermentación celobiosa (levaduras)

- 1) *C. lusitanae*.(ATCC 24347) Control positivo
- 2) *C. tropicalis* (ATCC 13803) Control negativo

Servicio de Microbiología Hospital.....	Diagnóstico micológico por cultivo convencional	PNT-MIC-05	
		Edición Nº 01	Página 7 de 7

10. RESPONSABILIDADES

Deben estar descritas en el manual general de organización del laboratorio de micología y en las fichas de descripción de los puestos de trabajo.

El procedimiento deberá llevarse a cabo por personal técnico cualificado con un entrenamiento específico. La supervisión de la técnica y de los resultados emitidos deberá realizarla el facultativo especialista responsable del laboratorio de micología.

11. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

Todo el personal del laboratorio de microbiología deberá conocer las normas generales de seguridad e higiene. Estas recomendaciones deberán estar recogidas en un documento establecido por el laboratorio de Microbiología.

Los aislamientos con sospecha de que pudieran ser hongos dimórficos de nivel 3 de seguridad deben ser trasladados, evitando la apertura de los tubos de cultivo, a un laboratorio de seguridad, donde se realizará la identificación.

12. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

La identificación de hongos dimórficos queda reducida a los laboratorios que dispongan de instalaciones de seguridad para el manejo de microorganismos de nivel 3.

La implicación de un número creciente de especies fúngicas en infecciones oportunistas hacen que no se disponga, en ocasiones, de la experiencia adecuada para la identificación de determinadas especies potencialmente patógenas. En estos casos, las cepas sospechosas deberán ser remitidas a un centro de referencia.

13. BIBLIOGRAFÍA

1. De Hoog GS, Guarro J. 2000. Atlas of clinical fungi. Centralbureau voor Schimmelcultures/ Universitat Rovira y Virgili. Baarn and Delf, The Netherlands, Universitat Rovira y Virgili, Reus, Spain
2. Larone DH. Medically important fungi. A guide to identification. 1995. Third edition. ASM Press. Washington D.C.
3. Merz WG, Roberts GD. 1999. Detection and recovery of fungi from clinical specimens, p. 588-600. *In* R. H. Yolken (ed.), Manual of Clinical Microbiology. American Society for Microbiology, Washington D.C.
4. Pemán J, Martín Mazuelos E, Rubio MC. 2006. Guía práctica de identificación y diagnóstico en Micología Clínica, 2 ed. Revista Iberoamericana de Micología, Bilbao.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Identificación de levaduras mediante medios de cultivo cromogénicos	PNT-MIC-06	
		Edición Nº 01	Página 2 de 2

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

Definir la metodología para la identificación de levaduras del género *Candida* utilizando medios de cultivo cromogénicos.

2. FUNDAMENTO

La identificación de la especie de toda levadura aislada en sangre u otro líquido corporal estéril está plenamente justificada. Sin embargo, debido a que las levaduras forman parte de la flora normal de piel y mucosas, su aislamiento en muestras nasofaríngeas, esputo, lavados bronquiales, orina, raspados de uñas, muestras vaginales o heces puede cuestionar su significado clínico. No obstante, el aislamiento reiterado en diferentes muestras clínicas del mismo paciente, es sugestivo de infección y requiere la identificación de la especie causal.

Los medios de cultivo cromogénicos están diseñados para el aislamiento e identificación de algunas especies del género *Candida* tras su incubación a 30-37 °C durante 24-48 horas. Su fundamento consiste en la detección de determinadas actividades enzimáticas de las levaduras mediante la hidrólisis específica de un sustrato cromogénico en presencia de un indicador de la enzima. Pueden utilizarse para aislamiento primario o, con fines de identificación, después del aislamiento de las levaduras en los medios convencionales. Sólo debería utilizarse como medio de aislamiento primario en aquellas muestras con alta sospecha de micosis por levaduras. Uno de las principales ventajas de estos medios es permitir diferenciar fácilmente los cultivos mixtos. Entre los más utilizados se encuentran:

CHROMAGAR CANDIDA (CHROMagar Company) identifica *C. albicans* (colonias verdes), *C. tropicalis* (azules), *C. krusei* (rosas secas) y *C. glabrata* (rosas mucosas).

COLOREX CANDIDA (BioMed) identifica *C. albicans* (colonias verdes), *C. tropicalis* (azules- grisáceas), *C. glabrata* (rosas oscuro) y *C. krusei* (rosas rizadas).

CANDIDA ID2 (bioMérieux) identifica *C. albicans* (azules).

CANDISELECT (BioRad) identifica *C. albicans* (azules).

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC nº 10 de "Seguridad en el laboratorio de microbiología clínica", 2000.

- Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC nº 1a de "Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el laboratorio de microbiología", 2003.

4. MUESTRAS

Todo tipo de de muestras clínicas: exudados, secreciones respiratorias, líquidos orgánicos, orina, sangre, biopsias, etc.

5. REACTIVOS Y PRODUCTOS

- Asas de siembra
- Pipetas estériles

6. APARATOS Y MATERIALES

- Estufa de 37°C

7. PROCESAMIENTO Y REALIZACIÓN DE LA TÉCNICA

- Inocular el medio de cultivo
- Incubar 48 h a 37°C
- Examinar la coloración de las colonias

8. OBTENCIÓN, INTERPRETACIÓN Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

Identificar la especie en función del color de la colonia, siguiendo las indicaciones del fabricante.

9. RESPONSABILIDADES

Deben estar descritas en el manual general de organización del laboratorio de micología y en las fichas de descripción de los puestos de trabajo.

El procedimiento deberá llevarse a cabo por personal cualificado con un entrenamiento específico. La supervisión de la técnica y de los resultados emitidos deberá realizarla el facultativo especialista responsable del laboratorio de micología.

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

Todo el personal del laboratorio de microbiología deberá conocer las normas generales de seguridad e higiene. Estas recomendaciones deberán estar recogidas en un documento establecido por el laboratorio de microbiología.

Es preferible que la siembra de las muestras se realice en una cabina de flujo laminar con capacidad de proteger al personal que manipula la muestra.

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Las colonias de levaduras con diferente color al indicado por el fabricante del medio deben identificarse con otra metodología (asimilación de nutrientes, sistemas enzimáticos, criterios inmunológicos, etc.)

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Clinical microbiology procedures handbook. 2ª edición. Editor HD Isenberg. 2005. ASM. Washington DC, USA.
2. Freydière AM, Guinet R, Boiron P. Yeast identification in the clinical microbiology laboratory: phenotypical methods. Medical Mycology 2001; 39:9-33.
3. Godoy P, Almeida LP, Lopes-Colombo A. Identification of *Candida albicans* using the chromogenic medium Albicans ID. Rev Iberoam Micol. 2001; 18:197-199.
4. Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Jorgensen JH, Tenover FC (eds). Manual of Clinical Microbiology. 8ª ed. ASM. Washington DC. 2003.
5. Pemán J, Martín Mazuelos E, Rubio MC. (Eds). Guía práctica de identificación y diagnóstico en Micología Clínica. 2ª edición. Bilbao: Revista Iberoamericana de Micología, 2006.
6. Sahand IH, Moragues MD, Eraso E, Villar-Vidal M, Quindos G, Ponton J. Supplementation of CHROMagar *Candida* medium with Pal's medium for rapid identification of *Candida dubliniensis*. J Clin Microbiol 2005; 43:5768-5770.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Identificación de levaduras mediante sistemas enzimáticos	PNT-MIC-07	
		Edición Nº 01	Página 2 de 2

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

Definir la metodología para la identificación de levaduras utilizando sistemas enzimáticos comercializados.

2. FUNDAMENTO

La identificación de la especie de toda levadura aislada en sangre o en cualquier otro líquido corporal estéril está plenamente justificada. Sin embargo, debido a que los organismos levaduriformes forman parte de la flora normal de piel y mucosas, el aislamiento de levaduras a partir de hisopos nasofaríngeos, esputo, lavados bronquiales, orina, raspados de uñas, muestras vaginales o heces puede cuestionar su significado clínico. No obstante, el aislamiento reiterado de levaduras en diferentes muestras clínicas del mismo paciente, es sugestivo de infección por el microorganismo aislado y requiere la identificación de la especie causal.

En el mercado existen varios sistemas enzimáticos para la identificación rápida de *Candida albicans* (Bactocard Candida, Remel) y *Candida glabrata* (Glabrata RTTI, Fumouze), a partir de una colonia aislada en cualquiera de los medios convencionales, en menos de 20 minutos.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC nº 10 de "Seguridad en el laboratorio de microbiología clínica", 2000.
- Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC nº 1a de "Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el laboratorio de microbiología", 2003.

4. MUESTRAS

Cualquier cultivo de levadura en medio sólido.

5. REACTIVOS Y PRODUCTOS

Asas de siembra
Pipetas estériles

6. APARATOS Y MATERIALES

Kit comercial de la técnica

7. PROCESAMIENTO

7.1. REALIZACIÓN DE LA TÉCNICA

Se deben seguir las instrucciones del fabricante

8. OBTENCIÓN, INTERPRETACIÓN Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

Identificar la especie en función del resultado de la técnica.

9. RESPONSABILIDADES

Deben estar descritas en el manual general de organización del laboratorio de micología y en las fichas de descripción de los puestos de trabajo.

El procedimiento deberá llevarse a cabo por personal cualificado con un entrenamiento específico. La supervisión de la técnica y de los resultados emitidos deberá realizarla el facultativo especialista responsable del laboratorio de micología.

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

Todo el personal del laboratorio de microbiología deberá conocer las normas generales de seguridad e higiene. Estas recomendaciones deberán estar recogidas en un documento establecido por el laboratorio de Microbiología.

Es preferible que la inoculación de estos sistemas se realice en una cabina de flujo laminar con capacidad de proteger al personal que manipula la muestra.

