

José Llovo
José Pontón

14a.1. Fundamento

Dentro de los métodos diagnósticos micológicos independientes del cultivo que pueden realizarse directamente sobre muestras clínicas hay que considerar el diagnóstico microscópico directo, la detección de antígenos y la detección de ácidos nucleicos específicos del hongo.

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 inmunodeprimidos.

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, efectuar las técnicas microscópicas que, en tiempo real (menos de 10 min), puedan orientar de forma preliminar la etiología del proceso.

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 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 microscopía de con-

traste de fases [1]. 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.

Dificultades de la microscopía directa [2]

- 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.
- La presencia de falsos positivos (gotas de grasa, restos celulares, etc.), puede minimizarse con un segundo examen o con la experiencia del observador.
- Posee una relativamente baja sensibilidad diagnóstica.
- En la mayoría de los casos, no es posible identificar la especie fúngica.
- No permite la realización de estudios de sensibilidad a los antifúngicos.

14a.2. Examen microscópico

El examen microscópico directo proporciona un diagnóstico definitivo si se observan elementos fúngicos patognomónicos: cápsula de *Cryptococcus neoformans*, células muriformes en cromoblastomycosis, levaduras pequeñas intracelulares de *Histoplasma capsulatum*, quistes típicos de *P. jiroveci*, levaduras con brotes de base ancha de *Blastomyces dermatitidis* (Figura 14a.1), levaduras con gemación multipolar en rueda de timón de *Paracoccidioides brasiliensis* (Figura 14a.2) o las esférulas de *Coccidioides immitis* (Tabla 14a.1).

El examen directo también es muy importante para interpretar el crecimiento de hongos oportunistas o contaminantes; p. ej. visualización de elementos fúngicos anchos y no septados en muestras de lesiones rápidamente invasoras de las que se puede, o no, aislar un zigomiceto (Figura 14a.3).

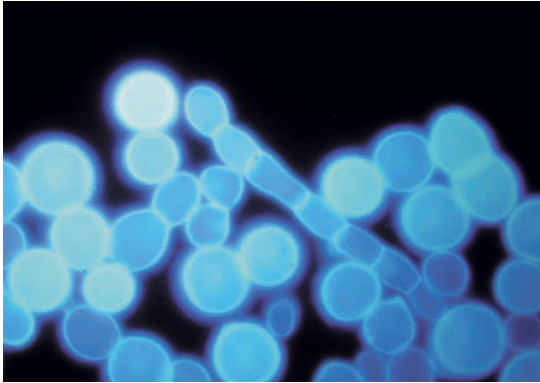


Figura 14a.1. Tinción con blanco de calcoflúor de *B. dermatitidis*.



Figura 14a.2. Tinción con blanco de calcoflúor de *P. brasiliensis*.

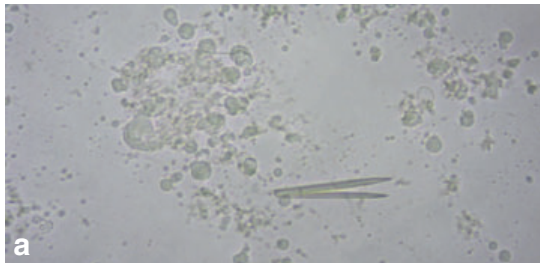


Figura 14a.3. Microscopía de campo brillante (a) y tinción con blanco de calcoflúor (b) de una zigomicosis rinocerebral.



Tabla 14a-1. Identificación presuntiva mediante microscopía directa.

- Candidiasis.** En las candidiasis superficiales es muy frecuente la observación de levaduras, pseudohifas y filamentos. La infección invasora por *C. albicans* puede sospecharse en preparaciones histológicas teñidas con PAS o Plata-metamina al observar una mezcla de levaduras, pseudohifas e hifas en el tejido, mientras que la observación solamente de células levaduriformes sugiere la infección por *C. glabrata*. Un aumento de la sensibilidad de estas técnicas puede lograrse con la utilización de fluorocromos como el Blanco de Calcoflúor, el Blankophor P y el Rojo Congo [3-6].
- Criptococosis.** La detección de *C. neoformans* puede realizarse de forma directa sobre muestra clínica, especialmente cuando se trata de meningitis criptocócica. La elección de la técnica de visualización empleada (microscopía directa, tinta china o Calcoflúor) varía según la experiencia del observador, pero sin olvidar que la detección de antígeno es mucho más sensible.
- Neumocistosis.** El examen microscópico se utiliza para detectar las formas tróficas y quistes de *P. jiroveci* habitualmente en muestras respiratorias. Es importante tener en cuenta que el esputo debe ser inducido. Incluso en el esputo inducido, muchas veces no se consigue apreciar este microorganismo, por lo que si se sospecha una neumonía por *P. jiroveci* debe procederse a la realización de un lavado broncoalveolar (LBA).
- Aspergilosis.** La observación de fragmentos de hifas paralelas, tabicadas y ramificadas en ángulo agudo es sugestiva de aspergilosis en muestras respiratorias y en preparaciones histológicas. Aunque las muestras clínicas del tracto respiratorio más frecuentes son los esputos, las que presentan una mayor rentabilidad diagnóstica son las obtenidas mediante fibrobroncoscopia, como el LBA.
- Micosis superficiales y cutáneas.** La observación de filamentos con bordes paralelos y artroconidias en una muestra procedente de un paciente con sospecha de dermatomicosis (Figuras 14a.4 y 14a.5) es altamente sugerente de una infección por un dermatofito y permite la instauración de un tratamiento precoz que deberá confirmarse tras conocer los resultados del cultivo. La presencia de hifas tortuosas o conidios redondeados orienta hacia mohos no dermatofitos. La presencia de levaduras y pseudohifas orienta a una etiología candidiásica. El diagnóstico de pitiriasis versicolor se confirma al visualizar conjuntamente estructuras levaduriformes redondeadas y micelios ("albóndigas con espaguetis") (Figura 14a.6).

Para la identificación presuntiva del patógeno fúngico son muy útiles ciertas claves de orientación diagnóstica (Tabla 14a.2).

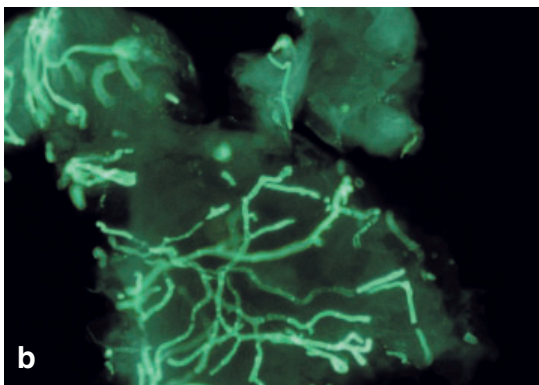
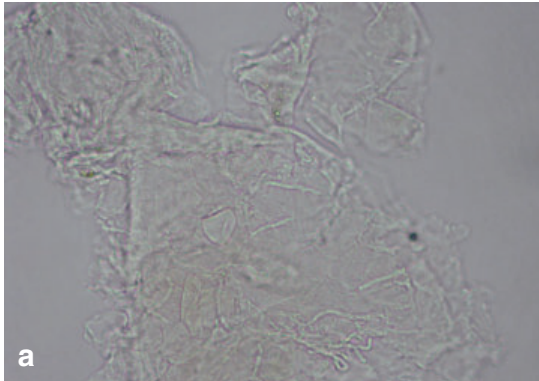


Figura 14a.4. Microscopía de campo brillante (a) y tinción con blanco de calcoflúor (b) de una *Tinea corporis*.

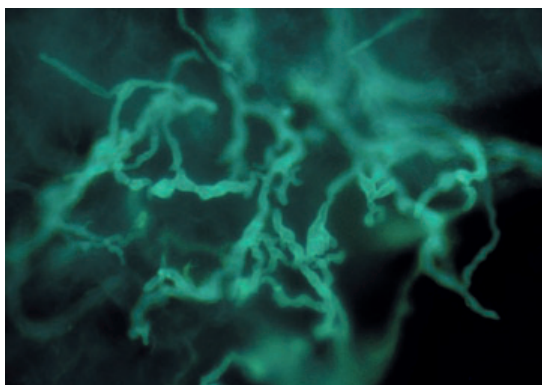


Figura 14a.5. Tinción con blanco de calcoflúor de una onicomicosis por *Onychocola canadensis*.

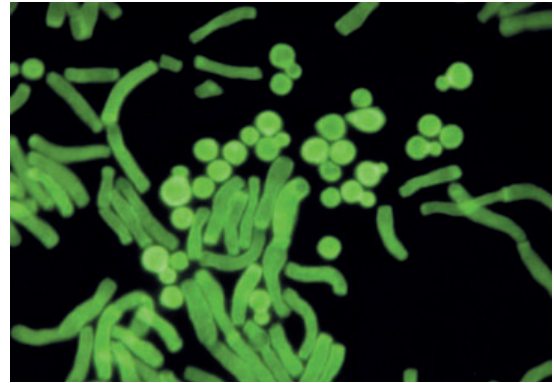


Figura 14a.6. Tinción con blanco de calcoflúor de una pitiriasis versicolor.

14a.2.1. Tipos de observación microscópica

Las técnicas instrumentales más utilizadas son la microscopía de campo brillante y la de fluorescencia.

14a.2.1.1. Técnicas de microscopía con campo brillante

El microscopio de campo brillante es el equipo disponible en la generalidad de los laboratorios de microbiología. La mayoría de los hialohifomicetos (no dematiáceos) tiene un bajo índice de refracción por lo que el uso del contraste de fases ayuda de forma muy notable en la detección de las estructuras fúngicas cuando no se utilizan colorantes [1,7,8] (Figura 14a.7).

Es una técnica sencilla que permite la observación inmediata de la muestra clínica. Su utilidad en el diagnóstico de las micosis superficiales ya se ha comentado en el Capítulo 4. En el caso de sospe-

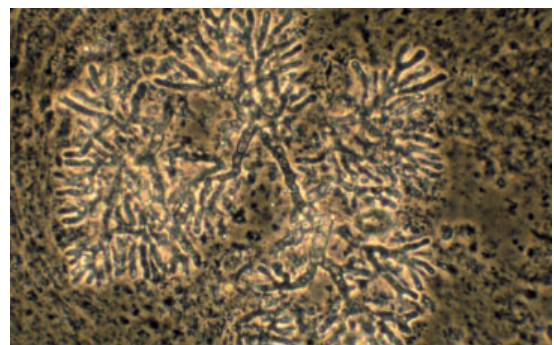


Figura 14a.7. Microscopía de contraste de fases de un esputo de un paciente con aspergilosis pulmonar por *A. fumigatus*.

Tabla 14a.2. Guía de identificación presuntiva, tras observación microscópica directa de la muestra.

Muestras de piel y anejos:**A) Pelos**

1. Presencia de nódulos:
 - a) Negros y duros: Micelio pigmentado con ascosporas fusiformes. Piedra negra (*Piedraia horta*).
 - b) Blancos y blandos: Pseudomicelio artrosporado y células gemantes. Piedra blanca (*Trichosporon* spp.).
2. Ausencia de nódulos: Presencia de artroconidios según la disposición del micelio y talla de esporas:
 - a) Endotrix (*Trichophyton* spp.)
 - b) Ectotrix (*Microsporum* spp. y *Trichophyton* spp.).

B) Uñas

1. Pseudohifas y levaduras (*Candida* spp.)
2. Hifas:
 - a) Hialinas:
 - Bordes paralelos: Dermatofitos (*Trichophyton* spp., *Microsporum* spp. y *Epidermophyton* spp.)
 - Bordes irregulares: No dermatofitos (*Scopulariopsis* spp., *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Onychocola* spp., etc.).
 - b) Pigmentadas (*Scytalidium simidiatum*).

C) Escamas de piel

1. Hifas cortas y acúmulos de levaduras (*Malassezia* spp.).
2. Hifas hialinas: Dermatofitos.
3. Hifas pigmentadas (*Scytalidium*, *Exophiala werneckii*).
4. Pseudohifas y levaduras:
 - a) Hialinas (*Candida* spp.).
 - b) Pigmentadas (*Exophiala werneckii*).

Muestras de exudados, biopsias, etc.

1. Hifas y pseudohifas sin levaduras:
 - a) Hifas con septos:
 - Hialohifomicosis: Filamentos hialinos correspondientes a multitud de hongos indistinguibles microscópicamente: *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Paecilomyces* spp., *Pseudoallescheria* spp., etc.
 - Feohifomicosis: Micelio pigmentado producido por hogos dematiáceos: *Cladosporium* spp., *Exophiala* spp., *Phialophora* spp., etc.
 - b) Hifas sin septos o muy infrecuentes: Hifas anchas de 3-30 μm , irregulares, ramificaciones en ángulo recto. Zigomicetos: *Absidia* spp., *Mucor* spp., *Rhizopus* spp., etc.
2. Hifas y pseudomicelio con levaduras: *Candida* spp., *Trichosporon* spp., *Blastoschizomyces* spp., etc.
3. Sólo estructuras redondeadas:
 - a) Células gemantes sin formar cadenas:
 - Diámetro de 2-5 μm : *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*, levaduras ovoides dentro del sistema retículo endotelial.
 - Diámetro > 5 μm :
 - Cuello estrecho entre célula madre e hija: *Cryptococcus neoformans* (células de 2-20 μm , tamaño variable, con una o varias yemas y producción de cápsula). *Paracoccidioides brasiliensis* (células de 5-60 μm , gemación multipolar periférica). *Histoplasma capsulatum* var. *duboisii* (células de 7-15 μm y origen africano).
 - Cuello o base de gemación ancha: *Blastomyces dermatitidis* (levaduras de 8-20 μm).
 - b) Células formando cadenas: *Lacazia loboi* (células de 5-15 μm , con forma de limón, con istmo prominente y estrecho y origen sudamericano).
 - c) Células levaduriformes con septos en un plano: *Penicillium marneffe* (células de 3-5 μm , origen sudeste asiático).
 - d) Células levaduriformes con septos en dos planos: Con paredes pigmentadas formando cuerpos escleróticos o células fumagoides (*Fonsecaea* spp., *Cladosporium* spp., *Phialophora* spp., etc.).
 - e) Presencia de esférulas:
 - Con endosporas: *Coccidioides immitis* (esférulas de 30-60 μm , con endosporas de 2-4 μm , origen americano). *Rhinosporidium seeberi* (esporangios de 100-300 μm , presentes en mucosa nasal y conjuntiva). *Prototheca* spp. (alga con disposición de endosporas en radio de rueda).
 - Sin endosporas: *Emmonsia parva*.

cha de meningitis criptocócica, tomar una gota de LCR, colocarla entre porta y cubre y examinarla a x400 en un microscopio de campo brillante. La observación de levaduras redondas, algunas de las cuales presentan yemas, es característica de *C. neoformans*. Pueden, asimismo, observarse formas capsuladas, hecho que se hace más evidente al emplear contraste de fases. Los problemas que presenta la interpretación de la visualización microscópica directa tienen que ver, sobre todo con la experiencia del observador, dado que otras formas redondas que pueden verse en los LCR, como las gotas de grasa o los hematíes (más habituales en punciones traumáticas), pueden confundir a observadores inexpertos.

Hidróxido potásico (KOH)

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 observar la morfología y la pigmentación fúngica (Figura 14a.4a). 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 min hasta horas, en el caso de las muestras de uñas, y puede reducirse calentando ligeramente la preparación. Se suelen utilizar dos concentraciones, una más fuerte del 20-30% para uñas, y 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. Los inconvenientes de las soluciones de KOH son, entre otros, que su reacción con el material clínico puede crear unos artefactos que pueden parecerse a los hongos, con lo que se hace necesaria cierta experiencia en el observador; el carácter corrosivo del KOH en el equipo y la facilidad de aparición, con el tiempo, de cristales que dificultan la observación.

A la solución de KOH se le puede añadir Glicerol, DMSO o algún colorante.

KOH Glicerol: La adición del glicerol previene la degradación de los elementos fúngicos, evita la formación de cristales y evita la deshidratación de la preparación entre porta y cubre, convirtiéndola en semipermanente. La solución de KOH glicerol es la más comúnmente utilizada.

Reactivos

- Solución de KOH al 15 % (añadir 15g 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.

Procedimiento

Se deposita el material a examinar en un porta y se añade una gota de la solución de KOH, se mezclan bien y se coloca el cubreobjetos. Tras un período de tiempo para permitir la clarificación de la muestra por el KOH, la preparación se examina a x100, x400 ó x1000. Si fuera necesario, puede calentarse suavemente.

KOH-Dimetilsulfóxido (DMSO): La adición de DMSO acelera la clarificación, evita la necesidad del calentamiento, la cristalización y la formación de artefactos.

Reactivo

- Añadir 40 ml de DMSO a 30 ml de agua destilada y disolver; luego añadir 10 g de KOH y disolver completamente; completar hasta 100 ml con agua destilada.

Procedimiento

Se realiza como KOH Glicerol pero sin calentar la preparación; la observación se debe realizar antes de 20 min. Para mantener la preparación se debe guardar en cámara húmeda en frío.