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Las indicadas por el fabricante para cada técnica

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Clinical microbiology procedures handbook. 2ª edición. Editor HD Isenberg. 2005. American Society for Microbiology. Washington DC, USA.
2. Freydière AM, Guinet R, Boiron P. Yeast identification in the clinical microbiology laboratory: phenotypical methods. Medical Mycology 2001; 39:9-33.
3. Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Jorgensen JH, Tenover FC (eds). Manual of Clinical Microbiology. 8ª ed. American Society for Microbiology. Washington DC. 2003.
4. Pemán J, Aparisi N, García-Esteban C, Gobernado M. Rapid identification of *Candida glabrata* using a new commercial kit. Rev Iberoam Micol 2004; 21:82-84.
5. Pemán J, Martín Mazuelos E, Rubio MC. (Eds). Guía práctica de identificación y diagnóstico en Micología Clínica. 2ª edición. Bilbao: Revista Iberoamericana de Micología, 2006.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Identificación de levaduras mediante asimilación de nutrientes. Métodos comerciales.	PNT-MIC-08	
		Edición Nº 01	Página 2 de 2

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

Definir la metodología para la identificación de levaduras utilizando sistemas de asimilación de nutrientes comercializados.

2. FUNDAMENTO

La identificación de la especie de toda levadura aislada en sangre o en cualquier otro líquido corporal estéril está plenamente justificada. Sin embargo, debido a que los organismos levaduriformes forman parte de la flora normal de piel y mucosas, el aislamiento de levaduras a partir de hisopos nasofaríngeos, esputo, lavados bronquiales, orina, raspados de uñas, muestras vaginales o heces puede cuestionar su significado clínico. No obstante, el aislamiento reiterado de levaduras en diferentes muestras clínicas del mismo paciente, es sugestivo de infección por el microorganismo aislado y requiere la identificación de la especie causal.

En el mercado existen varios sistemas para la identificación de levaduras mediante asimilación de nutrientes a partir de una colonia aislada en cualquiera de los medios convencionales. Se fundamentan en la utilización por separado de diferentes nutrientes, hidrocarbonados o nitrogenados apreciando el crecimiento selectivo en presencia de los nutrientes necesarios para su desarrollo.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC nº 10 de "Seguridad en el laboratorio de microbiología clínica", 2000.
- Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC nº 1a de "Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el laboratorio de microbiología", 2003.

4. MUESTRAS

Cualquier cultivo de levadura en medio sólido.

5. REACTIVOS Y PRODUCTOS

- Asas de siembra
- Pipetas estériles

6. APARATOS Y MATERIALES

- Kit comercial de la técnica
- Estufa de 37°C

7. PROCESAMIENTO

7.1. REALIZACIÓN DE LA TÉCNICA

Seguir las instrucciones del fabricante

8. OBTENCIÓN, INTERPRETACIÓN Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

Informar los resultados en función de la especie identificada.

9. RESPONSABILIDADES

Deben estar descritas en el manual general de organización del laboratorio de micología y en las fichas de descripción de los puestos de trabajo.

El procedimiento deberá llevarse a cabo por personal cualificado con un entrenamiento específico. La supervisión de la técnica y de los resultados emitidos deberá realizarla el facultativo especialista responsable del laboratorio de micología.

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

Todo el personal del laboratorio de microbiología deberá conocer las normas generales de seguridad e higiene. Estas recomendaciones deberán estar recogidas en un documento establecido por el laboratorio de Microbiología.

Es preferible que la inoculación de los diferentes sistemas se realice en una cabina de flujo laminar con capacidad de proteger al personal que manipula la muestra.

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Estos métodos deben acompañarse de pruebas adicionales (fundamentalmente morfológicas) para la correcta identificación de la especie (ver PNT-MIC-05 de este procedimiento).

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Clinical microbiology procedures handbook. 2ª edición. Editor HD Isenberg. 2005. American Society for Microbiology. Washington DC, USA.
2. Freydière AM, Guinet R, Boiron P. Yeast identification in the clinical microbiology laboratory: phenotypical methods. Medical Mycology 2001; 39:9-33.
3. Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Jorgensen JH, Tenover FC (eds). Manual of Clinical Microbiology. 8ª ed. American Society for Microbiology. Washington DC. 2003.
4. Pemán J, Martín Mazuelos E, Rubio MC. (Eds). Guía práctica de identificación y diagnóstico en Micología Clínica. 2ª edición. Bilbao: Revista Iberoamericana de Micología, 2006.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Identificación de levaduras mediante criterios inmunológicos	PNT-MIC-09	
		Edición Nº 01	Página 2 de 2

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

Definir la metodología para la identificación rápida de levaduras utilizando métodos inmunológicos comercializados.

2. FUNDAMENTO

La identificación de la especie de toda levadura aislada en sangre o en cualquier otro líquido corporal estéril está plenamente justificada. Sin embargo, debido a que los organismos levaduriformes forman parte de la flora normal de piel y mucosas, el aislamiento de levaduras a partir de hisopos nasofaríngeos, esputo, lavados bronquiales, orina, raspados de uñas, muestras vaginales o heces puede cuestionar su significado clínico. No obstante, el aislamiento reiterado de levaduras en diferentes muestras clínicas del mismo paciente, es sugestivo de infección por el microorganismo aislado y requiere la identificación de la especie causal.

En el mercado existen varios sistemas para la identificación rápida de levaduras mediante métodos inmunológicos a partir de una colonia aislada en cualquiera de los medios convencionales. Se fundamentan en la técnica de aglutinación con partículas de látex mediante anticuerpos monoclonales específicos.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC nº 10 de "Seguridad en el laboratorio de microbiología clínica", 2000.
- Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC nº 1a de "Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el laboratorio de microbiología", 2003.

4. MUESTRAS

Cualquier cultivo de levadura en medio sólido.

5. REACTIVOS Y PRODUCTOS

- Asas de siembra
- Pipetas estériles

6. APARATOS Y MATERIALES

- "Kit" comercial de la técnica.

7. PROCESAMIENTO

7.1. REALIZACIÓN DE LA TÉCNICA

Seguir las instrucciones del fabricante.

8. OBTENCIÓN, INTERPRETACIÓN Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

Informar los resultados en función de la especie identificada.

9. RESPONSABILIDADES

Deben estar descritas en el manual general de organización del laboratorio de micología y en las fichas de descripción de los puestos de trabajo.

El procedimiento deberá llevarse a cabo por personal cualificado con un entrenamiento específico. La supervisión de la técnica y de los resultados emitidos deberá realizarla el facultativo especialista responsable del laboratorio de micología.

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

Todo el personal del laboratorio de microbiología deberá conocer las normas generales de seguridad e higiene. Estas recomendaciones deberán estar recogidas en un documento establecido por el laboratorio de microbiología.

Es preferible que la técnica se realice en una cabina de flujo laminar con capacidad de proteger al personal que manipula la muestra.

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Las indicadas para cada técnica por el fabricante.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Clinical microbiology procedures handbook. 2ª edición. Editor HD Isenberg. 2005. American Society for Microbiology. Washington DC, USA.
2. Freydière AM, Guinet R, Boiron P. Yeast identification in the clinical microbiology laboratory: phenotypical methods. Medical Mycology 2001; 39:9-33.
3. Marot-Leblond A, Beucher B, David S, Nail-Billaud S, Robert R. Development and evaluation of a rapid latex agglutination test using a monoclonal antibody to identify *Candida dubliniensis* colonies. J Clin Microbiol 2006; 44:138-142.
4. Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Jorgensen JH, Tenover FC, Tenover FC (eds). Manual of Clinical Microbiology. 8ª ed. American Society for Microbiology. Washington DC. 2003.
5. Pemán J, Martín Mazuelos E, Rubio MC. (Eds). Guía práctica de identificación y diagnóstico en Micología Clínica. 2ª edición. Bilbao: Revista Iberoamericana de Micología, 2006.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Pruebas de diagnóstico rápido y no convencional de las micosis invasoras	PNT-MIC-10	
		Edición Nº 01	Página 2 de 5

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

Definir la metodología para la realización del diagnóstico de la infección fúngica invasora utilizando métodos independientes del cultivo.

Se describe qué muestras son las más adecuadas en función de los microorganismos que se vayan a detectar y en función de la técnica que se vaya a realizar.

2. FUNDAMENTO

En muchas ocasiones, las precarias condiciones de los pacientes con micosis sistémicas desaconsejan la obtención de muestras profundas o no permiten esperar el tiempo necesario para el aislamiento y posterior identificación del agente causal. Por ello, se han desarrollado métodos alternativos al cultivo que pueden proporcionar al clínico información rápida y fiable ante la sospecha de una micosis invasora. Entre estos métodos destacan la detección de antígenos, anticuerpos y componentes fúngicos no antigénicos. Algunas técnicas serológicas ya se han convertido en herramientas básicas en el laboratorio de microbiología clínica actual, como la detección del antígeno capsular de *Cryptococcus neoformans*, la detección de antígeno galactomanano en pacientes con aspergilosis invasora, la detección antígeno manano y/o anticuerpos anti-manano así como la detección de anticuerpos anti-micelio para el estudio de la candidiasis invasora y de otros componentes no antigénicos [(1→3)-β-D-glucano] para el estudio de todas las micosis invasoras en general (excepto criptococosis y mucormicosis).

Algunos de estos procedimientos están descritos en el Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC nº 19 de "Técnicas rápidas de detección de antígeno", 2005, en el PNT-TDA-07, por lo que referimos al lector a dicho documento.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC nº 10 de "Seguridad en el laboratorio de microbiología clínica", 2000.
- Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC nº 1a de "Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el laboratorio de microbiología", 2003.
- Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC nº 19 de "Técnicas rápidas de detección de antígeno". PNT-TDA-07: técnicas rápidas de detección de antígeno en las micosis invasoras. 2005.
- Pemán J, Martín Mazuelos E, Rubio MC. (Eds). Guía práctica de identificación y diagnóstico en Micología Clínica. 2ª edición. Bilbao: Revista Iberoamericana de Micología, 2006.

4. MUESTRAS

4.1. RECOGIDA Y CONSERVACIÓN DE LA MUESTRA:

Se recogerán según se indica en el Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC nº 1a de

"Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el laboratorio de microbiología". PNT-RTP-01. 2003.