KOH-Colorante: Con la intención de mejorar la visualización de los hongos, se han utilizado colorantes como azul de metileno y la tinta azul-negra Quink Parker, siendo esta última de uso generalizado. Se prepara añadiendo una parte de tinta a dos partes de la solución de KOH. En el caso de no disponer de un lote antiguo de tinta azul-negra, utilizar la tinta negra Quink Parker. El procedimiento es el mismo que el del KOH Glicerol. Se debe tener precaución, pues esta preparación puede enmascarar el pigmento melánico de los hongos dematiáceos.

Tinción negativa

Para la detección de la cápsula polisacáridica extracelular de algunos hongos se utilizan suspensiones coloidales de partículas de carbón. Las más utilizadas son la Tinta China y la Nigrosina. Es la técnica de tinción negativa más ampliamente recogida en la literatura para poner de manifiesto la cápsula de *C. neoformans*. La cápsula aparece como un halo claro y nítido en torno a una levadura redonda contra un fondo negro (Figura 14a.8).

Los problemas que pueden aparecer con esta técnica tienen, sobre todo, que ver con la experiencia del observador, ya que puede haber numerosos artefactos (hematíes, burbujas de aire, leucocitos, partículas de talco y gotas de grasa) que pueden confundir, y más aún cuando las formas de *C. neoformans* carecen de cápsula. 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. Aunque la técnica es muy rápida y sencilla, su sensibilidad es del 50% en los pacientes no-VIH y del 70-88% en los pacientes VIH con meningitis criptocócica. La detección de antígeno capsular mediante látex ha hecho que algunos laboratorios hayan abandonado su uso, pero dado que el látex puede dar positivos falsos, se recomienda utilizarlos de modo complementario.

Tinta China

Reactivos

- Tinta china de buena calidad (tinta Pelikan India Ink o Parker Black Ink, entre otras) 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.

Procedimiento

Depositar sobre un porta limpio y desengrasado una gota de LCR y una de tinta china, mezclarlas bien evitando formar burbujas y colocar el cubre. La preparación debe ser fina y su color marrón, no negro. La observación se realiza a x100 ó x400. La presencia de formas redondas rodeadas de un halo grande y transparente son sugestivas de *C. neoformans* (Figura 14a.8).

Nigrosina

Reactivo

- Disolver 10 g de Nigrosina (Sigma) en 100 ml de una solución acuosa de formol al 10%, colocar al baño maría durante 30 min, añadir formol 10 % hasta 100 ml para compensar la evaporación y, por último, filtrar dos veces por papel Whatman nº 1.

Procedimiento: Similar a la Tinta China.

Otras tinciones de uso menos frecuente en Micología son: Tinción de Gram y la de Giemsa.

Tinción de Gram

Es el método de tinción más usado en los Laboratorios de Microbiología. No se utiliza habitualmente para la tinción de hongos en la muestra clínica pero, en ocasiones, puede aportar información importante al observador experimentado ya



Figura 14a.8. Microscopía con tinta china para observar la cápsula de *C. neoformans*.

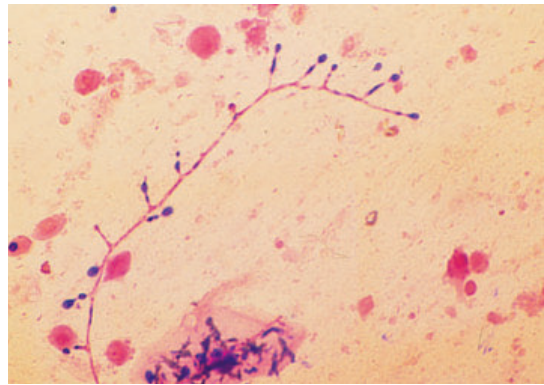


Figura 14a.9. Tinción de Gram mostrando *S. prolificans* en esputo (Cortesía del Dr. R. Salesa).

que, habitualmente, los hongos se comportan como microorganismos Gram-positivos (Figura 14a.9). Sin embargo, la observación de fragmentos de hifas tabicadas Gram-negativas y ocasionalmente ramificadas en ángulo agudo (45°) es altamente sugestiva de colonización del árbol respiratorio por un hongo filamentosos. Esta técnica es poco sensible, por lo que se recomienda realizar una primera observación a menor aumento (x400) para detectar dichos fragmentos. Además, es poco específica ya que hongos filamentosos diferentes de *Aspergillus* (*Pseudoallescheria boydii*, *Fusarium* spp., *Penicillium marneffeii*) pueden presentar un aspecto similar, por lo que siempre se debe confirmar la identificación por cultivo en los medios micológicos adecuados.

Tinciones Romanowsky

Aunque de uso cotidiano en los Laboratorios de Hematología para teñir los frotis de sangre periférica y médula ósea, tiene un uso y utilidad limitado en Micología Clínica. Se pueden emplear

multitud de modificaciones (Giemsa, May-Grünwald-Giemsa, Leishman, Wright, Riu, etc.) pero se han ido imponiendo las más sencillas y rápidas, como el Diff-Quik (Medion Diagnostics). Se ha demostrado su eficacia en la detección de *H. capsulatum* dentro de las células mononucleares, como levaduras pequeñas con fino halo hialino. (Figura 14a.10). También son útiles en el diagnóstico de *C. neoformans* en muestras respiratorias y en líquido cefalorraquídeo [9] y se usan de forma más habitual en el diagnóstico de *P. jiroveci*.

Otras tinciones

Otros procedimientos de tinción no demasiado complejos utilizados para el diagnóstico de micosis superficiales (lactofenol de Amman, colorante de Cohen y colorante de Kane) se describen en el Capítulo 4.

14a.2.1.2. Microscopía de Fluorescencia

Fueron Margarot y Deveze quienes, en 1925, demostraron la utilidad diagnóstica de la luz UV, al comprobar la fluorescencia de los pelos infectados en casos de *Tinea capitis* producidas por *Microsporum* spp [10]. Con la aparición de los microscopios de fluorescencia y sus continuas mejoras se abrió una gran puerta al diagnóstico y la investigación biomédica.

Fluorescencia primaria o natural

La capacidad de determinados hongos en muestras clínicas para emitir radiación en el visible tras ser irradiados con luz UV (autofluorescencia) es conocida desde hace años, pero la debilidad de esta fluorescencia natural la hacen inútil desde el punto de vista del diagnóstico práctico. Sin embargo, se ha podido demostrar una autofluorescencia importante en algunos hongos incluidos en parafina y teñidos con hematoxilina-eosina [11,12] (Figura 14a.11) y de *P. jiroveci* en preparaciones teñidas con Papanicolaou [13].

Fluorescencia secundaria

Se basan en la visualización de objetos no fluorescentes tras marcado con moléculas fluorescentes. Los sucesivos desarrollos en equipos, fuentes de iluminación y la aparición de diferentes fluorocromos con dianas diferentes, ha cambiado radicalmente el escenario de su implicación en el diagnóstico micológico. Estos fluorocromos son

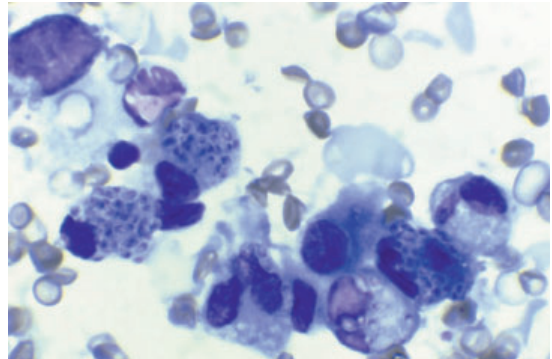


Figura 14a.10. Tinción May-Grünwald-Giemsa de una impronta pulmonar de un ratón infectado con *H. capsulatum*.

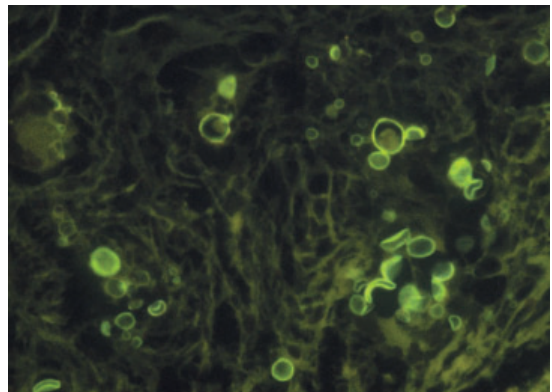


Figura 14a.11. Tinción con hematoxilina-eosina de tejido cerebral infectado por *P. brasiliensis*, observado con luz ultravioleta de epifluorescencia (Leitz D-Filter).

herramientas de cribado ideales, puesto que permiten una visualización inmediata de las dianas fluorescentes, contra un fondo oscuro, aún en manos inexpertas. Hay que distinguir la fluorescencia inespecífica o quimiofluorescencia, que marca de modo general las estructuras fúngicas (naranja de acridina, rojo Congo y agentes blanqueantes), de la específica o inmunofluorescencia que permite la identificación específica de ciertos hongos al conjugar un anticuerpo específico (poli o monoclonal) con un fluorocromo (isocianato).

Quimiofluorescencia

Naranja de Acridina:

Se trata de un fluorocromo que se liga a macromoléculas polianiónicas, como los mucopolisacáridos y los ácidos nucleicos. Se descubrió por accidente, en 1958, que al teñir mucina en tejidos se podía demostrar la presencia de hongos [14]. Pronto se describe su utilidad, tanto en cortes de tejidos como en muestras clínicas directas [15]. Se trata de

una técnica sencilla y rápida (<5 min), con un reactivo barato, estable y con el que se debe trabajar con precauciones para evitar su contacto, ingestión o inhalación. En función de la dilución empleada, se puede resaltar la fluorescencia de la pared celular (diluciones bajas) o de las estructuras intracitoplásmicas (altas diluciones). Se pueden utilizar distintos protocolos de tinción, existen también soluciones comerciales preparadas.

Reactivo

- Preparar, utilizando siempre guantes, una solución stock 1 % p/v de Naranja de Acridina en agua destilada. Se puede almacenar en la oscuridad a 4 °C hasta 6 meses. La solución de trabajo se prepara diariamente, añadiendo 0,5 ml de la solución stock a 5 ml de un tampón acetato 0,2 M a pH 4.

Procedimiento

Tras la confección habitual del frotis y secado al aire, se fija con metanol o calor. Teñir el frotis con solución de trabajo durante 2 min, lavar con agua y dejar secar. Se puede hacer un montaje con agua y observar inmediatamente con microscopio de fluorescencia con los filtros habituales de Inmunofluorescencia y Auramina (Exc. 450-490/510/520). Las bacterias y los hongos se tiñen de color naranja y los núcleos de los leucocitos se tiñen de color verde (Figura 14a.12).

Rojo Congo:

Este fluorocromo se empezó a utilizar para la detección de celulosa en cereales y, en histopatología, para la detección de amiloide. Su aplicación en micología se debe Slifkin y Cumbie [16]. Aunque la técnica es sencilla y barata, no se ha introducido de forma significativa en los laboratorios de Micología quizá por su implicación en carcino y teratogénesis.

Agentes blanqueadores:

Conocidos desde 1930, los abrillantadores ópticos (*optical brighteners*) o agentes blanqueadores fluorescentes (ABF) vivieron en los años cuarenta un desarrollo exponencial por su gran interés industrial en el blanqueado textil, del papel, plásticos y detergentes. En la actualidad, se dispone de más de 2.500 productos patentados y pertenecientes a los mayores consorcios químicos del mundo (Bayer, Sandoz, ICI, Cyba, Cyanamid, etc.).

Estas moléculas, de gran heterogeneidad química, son compuestos orgánicos heterocíclicos, incoloros o débilmente coloreados que, en solución o aplicados a un sustrato, absorben la radiación en el ultravioleta cercano (350 nm) y emiten la mayoría de la energía absorbida en la región azul del espec-

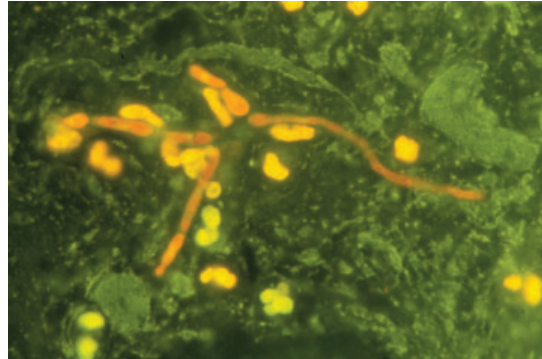


Figura 14a.12. Tinción con naranja de acridina de esputo con levaduras de *Candida* y leucocitos polimorfonucleares.

tro visible (430 nm). Presentan una peculiar y gran afinidad por polisacáridos constituidos por uniones beta-glucosídicas (glucanos, quitina, celulosa) presentes en los hongos y otros organismos, pero ausentes en los tejidos de mamíferos.

La aplicación microbiológica de estas moléculas probablemente se deba a Marjorie Darken (1961) [17]. Se comenzaron a usar en Micología como herramientas en el estudio de la morfogénesis de la pared fúngica, siendo a mediados de los ochenta, sobre todo en el ámbito anatomopatológico, cuando se demostró su utilidad para el diagnóstico de las micosis [18-20]. Los ABF de aplicación microbiológica derivan del ácido diamino-estilbeno. Los más ampliamente utilizados son el Calcofluor White (CW), el Blankophor y el Uvitex 2B. Su alta afinidad por la quitina, glucano 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), lo que permite ganar dos batallas a un tiempo: la del diagnóstico rápido y la del cada vez más limitado y preciado tiempo del micólogo.

En el momento actual los ABF son una herramienta difícilmente prescindible en los laboratorios de Microbiología por que, además de ser útiles en Micología, lo son también en Ficología (*Prototheca* y tecas celulósicas de Dinoflagelados) y Parasitología (esporas de microsporidios, quistes de *Entamoeba* y quistes de amebas de vida libre) (Figuras 14a.15 - 14a.17).

Una posible explicación de su escasa, hasta el momento, utilización en los laboratorios es la descripción en la literatura de algunas limitaciones de la técnica, que no se corresponden con la realidad.

Ventajas de los agentes blanqueadores fluorescentes

1. Método de tinción inmediato, simple y de bajo coste.
2. La utilización de un solo colorante en el laboratorio de Micología, tanto para examen directo como para la observación microscópica de los cultivos.
3. Compatibilidad con la cinta adhesiva (Scocht) en la toma de muestras clínicas, estudio micromorfológico de cultivos y toma de muestras ambientales.
4. La alta intensidad de su fluorescencia y su escaso "fading" 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 (Figura 14a.13).
5. Los ABF se utilizan en solución acuosa a altas diluciones y son estables durante años a temperatura ambiente y protegidos de la luz.
6. Los frotis una vez teñidos con ABF pueden conservarse secos por tiempo indefinido.
7. No tienen la peligrosidad personal y medioambiental de otros fluorocromos de uso tradicional en los laboratorios de Microbiología (Auramina y Naranja de Acridina).
8. Permiten la retención de frotis previamente teñidos con otros colorantes (Gram, Ziehl, Romanowsky, etc.) y su uso previo no afecta al empleo posterior de otros colorantes.
9. Permiten la tinción secuencial o doble con otros fluorocromos o anticuerpos fluorescentes (Figura 14a.14) [5].
10. Existen muchas moléculas candidatas y se pueden utilizar radiadores de UV convencionales (lámpara halógena).
11. En relación a su baja toxicidad, se han descrito métodos de tinción vital que permiten el diagnóstico de micosis profundas tras su inyección intravenosa y su posterior revelado microscópico o gammagráfico [21].
12. Los ABF resisten el autoclavado (125 °C durante 15 min), lo que permite su incorporación a los medios de cultivo y de este modo facilita la visualización de los hongos sin necesidad de teñir.

©2007 Revista Iberoamericana de Micología - ISBN: 978-84-611-8776-8



Figura 14a.13. Precipitación de cristales de Leucophor .

Recomendaciones de aplicación

Están relacionadas con los tres elementos esenciales en la técnica: ABF, sistema de iluminación y sistema de filtros.

ABF. Los dos más empleados son el Blankophor P (Bayer Cat. nº C52349) y el Calcofluor White M2R o Fluorescent Brightener 28 (Sigma-Aldrich Cat. nº F3543, ICN Ref. nº 158067). En el mercado existen reactivos listos para su uso, que necesariamente se deben comprobar ya que no todos funcionan correctamente. La solución madre habitual en caso de Calcofluor White es de 0,1% (p/v) y del Blankophor 0,025% (p/v) en agua, que se puede conservar a temperatura ambiente protegida de la luz. La presencia de cristales en solución se

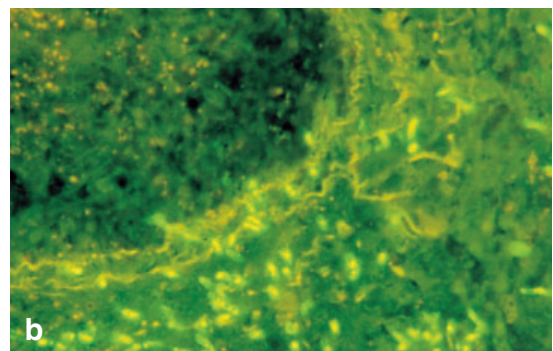
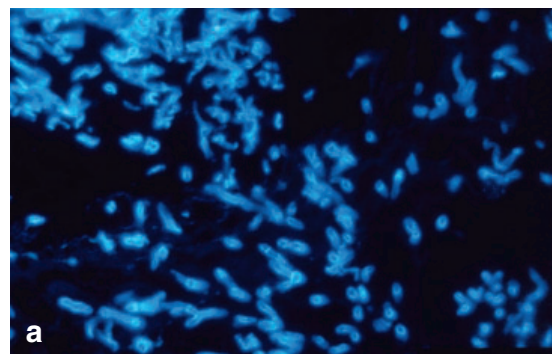


Figura 14a.14. Tinción con Blankophor P de tejido cerebral de un paciente con leucemia aguda mielobástica donde se observan elementos fúngicos (a). Tinción del mismo tejido con anticuerpos anti-*Aspergillus* observándose fluorescencia sobre los elementos fúngicos (b). Reimpreso de la referencia Binder y Rüchel [4] con el permiso de los autores y de la editorial Blackwell Wissenschafts-Verlag Berlin, GmbH".