4.2. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS:

4.2.1. Tratamiento de muestras para la detección de *Cryptococcus neoformans*:

Seguir las instrucciones del fabricante. El procedimiento está descrito en el Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC nº 19 de "Técnicas rápidas de detección de antígeno". PNT-TDA-07: técnicas rápidas de detección de antígeno en las micosis invasoras. 2005..

4.2.2. Tratamiento de la muestra para la detección de *Aspergillus spp.*:

Seguir las instrucciones del fabricante. El procedimiento está descrito en el Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC nº 19 de "Técnicas rápidas de detección de antígeno". PNT-TDA-07: técnicas rápidas de detección de antígeno en las micosis invasoras. 2005.

4.2.3. Tratamiento de las muestras para la detección de *Candida spp.*:

4.2.3.1. Detección del antígeno manano:

Seguir las instrucciones del fabricante. El procedimiento está descrito en el Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC nº 19 de "Técnicas rápidas de detección de antígeno". PNT-TDA-07: técnicas rápidas de detección de antígeno en las micosis invasoras. 2005.

4.2.3.2. Detección de anticuerpos anti-manano:

Seguir las indicaciones del fabricante. Brevemente, diluir el suero a estudiar realizando dos diluciones sucesivas 1:81 (10 µl del suero + 800 µl de diluyente). Se realiza la misma operación con los controles positivo y negativo y se preparan los calibradores para la realización de la curva patrón.

4.2.3.3. *Candida albicans*. Detección de anticuerpos anti-micelio:

Seguir las indicaciones el fabricante. Brevemente:

La existencia de anticuerpos antimanano en la mayoría de las personas hace que casi todos los sueros contengan anticuerpos que reaccionan con la superficie de las fases levaduriforme y micelial de *C. albicans*. Para poder observar la existencia de anticuerpos frente a la fase micelial (anticuerpos antimicelio), el suero debe absorberse con levaduras de la especie *C. albicans* inactivadas por calentamiento.

- Diluir el suero 1/4 mezclando 10 µl del suero y 30 µl de PBS. Añadir 20 µl del suero diluido a un tubo con 80 µl de absorbente. Agitar bien e incubar 60 min a temperatura ambiente en un agitador orbital.
- Centrifugar a 2.600 rpm 5 minutos y retirar el sobrenadante.
- Realizar diluciones seriadas del suero absorbido mezclando 30 µl del suero y 30 µl de PBS.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Pruebas de diagnóstico rápido y no convencional de las micosis invasoras	PNT-MIC-10	
		Edición N° 01	Página 3 de 5

4.2.3.4. Detección de otros componentes fúngicos:

(1→3)-β-D-glucano:

Seguir las instrucciones del fabricante. El procedimiento está descrito en el Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC n° 19 de "Técnicas rápidas de detección de antígeno". PNT-TDA-07: técnicas rápidas de detección de antígeno en las micosis invasoras. 2005.

4.2.4. Tratamiento de la muestra para la detección de *Pneumocystis jiroveci*:

Seguir las instrucciones del fabricante. El procedimiento está descrito en el Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC n° 19 de "Técnicas rápidas de detección de antígeno". PNT-TDA-07: técnicas rápidas de detección de antígeno en las micosis invasoras. 2005.

5. REACTIVOS Y PRODUCTOS

Los reactivos específicos están incluidos en los equipos comercializados.

6. APARATOS Y MATERIALES

El equipamiento necesario para la realización de las técnicas descritas de detección de antígeno criptocócico, galactomanano, *P. jiroveci*, y manano de *Candida*, incluyendo el tratamiento de las muestras se describe en el Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC n° 19 de "Técnicas rápidas de detección de antígeno". PNT-TDA-07: técnicas rápidas de detección de antígeno en las micosis invasoras. 2005.

- Material necesario para la detección de anticuerpos anti-manano:

- Pipetas de 20, 100 y 400 µl.
- Tubos para realizar diluciones.
- Agitador para tubos.
- Baño o estufa para incubar las muestras a 37°C.
- Lavador de microplacas.
- Lector de microplacas equipado con filtros de 450 y 620 nm.

- Material necesario para la detección de anticuerpos anti-micelio de *Candida albicans*:

- Micropipetas de 5, 20 y 250 µl.
- Pipetas Pasteur estériles.
- Tubos o placas de microtitulación para realizar diluciones seriadas.
- Centrífuga para tubos Eppendorf que permita la centrifugación a 2.000 rpm.
- Agitador orbital para tubos.
- Estufa para incubar las muestras a 37°C.
- Cámara húmeda.
- Cubreobjetos.
- Microscopio de fluorescencia.

- Material necesario para la detección de glucano:

- Tampón de reconstitución Pyrosol.
- Patrón (1→3)-β-D-glucano.
- Agua destilada (libre de endotoxinas y β-glucano).
- KOH 0,25 N
- KCl 1,2 N.
- Microplaca de 96 pocillos.
- Lector de microplacas con software apropiado.

7. PROCESAMIENTO

7.1. DETECCIÓN DE ANTÍGENO CRIPTOCÓCICO:

Seguir las instrucciones del fabricante. El procesamiento está descrito en el Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC n° 19 de "Técnicas rápidas de detección de antígeno". PNT-TDA-07: técnicas rápidas de detección de antígeno en las micosis invasoras. 2005.

7.2. TÉCNICA PARA LA DETECCIÓN DE GALACTOMANANO:

Seguir las instrucciones del fabricante. El procesamiento está descrito en el Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC n° 19 de "Técnicas rápidas de detección de antígeno". PNT-TDA-07: técnicas rápidas de detección de antígeno en las micosis invasoras. 2005.

7.3. TÉCNICA DE DETECCIÓN DE *CANDIDA* SPP.:

Seguir las instrucciones del fabricante. El procesamiento está descrito en el Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC n° 19 de "Técnicas rápidas de detección de antígeno". PNT-TDA-07: técnicas rápidas de detección de antígeno en las micosis invasoras. 2005.

7.3.1. Detección de manano:

Seguir las instrucciones del fabricante. El procesamiento está descrito en el Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC n° 19 de "Técnicas rápidas de detección de antígeno". PNT-TDA-07: técnicas rápidas de detección de antígeno en las micosis invasoras. 2005.

7.3.2. Detección de anticuerpos anti-manano en suero:

Seguir las instrucciones del fabricante. Brevemente:

- Diluir el suero a estudiar realizando dos diluciones sucesivas 1:81 (10 µl del suero + 800 µl de diluyente). Se realiza la misma operación con los controles positivo y negativo y se preparan los calibradores para la realización de la curva patrón.
- Añadir 100 µl de cada uno de los sueros diluidos en su pocillo. En pocillos diferentes, se añaden también 100 µl de los sueros negativo y positivo, así como de los calibradores para la realización de la curva patrón.
- Cubrir los pocillos con plástico adhesivo y se incuban a 37°C durante 60 minutos.
- Lavar los pocillos 4 veces rellenándolos cada vez con 370 µl de la solución de lavado y secar los pocillos invirtiéndolos sobre papel de filtro.
- Añadir 100 µl del conjugado a cada uno de los pocillos.
- Cubrir los pocillos con plástico adhesivo e incubar a 37°C durante 60 minutos.
- Lavar los pocillos 4 veces rellenándolos cada vez con 370 µl de la solución de lavado y secar los pocillos invirtiéndolos sobre papel de filtro.
- Añadir 200 µl de la solución de revelado a cada uno de los pocillos e incubar en la oscuridad, a temperatura ambiente, durante 30 minutos.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Pruebas de diagnóstico rápido y no convencional de las micosis invasoras	PNT-MIC-10	
		Edición Nº 01	Página 4 de 5

- Añadir 100 µl de la solución de parada a cada pocillo, utilizando el mismo orden que se siguió para añadir la solución de revelado.

- Limpiar el fondo de los pocillos y leer la densidad óptica a 450 nm utilizando un lector de placas. Esto debe hacerse dentro de los 30 minutos siguientes a realizarse la parada de la reacción.

7.3.3. Detección de anticuerpos anti-micelio de *Candida albicans*:

Seguir las instrucciones del fabricante. Brevemente:

La prueba es una técnica de inmunofluorescencia indirecta que detecta anticuerpos frente a antígenos del micelio de *C. albicans* y es útil en el diagnóstico y seguimiento de la candidiasis invasora. También puede dar resultados positivos en infecciones invasoras por *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii* y *C. dubliniensis*. La existencia de anticuerpos anti-manano en la mayoría de las personas hace que casi todos los sueros contengan anticuerpos que reaccionan con la superficie de las fases levaduriforme y micelial de *C. albicans*. Para poder observar la existencia de anticuerpos frente a la fase micelial (anticuerpos anti-micelio), el suero debe de absorberse con levaduras de *C. albicans* inviables por calentamiento.

- Dado que los portaobjetos de la prueba tienen 10 pocillos, se pueden estudiar ocho diluciones del suero en un portaobjetos. Añadir 20 µl de cada una de las diluciones del suero (1/20, 1/40, 1/80, 1/160, 1/320, 1/640, 1/1280 y 1/2560) a ocho pocillos del portaobjetos. En los dos pocillos restantes añadir 20 µl de los sueros control positivo y negativo proporcionados con el sistema comercializado.

- Incubar durante 30 minutos a 37°C en cámara húmeda.

- Lavar tres veces con PBS y dejar secar al aire o con una corriente de aire frío.

- Añadir 20 µl del anticuerpo secundario conjugado con FITC a todos los pocillos e incubar durante 30 minutos a 37°C en cámara húmeda.

- Lavar tres veces con PBS y dejar secar al aire o con una corriente de aire frío.

- Montar el portaobjetos con el líquido de montaje y examinar con un microscopio de fluorescencia.

7.3.4. Detección del (1→3)-β-1D-glucano:

Seguir las instrucciones del fabricante. El procesamiento está descrito en el Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC nº 19 de "Técnicas rápidas de detección de antígeno". PNT-TDA-07: técnicas rápidas de detección de antígeno en las micosis invasoras. 2005.