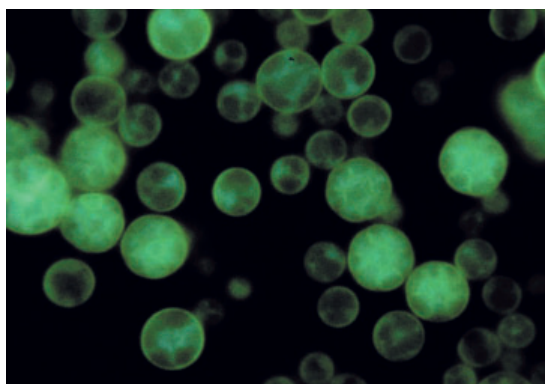


Figura 14a.15. Tinción con blanco de calcoflúor de *Prototheca*.

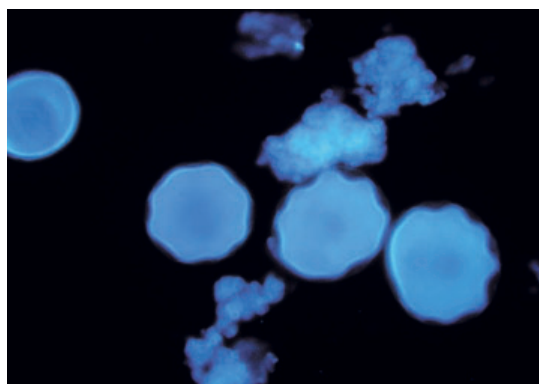


Figura 14a.16. Tinción con blanco de calcoflúor de *Acanthamoeba*.

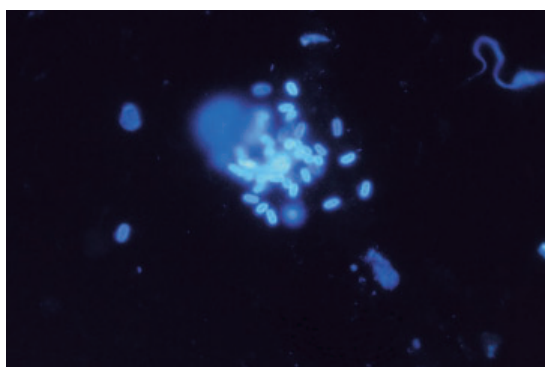


Figura 14a.17. Tinción con blanco de calcoflúor de esporas de *Encephalitozoon hellem*.

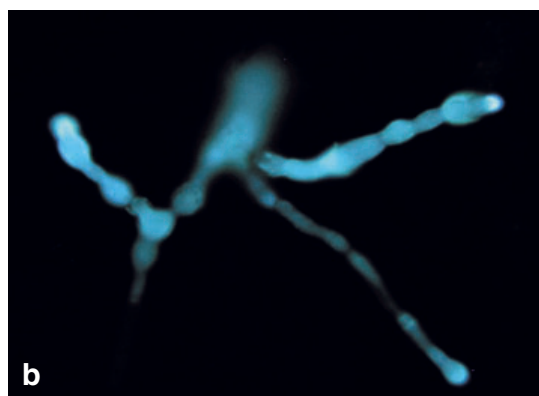


Figura 14a.18. Microscopía de campo brillante (a) y tinción con blanco de calcoflúor (b) de un absceso cerebral por *Cladophialophora bantiana*.

puede evitar con un calentamiento suave o por filtración o centrifugación. La dilución de trabajo se puede establecer en función del ABF, pero se suele utilizar una dilución 1:1 o 1:9 del ABF en una solución acuosa de KOH (10%) y glicerina (10%).

Se debe comprobar el rendimiento de la tinción con un cultivo de *C. albicans* como control positivo. Una vez dispuesta la muestra sobre un portaobjetos, se añade la solución de trabajo, se coloca el cubre y se puede inmediatamente observar al microscopio. 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.

Sistema de iluminación. La intensidad de la fluorescencia de los ABF no hace imprescindible el uso del radiador de vapor de mercurio. Desde el perfeccionamiento de los filtros de interferencia tampoco es obligado el uso de un sistema de Epi-iluminación siendo suficiente el más económico de luz transmitida o Diafluorescencia.

Sistema de filtros. La elección del juego de filtros (Excitador/Espejo dicróico y Barrera) depende sobre todo de las propiedades espectrales (espec-

trofluorimetría) de cada ABF. En general, estas moléculas tienen un pico de emisión de 360 nm y uno de fluorescencia a 420 nm. Por ello, 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

“Falsas verdades” sobre los blanqueadores fluorescentes:

1. Es necesario utilizar colorante de contraste o contratinción. **Falso.** Una de las ventajas de los ABF es que, ligados a elementos fúngicos y sometidos a radiación UV, producen una fluorescencia brillante y estable, mientras que el fluorocromo no ligado es altamente inestable y su exposición a la luz UV induce un rápido “fading”, oscureciendo el fondo, produciéndose un “lavado por irradiación” del ABF no ligado.
2. Es necesario utilizar fuente de vapor de mercurio. **Falso.** La alta fluorescencia de los ABF (Quantum Yield próximo a 1) hace que radiadores con baja emisión en el UV (lámparas halógenas) sean suficientes para el empleo de estas moléculas.
3. Es necesario usar equipo Epifluorescente. **Falso.** Por la misma razón anterior y porque en la actualidad los filtros de interferencia tienen gran eficacia, podemos emplear sistemas fluorescentes de luz transmitida o diafluorescencia (más económicos) para la realización de esta técnica.
4. Los ABF no tiñen a los hongos Dematiáceos. **Falso.** El uso de tinciones especiales y ABF aumenta la probabilidad de detectar hongos, pero no determina si la hifa es hialina o pigmentada. Se hace necesario el uso de microscopía de campo brillante en material no teñido. La ventaja de los ABF es que inducen fluorescencia sin teñir y con el mismo microscopio, bloqueando la luz UV y encendiendo la fuente de luz convencional, podemos detectar la presencia de pigmento. Aunque el pigmento melánico de los Dematiáceos bloquea, en alguna medida, la diana de los ABF, no lo hacen totalmente y es posible su detección (Figura 14a.18).
5. Los ABF no tiñen *Pneumocystis*, *Coccidioides* y *C. glabrata*, entre otros. **Falso.** Se han dado a conocer diferentes excepciones a la capacidad tintorial de los ABF por diferentes laboratorios en diferentes partes del mundo. En ningún caso se han podido mantener estas afirmaciones con carácter general. Cabe la posibilidad de que las condiciones de la técnica (ABF, fuente de luz y filtros particulares) puedan explicar en parte estas discrepancias.

©2007 Revista Iberoamericana de Micología - ISBN: 978-84-611-8776-8

una fluorescencia del hongo azul-plata (Figura 14a.19). Otra posibilidad es un Violeta V (Exc:380-420/EspDic:430/Bar:450) aunque el hongo se vería más verde. 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 (Figura 14a.20).

Inmunofluorescencia

Los anticuerpos marcados con fluorocromos (conjugados) fueron usados por primera vez en Microbiología en 1942 por Albert Coons et al. [22] para localizar un antígeno neumocócico en tejidos. El procedimiento aúna la especificidad de la unión antígeno-anticuerpo a la sensibilidad de un marcador fluorescente ligado químicamente al anticuerpo sin alterar su reactividad inmunológica. A partir de los años 50 se empezó a utilizar la inmensa potencialidad de la inmunofluorescencia para el diagnóstico en la detección de microorganismos y en la valoración de la respuesta serológica: detección de anticuerpos. La tecnología de hibridomas y aparición de los anticuerpos monoclonales ha tenido un impacto muy significativo en el diseño de pruebas inmunodiagnósticas, incluida la inmunofluorescencia, al mejorar la especificidad de los anticuerpos.