7.4 CONTROL DE CALIDAD:

Siguiendo las recomendaciones para el Control de Calidad Interno en Microbiología Clínica (CCI-SEIMC) realizado por el grupo de la SEIMC (GEGMIC), para los reactivos comerciales, debe solicitarse al fabricante que disponga de un Sistema de Calidad reconocido y que facilite al laboratorio los datos relativos a cada lote de reactivo. La mayoría de las técnicas comerciales disponen de controles

positivos y negativos para realizarlos cada vez que se utilice la técnica. Todos los centros deben participar también en los controles de calidad externos (SEIMC).

8. OBTENCIÓN, INTERPRETACIÓN Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

8.1. DETECCIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-MANANO:

Lectura e interpretación de los resultados: preparar la recta patrón utilizando los resultados de los calibradores. Calcular la concentración de anticuerpos anti-*Candida* de cada muestra por extrapolación de la densidad óptica en la curva patrón. En cada realización la prueba debe ser validada de acuerdo a las densidades ópticas y rangos proporcionados por el fabricante. La interpretación de los resultados será la siguiente:

Resultado positivo: concentración superior a 10 AU/ml.

Resultado intermedio: concentración entre 5 y 10 AU/ml.

Resultado negativo: concentración inferior a 5 AU/ml.

8.2. DETECCIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-MICELIO:

Interpretación de los resultados: al observar la muestra al microscopio, la fluorescencia puede localizarse en la silueta e interior de los tubos germinales. Esta reactividad recibe la denominación 1. Cuando sólo se ve positiva la silueta del tubo germinal, la reactividad recibe la denominación 0,8. Si la silueta de los tubos germinales es positiva, pero algunos tubos germinales no se definen bien, la reactividad recibe la denominación 0,5. Si se aprecia que los tubos germinales son positivos, pero la reactividad es muy débil, se denomina 0,2. Finalmente, si ninguno de los tubos germinales presenta fluorescencia, la reactividad se denomina 0. El título del suero será la última dilución del suero que registre valores de intensidad de fluorescencia ≥ 0,8. Las levaduras no deben de presentar fluorescencia y aparecerán de color rojo. En el caso de que las levaduras presenten fluorescencia, el suero probablemente tiene títulos muy elevados de anticuerpos anti-manano y, por tanto, el suero absorbido la primera vez debe de absorberse de nuevo y repetirse la prueba. La presencia de anticuerpos antimicelio a un título igual o superior a 160 es compatible con una candidiasis invasora en un paciente inmunocompetente. Pueden ser significativos títulos menores en pacientes inmunocomprometidos. Si no se observan tubos germinales fluorescentes la prueba se considera negativa.

8.3. PARA EL RESTO DE DETECCIONES DE ANTÍGENO

El procedimiento se encuentra descrito en el Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC nº

Servicio de Microbiología Hospital.....	Pruebas de diagnóstico rápido y no convencional de las micosis invasoras	PNT-MIC-10	
		Edición N° 01	Página 5 de 5

19 de "Técnicas rápidas de detección de antígeno". PNT-TDA-07: técnicas rápidas de detección de antígeno en las micosis invasoras. 2005.

9. RESPONSABILIDADES

El personal técnico de la sección será el responsable de revisar las solicitudes estudiando la idoneidad de la muestra remitida con la determinación solicitada, del tratamiento de las muestras, de la realización de las técnicas y de la validación de los resultados en función de los resultados de los controles.

El facultativo especialista responsable de la sección, además de la supervisión de las tareas citadas, será responsable de mantener al día los procedimientos, de la validación final de los resultados, su interpretación y el informe final de los mismos.

El personal debe conocer las ventajas y limitaciones de las técnicas rápidas, así como el funcionamiento de todas las técnicas y del funcionamiento de los aparatos. Además debe de trabajar en condiciones de máxima seguridad personal y ambiental.

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

10.1. DETECCIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-MANANO:

Los sueros con concentraciones superiores a 20 AU/ml deben diluirse 1:4 con el suero control negativo y volverse a estudiar. La concentración obtenida se multiplicará por cuatro. La presencia de anticuerpos anti-*Candida* es el resultado de una infección presente o pasada. Una variación importante en el título de anticuerpos anti-*Candida* puede constituir una evidencia de infección activa por *Candida* y debe de confirmarse con los datos clínicos del paciente. Un resultado negativo no excluye el diagnóstico de candidiasis invasora en pacientes inmunocomprometidos, ya que su capacidad para producir anticuerpos puede estar disminuida. Se ha demostrado la existencia de una complementariedad entre los títulos de anticuerpos anti-manano y los títulos de manano, por lo que un suero de un paciente con riesgo de desarrollar una candidiasis invasora que no tenga manano puede tener títulos elevados de anticuerpos anti-manano y viceversa.

Reduciendo el punto de corte a 5 AU/ml, Prella et al (2005), han detectado manano en 22/28 pacientes (79%) con candidiasis invasora. Cuando los resultados de la detección de manano se combinaron con los de la detección de anticuerpos antimanano, obtuvieron una sensibilidad de 89%, una especificidad del 84%, un valor predictivo positivo del 86% y un valor predictivo negativo del 88%.

10.2. DETECCIÓN DE ANTICUERPOS ANTIMICELIO:

Si se van a estudiar varios sueros, se debe probar primero la dilución 1/20 de cada suero y titular posteriormente sólo los que sean positivos a esa dilución.

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

La detección de antígenos, anticuerpos y productos de síntesis fúngica tiene sensibilidades y especificidades que dependen de la población para la que se han diseñado los estudios y los resultados no son extrapolables para otras poblaciones.

Las técnicas de detección de manano y antimanano, utilizadas conjuntamente, mejoran la sensibilidad diagnóstica global, aunque su ésta sigue siendo insuficiente.

Las técnicas de detección de anticuerpos anti-micelio pueden resultar negativas en el caso de pacientes con fungemia.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Clinical microbiology procedures handbook. 2ª edición. Editor HD Isenberg. 2005. American Society for Microbiology. Washington DC, USA.
2. Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Jorgensen JH, Tenover FC, Tenover FC (eds). Manual of Clinical Microbiology. 8ª ed. American Society for Microbiology. Washington DC. 2003.
3. Odabasi Z, Mattiuzzi G, Estey E, Kantarjian H, Saeki F, Ridge RJ, Ketchum PA, Finkelman MA, Rex JH, Ostrosky-Zeichner L. β -D glucan as a diagnostic adjunct for invasive fungal infections: validation, cutoff, development, and performance in patients with acute myelogenous leukemia and myelodysplastic syndrome. Clin Infect Dis 2004;39:199-205.
4. Pazos C, Pontón J, del Palacio A. Contribution of (1 \rightarrow 3)- β -D-glucan chromogenic assay to diagnosis and therapeutic monitoring of invasive aspergillosis in neutropenic adult patients: a comparison with serial screening for circulating galactomannan. J Clin Microbiol 2005;43:299-305.
5. Prella M, Bille J, Pugnale M, Duvoisin B, Cavassini M, Calandra T, Marchetti O. Early diagnosis of invasive candidiasis with mannan antigenemia and antimannan antibodies. Diagn Microbiol Infect Dis 2005;51:95-101.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Prueba de sensibilidad a los antifúngicos. Microdilución en caldo	PNT-MIC-11	
		Edición N° 01	Página 2 de 8

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

Definir la metodología para realizar pruebas de sensibilidad *in vitro* a los antifúngicos de levaduras y de hongos filamentosos, mediante técnicas de microdilución en caldo.

Este procedimiento es aplicable a todos los laboratorios de microbiología clínica que posean la dotación y experiencia adecuada para el manejo de estos microorganismos y de las técnicas de determinación de la sensibilidad *in vitro* de los mismos.

2. FUNDAMENTO

Existen varias técnicas de referencia para realizar pruebas de sensibilidad a los antifúngicos. Las técnicas del CLSI y del EUCAST son las más difundidas y de las que se disponen más estudios de validación. Estas pruebas determinan la CMI de los antifúngicos mediante la dilución en caldo RPMI con o sin glucosa, frente a levaduras y hongos filamentosos.

La realización de estas técnicas está indicada en aquellos casos en los que se crea que la determinación de la sensibilidad a los antifúngicos puede ayudar a elegir la mejor alternativa terapéutica. Estas pruebas son de especial utilidad en cepas procedentes de enfermos en los que se ha producido un fracaso terapéutico y en casos de pacientes que han recibido profilaxis o tratamiento antifúngico previo. Además, pueden utilizarse para realizar estudios epidemiológicos periódicos, que ayuden a conocer la distribución de las especies y su sensibilidad en una institución concreta, y de esta forma, establecer los tratamientos empíricos más adecuados.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC nº 10 de "Seguridad en el laboratorio de microbiología clínica", 2000.
- UNE-EN-ISO 15189-03. Medical Laboratories. Particular requirements for quality and competence.
- EUCAST-AFST 2003. Method for determination of minimum inhibitory concentration (MIC) by broth dilution of fermentative species of yeasts. E. Dis 7.1 CMI. 2003, 9:1-8.
- EUCAST-AFST 2006. Method for the determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) by Broth Dilution of *Aspergillus* species. En prensa.
- CLSI M27-A2 2002. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard.
- CLSI M38-A 2002. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi.

4. MUESTRAS

Estas pruebas de sensibilidad pueden realizarse a cepas de levaduras y hongos filamentosos cultivadas en medio sólido. Las cepas deben estar en cultivo puro. Se deben utilizar subcultivos de no más de 24-

48 horas para las levaduras y de no más de 5-7 días para los hongos filamentosos.

5. REACTIVOS Y PRODUCTOS

- Caldo RPMI 1640 con L-glutamina y sin bicarbonato.
- Caldo RPMI 1640 con L-glutamina y sin bicarbonato con 2% de glucosa (alternativo).
- Ácido morfolinpropanosulfónico (MOPS).
- Sustancia valorada de anfotericina B, fluorocitosina, fluconazol, itraconazol, voriconazol, ketoconazol, caspofungina, micafungina, anidulafungina y posaconazol.
- Agua destilada estéril.
- Solución salina 0,85% estéril.
- Dimetilsulfóxido 100% (DMSO).
- Placas de agar Sabouraud glucosado.
- Tubos de agar patata glucosada.
- Tween 20.
- Criotecas y/o tubos para conservación de cepas
- Escala de MacFarland.
- Soluciones de verificación de pHmetro.

6. APARATOS Y MATERIALES

- Incubador de 35 ± 2°C.
- pHmetro.
- Neveras y congeladores.
- Agitador de placas de microtitulación.
- Espejo para lectura de placas.
- Espectrofotómetro para lectura de placas de microtitulación (alternativo).
- Nefelómetro o espectrofotómetro para tubos.
- Placas de microtitulación de 96 pocillos estériles con fondo redondeado en "U".
- Placas de microtitulación de 96 pocillos estériles con fondo plano (alternativo).
- Agitador rotatorio Vórtex.
- Tubos plástico estériles de 5 ml.
- Tubos de cristal tipo Bijoux de 3 ml.
- Filtros de 0,22 µm de diámetro de poro para unidades de filtración.
- Frascos de vidrio estériles con tapón de rosca y capacidad de 250, 500 y 1000 ml.
- Probetas de 250, 500 y 1000 ml de capacidad.
- Unidades de filtración de 500 ml en plástico autoclavables.
- Barras magnéticas de agitación.
- Hematocitómetros (Cámaras de Neubauer) (alternativo).
- Gradillas autoclavables para tubos de 5, 10 y 25 ml de capacidad.
- Cajas de plástico para puntas de micropipeta autoclavables.
- Cajas de plástico para incubación de las placas de microdilución estériles.
- Tubos de plástico de 50 ml tipo Falcon.
- Pipetas Pasteur estériles.
- Escobillones o torundas estériles.
- Micropipetas de volumen variable uni y multicanal.
- Puntas de micropipetas con filtro estériles.

7. PROCESAMIENTO

En este apartado se hará una breve descripción de las técnicas de referencia. No obstante, las instituciones que realicen estas pruebas deben disponer de los documentos en los que se describen las técnicas de referencia, que pueden obtenerse en www.nccls.org y en www.eucast.org.

7.1. REALIZACIÓN DE LAS PRUEBAS DE SENSIBILIDAD A LOS ANTIFÚNGICOS CON LEVADURAS

7.1.1. Preparación de los antifúngicos

- Las soluciones iniciales de los antifúngicos deben prepararse según la fórmula incluida en la figura 1, y deben obtenerse tomando en cuenta la potencia de la sustancia valorada y las concentraciones a las que se quieren preparar las placas para los estudios de sensibilidad.

Figura 1. Fórmula para preparación de las soluciones madre de antifúngicos

$$\text{Peso(mg)} = \frac{\text{Volumen(ml)} \times \text{Concentración } (\mu\text{g/ml})}{\text{Potencia}(\mu\text{g/mg})}$$

- Pesar, al menos, 100 mg de sustancia valorada en balanza de precisión, para disminuir al máximo los errores de pesado.
- Las soluciones madre deben prepararse a una concentración 100 veces superior a la concentración más elevada que se quiera incluir en el estudio de sensibilidad. En la tabla 1 se muestran las concentraciones a las que se recomienda preparar cada antifúngico.

Tabla 1. Resumen para la preparación de los antifúngicos en estudios de sensibilidad

Antifúngico	Disolvente	Concentración de la solución madre en mg/L	Intervalos de concentración recomendados en mg/L
Anfotericina B	DMSO	3.200	0,03-16
Fluorocitosina	DMSO, 50:50 acetona:agua o agua	12.800	0,125-64
Fluconazol	Agua	12.800	0,125-64
Itraconazol	DMSO	1.600	0,015-8
Voriconazol	DMSO	1.600	0,015-8
Ketoconazol	DMSO	1.600	0,015-8
Posaconazol	DMSO	1.600	0,015-8
Caspofungina	Agua	3.200	0,03-16
Micafungina	Suero salino 0,85%	3.200	0,03-16
Anidulafungina	DMSO	3.200	0,03-16

- Recordar que si se utiliza dimetilsulfóxido (DMSO), los tubos deben ser de vidrio.
- Habitualmente, no es necesario esterilizar las soluciones, pero si se tienen dudas sobre la esterilidad de la misma, pueden utilizarse filtros de membrana. No deben emplearse otros materiales ya que pueden absorber cantidades significativas del antifúngico.
- Los viales con las soluciones madre pueden conservarse a una temperatura de -70°C o inferior, pero no más de seis meses. Una vez descongelados los viales no deben recongelarse otra vez.

7.1.2. Preparación de las placas de microdilución

- Las placas deben ser de microdilución, estériles, con 96 pocillos de fondo plano en caso de utilizar el método EUCAST, y de fondo en "U" en caso de usar el del NCCLS.
- El medio de cultivo recomendado es RPMI 1640 con glutamina, sin bicarbonato y el pH debe ajustarse a 7,0, en el caso de seguir el método del CLSI, y complementado con glucosa al 2%, en caso de utilizar el método del EUCAST. Se aconseja preparar el medio a doble concentración, ya que tras la adición del inóculo se produce una dilución a la mitad.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Prueba de sensibilidad a los antifúngicos. Microdilución en caldo	PNT-MIC-11	
		Edición N° 01	Página 4 de 8

- El medio debe esterilizarse mediante filtración con filtros de 0,22 µm de poro. Nunca debe autoclavarse
- Se recomiendan dos formas diferentes de preparación según el tipo de antifúngico.
- Preparación de placas de antifúngicos hidrofílicos:
 - De esta forma se preparan las placas de fluconazol, de fluorocitosina, de caspofungina y de micafungina.
 - Para obtener los intervalos expuestos en la tabla 1, la solución madre debe diluirse 100 veces en RPMI 2x (con o sin glucosa al 2%).
 - Tras ello, se dispensan 200 µl de la solución de trabajo en la columna número 1 de la placa de microdilución. Las columnas 2 a la 12 se rellenan con 100 µl de RPMI 2x (con o sin glucosa) sin antifúngico.
 - A continuación, se toman 100 µl de la columna 1 y se transfieren a la columna 2. Luego, se toman 100 µl de la 2 (que ahora tiene 200 µl) y se pasan a la 3, y así hasta llegar a la columna 10.
 - Los últimos 100 µl recogidos en la columna 10 se desechan.
 - En las columnas 11 y 12 no se dispensa antifúngico, se añaden 100 µl en cada pocillo de RPMI 2x (con o sin glucosa), ya que se utilizarán como control de crecimiento (CC) y control de esterilidad (B).
- Preparación de placas de antifúngicos hidrofóbicos:
 - De esta forma se preparan las placas de anfotericina B, itraconazol, ketoconazol, voriconazol, posaconazol y anidulafungina
 - Se toma una alícuota de solución madre.
 - Se llenan 9 tubos más con 150 µl de DMSO. Recordar que los tubos deben de ser de vidrio.
 - Se toman 150 µl de la solución inicial del antifúngico y se hacen diluciones consecutivas 1:2, en los 9 tubos.
 - A continuación, se llenan 10 tubos tipo Falcon con 9,9 ml de RPMI 2x (con o sin glucosa).
 - Se traspasan 100 µl de cada uno de los tubos con diluciones dobles del antifúngico en DMSO, a los tubos Falcon con RPMI, obteniéndose diluciones 1:100 del antifúngico.
 - Tras ello, se dispensan 100 µl en la primera columna de la placa de microdilución del primer tubo Falcon, otros 100 µl en la segunda columna desde el segundo tubo Falcon, otros 100 µl en la tercera columna desde el tercer tubo Falcon, y así, hasta la columna 10.
 - En las columnas 11 y 12 se añaden 100 µl en cada pocillo de RPMI 2x (con o sin glucosa) sin antifúngico.
- Las placas pueden almacenarse a -70°C durante seis meses, a excepción de las placas con equinocandinas que deben ser utilizadas antes de dos meses. Si se decide conservar a -20°C, las placas no deben conservarse más de un mes, además las placas con polienos o con equinocandinas no deben conservarse a -20°C. Las

placas deben mantenerse selladas en plástico o papel aluminio mientras estén congeladas.

7.1.3. Preparación del inóculo

- Un día antes de hacer el estudio de sensibilidad, las levaduras se subcultivan en agar glucosado de Sabouraud o en agar glucosado de peptona. Se incuban 18-24 horas, a 35-37°C. Si son levaduras de crecimiento lento como *Cryptococcus neoformans*, puede ser necesario un subcultivo de 48 horas.
- El inóculo se prepara picando cinco colonias distintas, de 1 mm de diámetro, y resuspendiéndolas en 5 ml de agua destilada o de solución salina 0,85%.
- La suspensión se homogeniza con un agitador de sobremesa a 2.000 rpm, durante 15 segundos.
- El inóculo se ajusta a un 0,5 McFarland (mediante escala, turbidímetro o espectrofotómetro) con agua destilada o suero salino.
- Si se mide la densidad óptica en un espectrofotómetro a 530 nm (la densidad óptica será de 0,09-0,13), lo que equivale a una suspensión de levaduras de $1-5 \times 10^6$ cfu/ml.
- Por último, se hace una dilución 1:10 en agua destilada, preparando la suspensión de trabajo que tendrá $1-5 \times 10^5$ cfu/ml, en caso de seguir el método EUCAST. Si se sigue el método del CLSI, se hacen tres diluciones 1:10, obteniéndose una solución de trabajo de $1-5 \times 10^3$ cfu/ml.
- Deben hacerse recuentos periódicos en placa de agar glucosado de Sabouraud, para controlar la validez del tamaño del inóculo.