El fluorocromo más utilizado en los laboratorios de Microbiología es Isotiocianato de Fluoresceína (FITC) por su estabilidad en soluciones acuosas, intensidad y ausencia de interferencia con la reacción inmunológica. Tiene un pico de



Figura 14a.19. Tinción con blanco de calcoflúor de una esofagitis candidiásica utilizando un filtro Filtro UV-2A.



Figura 14a.20. Tinción con blanco de calcoflúor de una esofagitis candidiásica utilizando un filtro Filtro BV-2A.

excitación o absorción en 490 nm y un pico de fluorescencia o emisión en 525 nm, muy cercanos al de otros fluorocromos de uso habitual en los laboratorios de microbiología (Auramina y Naranja de Acridina).

La Inmunofluorescencia Directa (IFD) y la Indirecta (IFI) son los procedimientos más ampliamente utilizados. En la IFD el antígeno se expone directamente al anticuerpo fluorescente durante un tiempo adecuado, luego se lava y se observa al microscopio de fluorescencia. En la IFI la presencia de un antígeno se revela primero por su exposición a anticuerpos no marcados, luego se lava y se marcan estos con anti-anticuerpos conjugados a FITC, se lava de nuevo y se examina al microscopio de fluorescencia.

Las células fúngicas que expresen el antígeno reconocido por el anticuerpo monoclonal utilizado presentarán fluorescencia amarillo-verde. (Figura 14a.21). Esta técnica puede utilizarse en combinación con la tinción con quimiofluorescentes (Figura 14a.14).

Inmunofluorescencia indirecta:

Reactivos

- Anticuerpos monoclonales contra diversos hongos y anti-Ig (DAKO Diagnósticos).
- Tampón Fosfato Salino (PBS): NaH_2PO_4 0,386 g, Na_2HPO_4 1,02 g, NaCl 8,5 g, Agua destilada 1 l. Ajustado a pH 7,2.
- PBS-Azul de Evans-Tween 20 (PBS-ET): Tween 20 0,5 ml, Azul de Evans 0,5 g, PBS 1 l.
- Tampón Carbonato-Bicarbonato: Na_2CO_3 53g, NaHCO_3 42g, Agua destilada 1 l. Ajustado a pH 9,0.
- Glicerina Tamponada: Glicerina 90 ml, Tampón Carbonato-Bicarbonato 10 ml.

Procedimiento

1. Los cortes histológicos se desparafinan y se lavan con PBS durante 10 min.
2. La preparación se cubre con 500 μl del anticuerpo monoclonal específico para el hongo buscado diluido 1:50 en PBS-ET y se incuba en cámara húmeda a 37 °C durante 30 min.
3. Tras la incubación, el portaobjetos se lava en PBS y se incuba de nuevo en las mismas condiciones del paso anterior con un conjugado anti-Ig de ratón marcado con isotiocianato de fluoresceína (DAKO), diluido 1:100 en PBS-ET.
4. Posteriormente, el portaobjetos se lava con PBS, se monta con la glicerina tamponada y se observa en un microscopio equipado para fluorescencia.

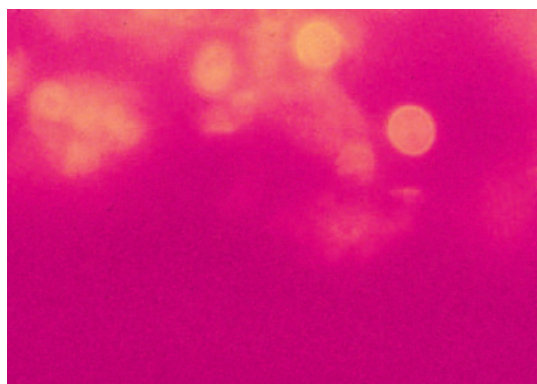


Figura 14a.21. Inmunofluorescencia indirecta con un antisuero anti-*C. albicans* para demostrar la presencia de *Candida* en tejido esofágico.

Tinciones para *Pneumocystis jiroveci*

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. Es éste sin duda un paradigma de la importancia de la toma de muestra, siendo su rentabilidad diagnóstica pareja a su invasividad; desde el esputo inducido, LBA a la biopsia pulmonar abierta. La elección de la muestra dependerá de varios factores que valorará el clínico responsable, pero de forma general el esputo inducido y el LBA son los más utilizados (Capítulo 5) [23,24].

Preparación de la muestra

El adecuado procesamiento de las muestras es un paso crítico en el diagnóstico microscópico de la neumocistosis. De forma general se inicia con la fluidificación: las muestras que contengan mucosidad deben fluidificarse con un agente mucolítico (Ditiotreitol o N-acetil cisteína), añadido en una proporción entre igual a dos veces el volumen de la muestra (2-3 ml). Se deja actuar el mucolítico durante 15 min a temperatura ambiente, con algún período de agitación en vórtex. Si el volumen de muestra fuera >20 ml, se puede concentrar por centrifugación antes de la adición del mucolítico. Una vez fluidificada, centrifugar la muestra a 1.500 g durante 5 min. Decantar el sobrenadante y resuspender el sedimento con la ayuda de una pipeta Pasteur. Las muestras líquidas no mucosas (Ej. LBA), no requieren normalmente tratamiento mucolítico, se pueden concentrar por centrifugación o utilizando una citocentrífuga a 1.200 rpm durante 10 min, utilizando portas silanizados o añadiendo una gota de seroalbúmina bovina para mejorar la adhesión.

El tratamiento inicial es distinto si se trata de un esputo, aspirado bronquial o LBA.

Tras la preparación y concentración, se puede depositar directamente una gota del sedimento en el centro de un portaobjetos o utilizar 200 μ l para la citocentrífuga. Se seca al aire, y, en el caso de realizar tinción de Giemsa o tinción argéntica, se fija con metanol.

La visualización puede hacerse de forma directa sin coloración [25] o tras realizar una tinción. Se han descrito tinciones muy diferentes y cada laboratorio ha incorporado a su rutina particular algunas de ellas en función de coste, tiempo, disponibilidad de personal y equipo, tipo de pacientes, número de pruebas, experiencia, etc.

©2007 Revista Iberoamericana de Micología - ISBN: 978-84-611-8776-8

Espuito

1. Añadir a 2-3 ml del esputo el mismo volumen de ditiotreitolo al 0,3% (1,5 g en 500 ml agua destilada).
2. Agitar e incubar 5 min a 37 °C.
3. Añadir un volumen igual de PBS y agitar hasta conseguir una buena mezcla. Centrifugar a 1.500 g, 10 min.
4. Retirar el sobrenadante y resuspender el sedimento con 500 μ l de PBS. Si no se ha eliminado todo el moco de la muestra, se repiten los pasos 1 y 2.

Aspirado bronquial y LBA

1. Se centrifuga la muestra a 1.500 g, 10 min.
2. Retirar el sobrenadante.
3. Resuspender el sedimento en un pequeño volumen de PBS hasta que la densidad del material no sea excesiva.

Las tinciones de *P. jiroveci* se pueden clasificar según su diana:

1. Tinciones de formas tróficas (trofozoitos)

Tinciones Romanowsky-Giemsa o alguna modificación más rápida como el Diff-Quik (< 5min) que tiñen *P. jiroveci* y otros hongos, *Cryptococcus* e *Histoplasma*, así como protozoos (*Toxoplasma*).

2. Tinciones de la pared quística

Tinciones Argénticas (Ej. Grocott rápido, aproximadamente 2 h), Azul de Toluidina O (20 min) y Tinciones con Quimiofluorescentes (Ej. Blanco de Calcofluor, 1 min), que tiñen los engrosamientos de la pared en forma de doble coma que los caracteriza y facilita su detección aún en manos inexpertas.

3. Tinciones Inmunofluorescentes

Tiñen las formas tróficas y los quistes. Estas técnicas demuestran su mayor utilidad cuando no se dispone de la muestra más idónea (Ej. esputo inducido) o cuando el número de organismos sea bajo, como en la neumocistosis extrapulmonar. Aún siendo las más sensibles, no son la más específicas, por lo que se recomienda otra técnica confirmatoria [26].

Tinción rápida de Giemsa

Se pueden utilizar técnicas comerciales como Diff-Quik o Giemsa Plus (Figura 14a.22).

1. Se añaden 1 ó 2 gotas de la solución roja (solución 1) sobre la muestra, se deja actuar durante 10 segundos y se escurre.
2. Se añaden 1 ó 2 gotas de la solución azul (solución 2), se deja durante 10 segundos, se escurre y se lava muy ligeramente con agua desionizada.
3. Se deja secar y se procede a la observación de la muestra.