7.1.4. Inoculación e incubación de las placas

- En cada placa pueden testarse hasta ocho cepas, una por fila, recordando que en todas las placas debería incluirse, al menos, una cepa control de calidad.
- Cada pocillo es inoculado con 100 µl de las suspensiones de trabajo, por lo que todos los pocillos se diluyen a la mitad, de ahí la utilización del RPMI a doble concentración.
- La columna 11 también es inoculada con 100 µl, ya que es el control de crecimiento.
- A la columna 12 se añaden 100 µl de agua destilada, ya que es el control de esterilidad y el blanco.
- Las placas se incuban a 35-37°C en estufa con ambiente normal (sin CO₂), durante 24-48 horas. Puede utilizarse un cámara húmeda si se desea.
- La lectura válida es la de 24 horas en el caso del EUCAST. Si se sigue el método del CLSI, las placas se leen a 24 y a 48 horas, siendo la lectura de 48 horas la que debe tomarse como válida, salvo excepciones.
- En caso de cepas que no crecen a 35-37° C, pueden hacer las pruebas a 30°C, aunque deben validarse con cepas control de calidad y tomar los resultados con prudencia, ya que las pruebas no se han estandarizado a esta temperatura.

7.1.5. Control de calidad

El control de calidad se realiza siguiendo de forma similar al descrito en los documentos de referencia.

- Se recomienda hacer controles de los lotes de RPMI y del proceso de preparación de las placas de microdilución.
- Se recomienda mantener las cepas control de calidad a -70° C. Si se quieren mantener almacenadas para uso frecuente, pueden subcultivarse en agar Sabouraud y conservar a $2-8^{\circ}$ C, durante 15 días. Tras esas dos semanas deben subcultivarse de nuevo.

- Las cepas control de calidad deben incluirse siempre que se realicen pruebas de sensibilidad, para comprobar que sus CMI's están dentro del intervalo de control.

- Si tras repetir el test 20 veces en días distintos, la CMI de la cepa control no se incluye en el intervalo en más de una ocasión, debe analizarse todo el proceso en busca del error.

La tabla 2 incluye los valores de referencia para las cepas de control de calidad más utilizadas, según estos documentos.

Tabla 2: Intervalos de CMI's de las cepas control para los métodos de referencia

Antifúngico	<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019		<i>Candida krusei</i> ATCC 6258	
	CMI's obtenidas por el EUCAST	CMI's obtenidas por el CLSI	CMI's obtenidas por el EUCAST	CMI's obtenidas por el CLSI
Anfotericina B	0,12-0,50	0,50-4,0	0,12-1,0	1,0-4,0
Fluorocitosina	0,12-0,50	0,12-0,50	1,0-4,0	8,0-32,0
Fluconazol	1,0-4,0	1,0-4,0	16,0-64,0	16,0-128,0
Itraconazol	0,03-0,12	0,12-0,5	0,06-0,25	0,25-1,0
Voriconazol	0,03-0,12	0,03-0,25	0,03-0,25	0,12-1,0
Ketoconazol	0,03-0,12	0,06-0,50	0,06-0,25	0,25-1,0
Posaconazol	0,015-0,06	0,06-0,25	0,03-0,12	0,12-1,0
Caspofungina	0,50-2,0	0,50-4,0	0,12-0,50	0,25-1-0
Micafungina	0,50-2,0	0,50-4,0	0,12-0,50	0,25-1,0
Anidulafungina	0,50-4,0	1,0-8,0	0,03-0,25	0,06-0,50

7.2. REALIZACIÓN DE LAS PRUEBAS DE SENSIBILIDAD A LOS ANTIFÚNGICOS CON HONGOS MICELIALES

7.2.1. Preparación de los antifúngicos

Todo el proceso de preparación de los antifúngicos es similar al descrito en el apartado de pruebas de sensibilidad con levaduras.

7.2.2. Preparación de las placas de microdilución

Es similar al descrito para las levaduras

7.2.3. Preparación del inóculo

- Las cepas deben subcultivarse en tubos de agar patata glucosada a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 3-7 días, según especie.
- Las colonias se cubren con la colonia se cubrirá con 5 ml de agua destilada estéril o de solución salina 0,85% estéril.
- En caso de especies hidrofóbicas como *Aspergillus* spp., *Paecilomyces* spp., *Penicillium* spp., *Scopulariopsis* spp. y *Trichoderma* spp., deben añadirse a los 5 ml de agua o de solución salina 100 μl de Tween 20, para evitar la formación de cúmulos de conidias.

- Raspar la colonia cuidadosamente con un hisopo estéril, agitar la suspensión durante 15 segundos en vórtex a 2000 rpm.

- Transferir esta suspensión a un tubo estéril.

- Si se hace el método del EUCAST, las suspensiones se examinan con un hematocitómetro (cámara de Neubauer), siguiendo procedimientos habituales. Si se observan gran cantidad de trozos de hifas, debe filtrarse la suspensión con un filtro de 11 μm de diámetro, y repetir el recuento. La suspensión se ajusta a $1-5 \times 10^5$ ufc/ml.

- Si se sigue el método del CLSI, la suspensión se ajusta con la ayuda de un espectrofotómetro entre 0,09 y 0,17 de densidad óptica, según especies. La tabla 3 resume las densidades ópticas por especie. Esta densidad óptica equivale a entre 1×10^5 y 1×10^6 cfu/ml. Tras ello, se hace una dilución 1:50, obteniéndose una suspensión final con $0,5-5 \times 10^4$ cfu/ml.

Tabla 3: Densidad óptica y tamaños de inóculo según el documento M38-A del CLSI

Especies	Nº observaciones	Densidad óptica
<i>Aspergillus flavus</i>	105	0,09-0,11
<i>Aspergillus fumigatus</i>	104	0,09-0,11
<i>Fusarium oxysporum</i>	105	0,15-0,17
<i>Fusarium solani</i>	103	0,15-0,17
<i>Pseudallescheria boydii</i>	99	0,15-0,17
<i>Rhizopus arrhizus</i>	99	0,15-0,17
<i>Sporothrix schenckii</i>	50	0,09-0,11
<i>Paecilomyces variotii</i>	50	0,11-0,17

7.2.4. Inoculación e incubación de las placas

- La inoculación es similar a la descrita en levaduras
- Las placas se incuban a 35-37°C en estufa con ambiente normal (sin CO₂), durante 72 horas. Puede utilizarse un cámara húmeda si se desea.
- La lectura a 48 horas es la que debe tomarse como válida, salvo casos excepcionales, en los que pueden ser necesarios más días de incubación para obtener la CMI.
- En caso de cepas que no crecen a 35-37°C, pueden hacer las pruebas a 30°C, aunque deben validarse con cepas control de calidad y tomar los resultados con prudencia, ya que las pruebas no se han estandarizado a esta temperatura.

7.2.5. Control de calidad

El control de calidad es similar al descrito para las levaduras, aunque pueden utilizarse otras cepas control, que viene recogidas en los documentos de los estándares.

8. OBTENCIÓN, INTERPRETACIÓN Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

8.1. LEVADURAS

8.1.1. Método eucast

- Las placas deben leerse en un lector de placas de microdilución, en el que se detecte la densidad óptica de los pocillos. La longitud de onda recomendada es de 530 nm, al igual que al preparar el inóculo, pero también pueden emplearse otras longitudes de onda. El valor de densidad óptica de los pocillos de la columna 12 (blanco) debe sustraerse siempre a las lecturas del resto de los pocillos.
- Las placas pueden agitarse si se desea antes de la lectura, pero al ser de fondo plano, no suele formarse botón en el centro del pocillo, por lo que la lectura no necesita de homogenizado previo.
- Si el control de crecimiento no supera 0,2 de densidad óptica, las placas deben reincubarse otra vez y determinar la CMI a las 48 horas.

- Para los azoles, las equinocandinas y fluorocitosina, la CMI es la concentración más baja en la que se observa una disminución en la densidad óptica igual o superior al 50%, con respecto a la del control de crecimiento.
- Para anfotericina B es la concentración más baja en la que se observa una disminución en la densidad óptica igual o superior al 90%, con respecto a la del control de crecimiento.
- El EUCAST aun no ha propuesto los puntos de corte para interpretar los resultados de las pruebas de sensibilidad. Para definirlos, se están utilizando distribuciones de CMIs de cepas clínicas, obtenidas por la metodología EUCAST. Se observa como se distribuye la población de cepas de cada una de las especies, y se define la población *salvaje*, es decir, aquellas cepas que no han desarrollado mecanismos de resistencia. Tras ello, los resultados se relacionan con los parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos de los antifúngicos. Para una mayor información consultar en www.eucast.org.
- En caso de utilizar el método EUCAST, las recomendaciones actuales para interpretar los resultados son considerar como resistentes *in vitro*, aquellas cepas que muestran una CMI significativamente más elevada que los miembros de su especie. Así por ejemplo, CMIs de fluconazol por encima de 16 mg/l o de anfotericina B por encima de 1 mg/l podrían considerarse como resistentes *in vitro*.

8.1. 2. Método CLSI

- Las placas se leen visualmente con ayuda de un espejo invertido.
- Las placas pueden agitarse antes de la lectura.
- Para los azoles, las equinocandinas y fluorocitosina, la CMI es la concentración más baja en la que se observa una *sustancial* disminución en el crecimiento de la cepa, con respecto a la del

control de crecimiento. Esta disminución sustancial suele equivaler a un 80% de inhibición.

- Para anfotericina B es la concentración más baja en la que se observa una inhibición total del crecimiento de la cepa.

- Sólo existen puntos de corte para cuatro antifúngicos, recogidos en la tabla 4. Para otros antifúngicos se aconseja seguir las recomendaciones expuestas en el apartado del EUCAST.

Tabla 4. Puntos de corte para interpretar las pruebas de sensibilidad en levaduras, según el CLSI estadounidense. Datos en mg/L

Antifúngico	Sensible	Sensible dependiente de la dosis	Intermedio	Resistente
Fluconazol	≤ 8	16-32	-	≥ 64
Itraconazol	≤ 0,125	0,25-0,5	-	≥ 1
Voriconazol	≤ 1	2	-	≥ 4
Fluorocitosina	≤ 4	-	8-16	≥ 32

8.2. HONGOS FILAMENTOSOS

Las placas se leen de igual forma tanto por el método del EUCAST como por el del CLSI.