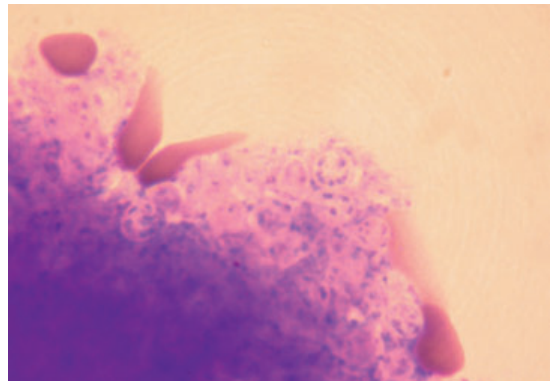


Figura 14a.22. Tinción Diff-Quick de un LBA.

Tinción de Giemsa

La solución de trabajo se debe preparar nueva cada día a partir de la solución comercial, diluyendo al 1:20 en tampón fosfato conteniendo 0,01% de Triton X-100. En esta solución se introduce el portaobjetos con la muestra fijada, manteniéndose durante 30 min. Al cabo de este tiempo, se introduce en tampón fosfato, se escurre y se deja secar al aire.

Tinción Argéntica Rápida (Gomori-Grocott modificada)

1. Cubrir el portaobjetos con la muestra fijada con una solución de ácido crómico al 10%, dejando actuar durante 10 min (se puede acortar al utilizar un microondas durante 40 segundos). Pasado este tiempo se lava el portaobjetos con agua desionizada.
2. Cubrir con una solución de metabisulfato sódico al 1% durante 1 min.
3. Lavar con agua desionizada e introducir el portaobjetos en un recipiente donde se ha preparado previamente la solución de trabajo de metenamina-nitrato de plata, con los siguientes componentes en este orden: 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 desionizada. 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).
4. 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 tinte 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.
5. En ambos casos, transcurrido el tiempo correspondiente, sacar el portaobjetos y lavar con agua desionizada.
6. Sumergir el portaobjetos en una solución de cloruro de oro al 1% de 2 a 5 segundos; seguidamente, lavar con agua desionizada.
7. Cubrir el portaobjetos con una solución de tiosulfato sódico al 5% durante 1 min. Lavar de nuevo con agua desionizada.
8. Cubrir con una solución al 0,2% de verde brillante en ácido acético glacial durante 1 min. Lavar con agua desionizada, escurrir el portaobjetos y dejar secar.

Azul de Toluidina O modificada (ATO) [27] (Figura 14a.23)

Reactivos

- Reactivo de sulfatación: Para 5 ml (2 portas). Añadir a un matraz Erlenmeyer, sobre hielo picado, 4,5 ml de ácido acético glacial. Añadir lentamente 1,5 ml de ácido sulfúrico con pipeta de vidrio y homogeneizar.

Esta solución se puede mantener a temperatura ambiente durante una semana.

- Solución de ATO: Para 100 ml. Se preparan dos soluciones:
 1. Azul de Toluidina O (Fisher/Aldrich/Merck) 150 mg en 30 ml de agua destilada.
 2. 1 ml de ácido clorhídrico en 70 ml de etanol absoluto.

Mezclar hasta disolución y filtrar. Se puede guardar a temperatura ambiente aproximadamente 1 año.

Técnica

1. Fijación con etanol absoluto durante 1 min y secado al aire.
2. Cubrir 10 min con reactivo de sulfatación.
3. Escurrir, lavar 5 min con agua corriente.
4. Teñir con la solución de ATO durante 3 min.
5. Inmersión en etanol 95% unos segundos hasta que deje de escurrir colorante azul (10 segundos).
6. Inmersión en etanol 100% durante 10 segundos.
7. Inmersión en xilol durante 10 segundos.
8. Montaje con Permount o DPX.

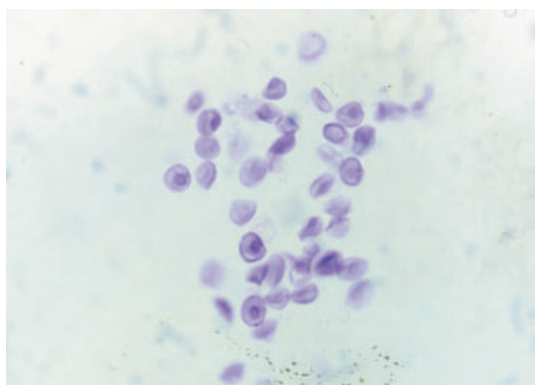


Figura 14a.23. Tinción con Azul de Toluidina O de una muestra pulmonar de un paciente con aspergilosis invasora y neumocistosis.

Tinciones con quimiofluorescentes

En 1990 Vickie Baselski et al. [28] demostraron la utilidad de lo quimiofluorescentes en el diagnóstico de *P. jiroveci* (Figura 14a.24). No todos los ABF tiñen los quistes de *P. jiroveci* adecuadamente, Uvitex 2B es el que peor resultados proporciona [29,30]. Esta tinción permite reconocer fácilmente, y a muy bajos aumentos (x100), el material eosinofílico esponjoso y los quistes característicos.

Técnica

1. Teñir las extensiones con la solución de trabajo de CW durante 1-3 min.
2. Lavar con agua y montar.

Tinciones con anticuerpos

Uno de los puntos débiles de la observación microscópica de la muestra clínica es su escasa sensibilidad, sobre todo cuando el hongo se encuentra en una baja concentración (Figura 14a.25). En estos casos pueden utilizarse anticuerpos dirigidos contra antígenos específicos de los hongos para facilitar su observación y conseguir la identificación del hongo. La utilización de anticuerpos tiene particular interés en la identificación de *P. jiroveci* en muestras respiratorias y extrapulmonares, así como en la identificación de diversos hongos en cortes histológicos, incluso después de que la fijación impida su cultivo [4].

Monofluo™ Kit *P. carinii* (Bio-Rad)

La prueba es una inmunofluorescencia directa para detectar *P. jiroveci* en LBA, aspirados bronquiales y esputos inducidos utilizando anticuerpos monoclonales que reaccionen específicamente con antígenos de la pared del quiste y de las formas tróficas de *P. jiroveci* (Figura 14a.26).

Técnica

1. Tras la preparación previa de la muestra, dispensarla en el pocillo de reacción, dejar secar a 37 °C y, posteriormente, fijar con metanol y dejar secar a temperatura ambiente.
2. Agregar el conjugado fluorescente al pocillo, en una cantidad suficiente (2-3 gotas) para cubrir la muestra sin rebasar los límites del pocillo.
3. Incubar en cámara húmeda durante 30-35 min a 37 °C.
4. Eliminar el exceso de reactivo fluorescente, dejando escurrir sobre papel absorbente.
5. Lavar en jarra de Coplin con agua desionizada durante 1 min, con agitación suave de forma intermitente. Eliminar el exceso escurriendo sobre papel absorbente.
6. Secar al aire o en calentador de portaobjetos a 37 °C. Aplicar una o dos gotas de medio de montaje y colocar un cubreobjetos procurando evitar que se formen burbujas de aire.
7. Examinar los portaobjetos en las 2-3 h posteriores a la coloración (se pueden mantener a 4 °C en oscuridad 24 h y hasta 6 meses a temperaturas menores o iguales que -20 °C). Observar mediante microscopio de fluorescencia con filtro habitual para fluoresceína (450-490/505/520nm) a x200 y pasar a más aumentos para confirmar el patrón de tinción característico. El anticuerpo tiñe de color verde claro los quistes y trofozoitos, tanto dentro como fuera de la matriz extracelular esponjosa que también se tiñe del mismo color.

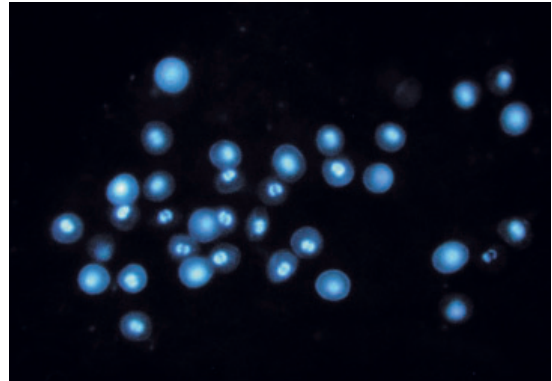


Figura 14a.24. Tinción de *P. jiroveci* con un agente quimiofluorescente.

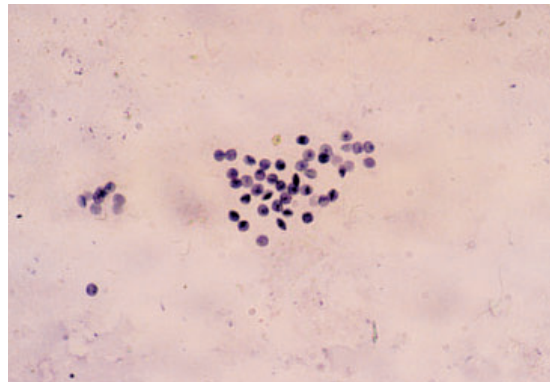


Figura 14a.25. Tinción argéntica de *P. jiroveci*. (Cortesía del Dr. M. Álvarez).