- Las placas se leen visualmente con ayuda de un espejo invertido.
- Para todos los antifúngicos, la CMI es la concentración más baja en la que se observa una inhibición total del crecimiento de la cepa.
- Para las equinocandinas, se puede utilizar la CME (concentración mínima efectiva), que se define como la concentración en la que empiezan a verse alteraciones microscópicas y/o macroscópicas de la cepa. Esta modificación no ha sido estandarizada y debe tomarse con precaución, desde el punto de vista clínico.

No existen puntos de corte por ninguno de los métodos expuestos.

9. RESPONSABILIDADES

- El procedimiento deberá llevarse a cabo por personal técnico cualificado con un entrenamiento específico.
- La supervisión de la técnica y de los resultados emitidos deberá realizarla un facultativo especialista responsable del laboratorio de microbiología.
- Las responsabilidades deben estar perfectamente descritas en el manual general de organización del laboratorio de microbiología y en las fichas de descripción de los puestos de trabajo.

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

- Todos los procedimientos deben seguir las normas de bioseguridad e higiene en microbiología, que deben estar recogidas en un protocolo normalizado del laboratorio.
- Se recomienda que estas técnicas sean realizadas por laboratorios que tengan un número de cepas elevado. Montar estas técnicas a demanda, de modo esporádico, impide que pueda hacerse un control efectivo de lotes, por lo que pueden producirse errores.
- Cuando se hace lectura visual en pruebas con levaduras, el error más habitual es interpretar el crecimiento residual (trailing), que se observa con

fármacos fungistáticos como los azoles, como auténtica resistencia. Esto sólo puede evitarse con experiencia y formación previa.

- Si se tiene un número bajo de cepas es mejor utilizar técnicas de difusión o métodos comerciales, para conocer la sensibilidad a los azoles, y remitir la cepa a un centro de referencia.
- Con estas técnicas de difusión o comerciales puede darse información rápidamente, que puede ser de utilidad clínica. Esta rapidez no es posible con los métodos de referencia.

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

- El método de microdilución en caldo queda casi limitado a aquellos laboratorios que, además de la experiencia suficiente, tengan un número elevado de aislamientos de hongos.
- Estas técnicas no son muy útiles para realizar pruebas con especies de levaduras de crecimiento lento. Tampoco se pueden utilizar con especies de hongos filamentosos que no producen microconidias, como los dermatofitos, por lo que deben realizarse adaptaciones o modificaciones de las mismas.
- La interpretación de los resultados debe hacerse con prudencia. No existen puntos de corte para muchas especies y antifúngicos y, además, la correlación no es muy elevada entre las pruebas de sensibilidad y la evolución clínica de pacientes con micosis graves.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Clinical Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Approved standard, M38-A. 2002. Wayne Pa.
2. Clinical Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved Standard, M27-A2. 2002. Wayne, Pa.
3. Clinical Laboratory Standards Institute. Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts. Approved Guideline, M44-A. 2004. Wayne, Pa.
4. Cuenca-Estrella M, Gomez-Lopez A, Mellado E, Rodriguez-Tudela JL. Correlation between the procedure

Servicio de Microbiología Hospital.....	Prueba de sensibilidad a los antifúngicos. Microdilución en caldo	PNT-MIC-11	
		Edición Nº 01	Página 8 de 8

for antifungal susceptibility testing for *Candida* spp. of the European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing (EUCAST) and four commercial techniques. *Clin Microbiol Infect* 2005; 11:486-492.

5. Cuenca-Estrella M, Moore CB, Barchiesi F, Bille J, Chrissyanthou E, Denning DW et al. Multicenter evaluation of the reproducibility of the proposed antifungal susceptibility testing method for fermentative yeasts of the Antifungal Susceptibility Testing Subcommittee of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (AFST-EUCAST). *Clin Microbiol Infect* 2003; 9:467-474.

6. Cuenca-Estrella M, Rodriguez-Tudela JL. Should antifungal treatments be based upon results of antifungal susceptibility testing? *Rev Iberoamer Micol* 2002; 19:133-138.

7. Espinel-Ingroff A, Barchiesi F, Cuenca-Estrella M, Pfaller MA, Rinaldi M, Rodriguez-Tudela JL et al. International and multicenter comparison of EUCAST and CLSI M27-A2 broth microdilution methods for testing susceptibilities of *Candida* spp. to fluconazole, itraconazole, posaconazole, and voriconazole. *J Clin Microbiol* 2005; 43:3884-3889.

8. Gomez-Lopez A, Aberkane A, Petrikou E, Mellado E, Rodriguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M. Analysis of the influence of Tween concentration, inoculum size, assay medium, and reading time on susceptibility testing of *Aspergillus* spp. *J Clin Microbiol* 2005; 43:1251-1255.

9. Rex JH, Pfaller MA, Walsh TJ, Chaturvedi V, Espinel-Ingroff A, Ghannoum MA et al. Antifungal susceptibility testing: practical aspects and current challenges. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14:643-658.

10. Rodriguez-Tudela J.L., Barchiesi F, Bille J, Chrissyanthou E, Cuenca-Estrella M, Denning D et al. Method for the determination of minimum inhibitory concentration (MIC) by broth dilution of fermentative yeasts. *Clin Microbiol Infect* 2003; 9:I-VIII.

11. Rodriguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M, Rodero L, Carpintero Y, Gorgojo B. Influence of shaking on antifungal susceptibility testing of *Cryptococcus neoformans*: a comparison of the NCCLS standard M27A medium, buffered yeast nitrogen base, and RPMI-2% glucose. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44:400-404.

12. Rodriguez-Tudela JL, Chrissyanthou E, Petrikou E, Mosquera J, Denning DW, Cuenca-Estrella M. Interlaboratory evaluation of hematocytometer method of inoculum preparation for testing antifungal susceptibilities of filamentous fungi. *J Clin Microbiol* 2003; 41:5236-5237.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Pruebas de sensibilidad a los antifúngicos. Método de difusión en agar; E-test y difusión con discos (fluconazol y voriconazol)	PNT-MIC-12	
		Edición N° 01	Página 2 de 5

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

Definir la metodología para realizar pruebas de sensibilidad *in vitro* a los antifúngicos, mediante las dos técnicas de difusión en agar más utilizadas, la técnica comercial de E-test y el método de difusión con discos de antifúngicos.

Este procedimiento es aplicable a todos los laboratorios de microbiología clínica que posean la dotación y experiencia adecuada para el manejo de estos microorganismos y de las técnicas de determinación de la sensibilidad *in vitro* de los mismos.

2. FUNDAMENTO

La técnica de E-test consiste en unas tiras de plástico inerte que incorporan un gradiente de concentración de antifúngico. Cuando se depositan sobre las placas de agar inoculadas con el microorganismo, el antifúngico difunde en el medio y tras una incubación a 35°C, durante 24-48 horas para *Candida* spp. y 48-72 horas para *C. neoformans* y hongos filamentosos, se determina la CMI, que es el punto de intersección de la elipse de inhibición de crecimiento con la tira de E-test. Parece ser el método de elección para detectar las cepas resistentes a anfotericina B, usando el medio agar RPMI 1640 complementado con un 2% de glucosa.

El método de difusión con discos de antifúngicos es un procedimiento de difusión sencillo y práctico, validado para realizar estudios con fluconazol y voriconazol (documento M44-A del CLSI), que se basa en la técnica clásica de discos cargados con antimicrobiano y medida de los halos de inhibición. El medio de cultivo recomendado es Mueller-Hinton con un 2% de glucosa y con azul de metileno, ya que parece mejorar la lectura de las placas, al aumentar la nitidez de los halos de inhibición. Hasta la fecha sólo se ha validado para estudios con levaduras

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC nº 10 de "Seguridad en el laboratorio de microbiología clínica", 2000.
- UNE-EN-ISO 15189-03. Medical Laboratories. Particular requirements for quality and competence.
- CLSI M44-A 2004. Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts. Approved standard.
- Manual de instrucciones y utilización de la técnica E-test.
- EUCAST-AFST 2006. Method for the determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) by Broth Dilution of *Aspergillus* species. En prensa.
- CLSI M38-A 2002. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi.

4. MUESTRAS

Estas pruebas de sensibilidad pueden realizarse utilizando cepas de levaduras cultivadas en medio sólido. Las cepas deben estar en cultivo puro. Se

deben utilizar subcultivos de no más de 24-48 horas para las levaduras.

5. REACTIVOS Y PRODUCTOS

- Agar RPMI 1640 con L-glutamina y sin bicarbonato con 2% de glucosa.
- Ácido morfolinpropanosulfónico (MOPS).
- Agar Mueller-Hinton con un 2% de glucosa.
- Azul de metileno.
- Tiras de E-test con antifúngicos.
- Discos de fluconazol de 25 µg.
- Discos de voriconazol de 1 µg.
- Agua destilada estéril.
- Solución salina 0,85% estéril.
- Placas de agar Sabouraud glucosado (SDA).
- Tubos de agar patata glucosada.
- Tween 20.
- Criotecas y/o tubos para conservación de cepas.
- Escala de McFarland.
- Soluciones de verificación de pHmetro.

6. APARATOS Y MATERIALES

- Incubador de 35 ± 2°C.
- pHmetro.
- Neveras y congeladores.
- Nefelómetro o espectrofotómetro para tubos.
- Agitador rotatorio Vórtex.
- Tubos plástico estériles de 5 ml.
- Tubos de cristal tipo Bijoux de 3 ml.
- Filtros de 0,22 µm de diámetro de poro para unidades de filtración.
- Frascos de vidrio estériles con tapón de rosca y capacidad de 250, 500 y 1000 ml.
- Probetas de 250, 500 y 1000 ml de capacidad.
- Unidades de filtración de 500 ml en plástico autoclavables.
- Barras magnéticas de agitación.
- Gradillas autoclavables para tubos de 5, 10 y 25 ml de capacidad.
- Cajas de plástico para puntas de micropipeta autoclavables.
- Cajas de plástico para incubación de las placas de microdilución estériles.
- Tubos de plástico de 50 ml tipo Falcon.
- Pipetas Pasteur estériles.
- Escobillones o torundas estériles.
- Micropipetas de volumen variable uni y multicanal.
- Puntas de micropipetas con filtro estériles.

7. PROCESAMIENTO DE LA TÉCNICA DE E-test

Para realizar esta técnica deben seguirse las recomendaciones recogidas en el *Manual de Instrucciones* del fabricante .

7.1. PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO

- El medio de cultivo recomendado es agar RPMI 1640 con glutamina, sin bicarbonato y a pH 7,0 complementado con glucosa al 2%. Como sistema amortiguador se utiliza MOPS 0,164 M.
- El medio debe esterilizarse mediante filtración con filtros de 0,22 µm de poro. Nunca debe

Servicio de Microbiología Hospital.....	Pruebas de sensibilidad a los antifúngicos. Método de difusión en agar; E-test y difusión con discos (fluconazol y voriconazol)	PNT-MIC-12	
		Edición Nº 01	Página 3 de 5

autoclavarse. Por ello se recomienda su preparación a doble concentración que, al añadir igual volumen de una solución autoclavada de agar 3% en agua destilada, quedará el medio a la concentración de trabajo con un 1,5% de agar.

- El medio se dispensará en placas de Petri de 9 ó 15 cm de diámetro.
- Pueden utilizarse como medios alternativos el agar casitona modificado, el agar AM3 e incluso el agar Mueller-Hinton 2% glucosa con azul de metileno (ver procedimiento de la técnica con discos).

7.2. PREPARACIÓN DEL INÓCULO.

- Para *Candida* spp. preparar una suspensión al 0,5 McFarland en solución salina (0,85 % de NaCl) a partir de un cultivo de 24 horas en SDA.
- Para *C. neoformans*, preparar una suspensión al 1 McFarland en solución salina y a partir de un cultivo de 48-72 horas en SDA.
- Para los hongos filamentosos se siguen las recomendaciones recogidas en los documentos de referencia del CLSI y del EUCAST.
- A partir de estas suspensiones, inocular las placas de agar con una torunda sembrando en tres direcciones.
- Dejar secar 10-15 min para que se absorba el exceso del inóculo.
- Aplicar las tiras de E-test sobre la superficie del agar, bien manualmente o con el aplicador suministrado por la casa comercial, colocando 5 tiras si la placa es de 14 cm de diámetro y 2 si es de 9 cm, situando el extremo de mayor concentración del antifúngico hacia la parte exterior de la placa.

7.3. INCUBACIÓN.

Se debe realizar a 35°C en aerobiosis durante 24-48 horas para *Candida* spp. y 48-72 horas para *C. neoformans* y hongos filamentosos.

7.4. LECTURA.

En los azoles, la CMI es la concentración de antifúngico en el punto de intersección de la elipse

de inhibición de crecimiento con la tira. En el caso de observarse colonias de menor tamaño en el interior de la elipse de inhibición de los azoles, no hay que tenerlas en cuenta para la determinación de la CMI. A veces, con algunos azoles, se observa doble halo de inhibición pero con colonias del mismo tamaño (grandes) en su interior, en este caso debe considerarse resistente. En el caso de observarse triple halo de inhibición, la CMI es la concentración donde las colonias cambian de tamaño.

En el caso de la anfotericina B, toda colonia en el interior de la elipse de inhibición, independientemente de su tamaño, debe valorarse para la lectura de la CMI.

No existen unos criterios de interpretación propios de esta técnica comercial. Se aconseja que se sigan los recogidos en los métodos de referencia.

7.5. CONTROL DE CALIDAD

El control de calidad se realiza siguiendo de forma similar al descrito en los documentos de referencia.

- Se recomienda hacer controles de los lotes de RPMI y del proceso de preparación de las placas de microdilución.
- Se recomienda mantener las cepas control de calidad a -70 C. Si se quieren mantener almacenadas para uso frecuente, pueden subcultivarse en agar Sabouraud y conservar a 2-8°C, durante 15 días. Tras esas dos semanas deben subcultivarse de nuevo.
- Las cepas control de calidad deben incluirse siempre que se realicen pruebas de sensibilidad, para comprobar que sus CMIs están dentro del intervalo de control.
- Si tras repetir el test 20 veces en días distintos, la CMI de la cepa control no se incluye en el intervalo en más de una ocasión, debe analizarse todo el proceso en busca del error.

La tabla 1 incluye los valores de referencia para las cepas de control de calidad más utilizadas, según recomienda el fabricante de la técnica.

Tabla 1. Intervalos de CMIs de las cepas control para la técnica de E-test. Para otros antifúngicos no existen datos. Datos en mg/L

<u>Antifúngico</u>	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	<i>C. krusei</i> ATCC 6258
Anfotericina B	0,25-2,0	0,50-2,0
Fluorocitosina	0,12-0,50	≥ 32
Fluconazol	2,0-8,0	≥ 256
Itraconazol	0,06-0,25	0,12-0,50
Ketoconazol	0,03-0,12	0,25-1,0

8. PROCESAMIENTO DE LA TÉCNICA DE DIFUSIÓN CON DISCOS DE FLUCONAZOL Y VORICONAZOL

Para realizar esta técnica deben seguirse las recomendaciones recogidas en el documento M44-A del CLSI estadounidense.

8.1. PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO

El medio recomendado es el agar Mueller-Hinton (MHA) suplementado con un 2% de glucosa y 0,5 µg/ml de azul de metileno. El procedimiento es el siguiente:

- Añadir 100 µl de una solución de azul de metileno (5 mg/l) a 100 ml de la solución madre de glucosa (0,4 g/l). La solución resultante tendrá una concentración de azul de metileno de 5 µg/ml, y de glucosa de 0,4 g/ml).
- Esterilizar por filtración.
- Añadir 1 ml a la superficie de las placas de MHA de 9 cm de diámetro. En el caso de utilizar placas de 15 cm de diámetro se añadirán 2,9 ml.
- Extender y dejar que se absorba durante toda la noche.

8.2. PREPARACIÓN DEL INOCULO E INCUBACION

- Preparar una suspensión al 0,5 McFarland en solución salina (0,85 % de NaCl) a partir de un cultivo de 24 horas en SDA.
- La inoculación de las placas se realiza de forma similar a la recogida en el punto 7.2.

- La colocación de los discos de antifúngicos y la incubación deben realizarse según las recomendaciones del documento M44-A.

8.3. LECTURA DE LAS PLACAS

Puede realizarse de dos formas, visualmente con regla o calibre, o automáticamente con el sistema el BIOMIC V3 (Giles Scientific Inc.), un método que incluye una cámara de video y un programa informático para interpretar los halos de inhibición. La tabla 2 recoge los criterios interpretativos de esta técnica.

8.4. CONTROL DE CALIDAD

El control de calidad se realiza de forma similar al descrito en el apartado 7.5. La tabla 3 incluye los valores de referencia para las cepas de control de calidad más utilizadas.

9. RESPONSABILIDADES

- El procedimiento deberá llevarse a cabo por personal técnico cualificado con un entrenamiento específico.
- La supervisión de la técnica y de los resultados emitidos deberá realizarla un facultativo especialista responsable del laboratorio de microbiología.
- Las responsabilidades deben estar perfectamente descritas en el manual general de organización del laboratorio de microbiología y en las fichas de descripción de los puestos de trabajo.

Tabla 2. Criterios interpretativos de los halos de inhibición para la técnica de difusión en agar con discos de fluconazol y voriconazol

Antifúngico	Sensible	Sensible dosis dependiente	Resistente
Fluconazol	≤ 14 mm	15-18 mm	≥ 19 mm
Voriconazol	≤ 13 mm	14-16 mm	≥ 17 mm

Tabla 3. Intervalos de los mm de los halos de inhibición CMI de las cepas control para la técnica de difusión con discos.

Antifúngico	Discos	<i>C. albicans</i> ATCC 90028	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	<i>C. tropicalis</i> ATCC 750	<i>C. krusei</i> ATCC 6258
Fluconazol	25 µg	28-39	22-33	26-37	--
Voriconazol	1 µg	31-42	28-37	--	16-25

Servicio de Microbiología Hospital.....	Pruebas de sensibilidad a los antifúngicos. Método de difusión en agar; E-test y difusión con discos (fluconazol y voriconazol)	PNT-MIC-12	
		Edición Nº 01	Página 5 de 5

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

- Todos los procedimientos deben seguir las normas de bioseguridad e higiene en microbiología, que deben estar recogidas en un protocolo normalizado del laboratorio.
- Con estas técnicas de difusión o comerciales se puede proporcionar una información rápidamente, que puede ser de utilidad clínica.

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

- Estas técnicas no son muy útiles para realizar pruebas con especies de levaduras de crecimiento lento
- La interpretación de los resultados debe hacerse con prudencia. No existen puntos de corte para muchas especies y antifúngicos y, además, en general no hay buena correlación entre las pruebas de sensibilidad y la evolución clínica de pacientes con micosis graves.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Clinical Laboratory Standards Institute. Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts. Approved Guideline, M44-A. 2004. Wayne, Pa.
2. Cuenca-Estrella M, Gomez-Lopez A, Mellado E, Rodriguez-Tudela JL. Correlation between the procedure for antifungal susceptibility testing for *Candida* spp. of the European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing (EUCAST) and four commercial techniques. Clin Microbiol Infect 2005; 11:486-492.
3. Pfaller MA, Boyken L, Messer SA, Tendolkar S, Hollis RJ, Diekema DJ. Evaluation of the Etest method using Mueller-Hinton agar with glucose and methylene blue for determining amphotericin B MICs for 4,936 clinical isolates of *Candida* species. J Clin Microbiol. 2004; 42:4977-4979.
4. Pfaller MA, Diekema DJ, Rinaldi MG, Barnes R, Hu B, Veselov AV, Tiraboschi N, Nagy E, Gibbs DL. Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study: a 6.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* and other yeast species to fluconazole and voriconazole by standardized disk diffusion testing. J Clin Microbiol. 2005; 43:5848-5859.