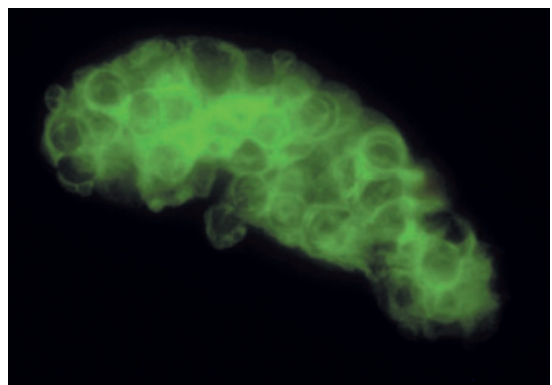


Figura 14a.26. Observación de *P. jiroveci* mediante inmunofluorescencia indirecta con el Monofluo™ Kit *P. carinii* (Bio-Rad).

Se agradece a los Drs. Reinhard Rüchel, Ricardo Salesa y Mikel Alvarez la cesión de algunas de las figuras mostradas.

Referencias

1. Roberts GD. Detection of fungi in clinical specimens by phase-contrast microscopy. *J Clin Microbiol* 1975; 2: 261-265.
2. Pontón J. Diagnóstico microbiológico de las micosis. *Rev Iberoam Micol* 2002; 19: 25-29.
3. García Ruiz JC, Hernández I, Muñoz F, Alvarez Blanco A, Pontón J. Cholangitis due to *Aspergillus fumigatus* in a patient with acute leukemia. *Clin Infect Dis* 1998; 26: 228-229.
4. Binder C, Ruchel R. Mixed systemic mycosis with fatal outcome in a patient with acute myeloblastic leukaemia. *Mycoses* 2000; 43: 59-63.
5. Ruchel R, Schffrinski M. Versatile fluorescence staining of fungi in clinical specimens by using the optical brightener Blankophor. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 2694-2696.
6. Andreas S, Heindi S, Wattky C, Möller K, Ruchel R. Diagnosis of pulmonary aspergillosis using optical brighteners. *Eur Respir J* 2000; 15: 407-411.
7. Barenfanger J. Identification of yeasts and other fungi from direct microscopic examination of clinical specimens. *Clin Microbiol Newsl* 1990; 12: 9-15.
8. Aslanzadeh J, Roberts GD. Direct microscopic examination of clinical specimens for the laboratory diagnosis of fungal infections. *Clin Microbiol Newsl* 1991; 13: 185-188.
9. Sato Y, Osabe S, Kuno H, Kaji M, Oizumi K. Rapid diagnosis of cryptococcal meningitis by microscopic examination of centrifuged cerebrospinal fluid sediment. *J Neurol Sci* 1999; 164: 72-75.
10. Margarot J, Deveze P. Aspect de quelques dermatoses en lumière ultraparaviolette. Note préliminaire. *Bull Soc Sci Med Biol Montpellier* 1925; 6 : 375-378.
11. Graham AR. Fungal autofluorescence with ultraviolet illumination. *Am J Clin Pathol* 1983; 79: 231-234.
12. Mann J. Autofluorescence of fungi: an aid to detection in tissue section. *Am J Clin Pathol* 1983; 79: 587-590.
13. Ghali VS, Garcia RL, Skolom J. Fluorescence of *Pneumocystis carinii* and Papanicolaou smears. *Human Pathol* 1984; 15: 907-909.
14. Hicks JD, Matthaei E. A selective fluorescence stain for mucin. *J Path Bact* 1958; 75: 473-476.
15. Chick EW. Acridine orange fluorescent stain for fungi. *Arch Dermatol* 1961; 83: 305-309.
16. Slifkin M, Cumble R. Congo red as a fluorochrome for the rapid detection of fungi. *J Clin Microbiol* 1988; 26: 827-830.
17. Darken, M. Application of fluorescent brighteners in biological techniques. *Science* 1961; 133: 1704-1705.
18. Hageage GJ, Harrington BJ. Use of Calcofluor White in clinical mycology. *Lab Med* 1984; 15: 109-112.
19. Holländer H, Keilig W, Bauer J, Rothmund E. A reliable stain for fungi in tissue sections and clinical specimens. *Mycopathologia* 1984; 88: 131-134.
20. Monheit JE, Cowan DF, Moore DG. Rapid detection of fungi in tissues using Calcofluor White and fluorescence microscopy. *Arch Pathol Lab Med* 1984; 108: 616-618.
21. Ruchel R, Behe M, Torp B, Laatsch H. Usefulness of optical brighteners in medical mycology. *Rev Iberoam Micol* 2001; 18: 147-149.
22. Coons AH, Creech HJ, Jones RN, Berliner E. The demonstration of pneumococcal antigen in tissues by the use of fluorescent antibody. *J Immunol* 1942; 45: 159-170.
23. Baughman RP. Current methods of diagnosis. En: Walter PD (Ed.) *Pneumocystis carinii* pneumonia, 2ª edición. NY, Marcel Dekker Inc., 1994: 388-392.
24. Cushion MT. *Pneumocystis*. En: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Phaller MA, Tenenck RH (Ed.) *Manual of Clinical Microbiology*, 8ª edición. Washington D.C., ASM Press, 2003: 1712-1725.
25. Ruffolo JJ, Cushion MT, Walzer PD. Techniques for examining *Pneumocystis carinii* in fresh specimens. *J Clin Microbiol* 1986; 23: 17-21.
26. Procop GW, Haddad S, Quinn J, Wilson ML, Henshaw NG, Reller LB, Artymyshyn RL, Katanik MT, Weinstein MP. Detection of *Pneumocystis jirovecii* in respiratory specimens by four staining methods. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 3333-3335.
27. Gosey LL, Howard RM, Witebsky FG, Ognibene FP, Wu TC, Gill VJ, MacLowry JD. Advantages of modified toluidine blue O stain and broncoalveolar lavage for diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia. *J Clin Microbiol* 1985; 22: 803-807.
28. Baselski VS, Robison MK, Pifer LW, Woods DR. Rapid detection of *Pneumocystis carinii* in broncoalveolar lavage samples by using Cellufluor staining. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 393-394.
29. Harrington BJ, Hageage GJ. Calcofluor white: tips for improving its use. *Clin Microbiol Newsl* 1991; 13: 3-5.
30. Koch H, Pimsler M. Evaluation of Uvitex 2B: A nonspecific fluorescent stain for detecting and identifying fungi and algae in tissue. *Lab Med* 1987; 18: 603-606.

José Pontón
Marta E. García
Ramiro López Medrano

14b.1. 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 diversos 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 de estas 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* y la detección de galactomanano en pacientes con aspergilosis invasora.

14b.2. Detección de antígeno

14b.2.1. Aplicaciones a las micosis habituales en nuestro medio

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 min, de aproximadamente el 99% de las meningitis criptocócicas [1] y el 67% de las criptococosis diseminadas [2]. El cultivo y aislamiento de *C. neoformans* puede requerir varios días debido a que se trata de una levadura de crecimiento lento.

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 sida. La técnica consiste en la detec-

ción de antígeno capsular criptocócico, que es de naturaleza polisacáridica, mediante anticuerpos monoespecíficos 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.

Crypto-LA Test (Wampole Labs.)

La muestra más adecuada es LCR, pero la detección de antígeno también puede realizarse en suero.

Reactivos y material

Además de los reactivos proporcionados con la prueba, se necesitan los siguientes reactivos y materiales:

- Tubos cónicos de centrífuga (15 ml)
- Centrífuga equipada con adaptadores para tubos de 15 ml
- Tubos de ensayo de vidrio
- Parafilm
- Hornillo de mesa
- Portaobjetos desengrasados y cubreobjetos
- Micropipetas (20-100 µl)
- Agitador orbital (160 rpm)
- Pipetas de plástico desechables
- 2-mercaptoetanol (Merck)

Almacenamiento y transporte de las muestras de LCR y/o suero

1. Procesamiento en menos de 48 h: refrigerar a 2-8 °C.
2. Procesamiento después de 48 h: congelar a -20°C. No congelar y descongelar innecesariamente.
3. Envío a centros de referencia: añadir timerosal a 1:10.000, envasar adecuadamente y enviar a temperatura ambiente.

Procesamiento del LCR

1. Realizar la punción lumbar del modo más aséptico posible. El volumen mínimo requerido para la realización de la prueba es de 0,2 ml, pero se aconseja un mayor volumen para realización de otras pruebas como bioquímica, recuento celular, tinta china y cultivos.
2. Centrifugar a 1000 g durante 10 min.
3. Extraer al menos 0,2 ml del sobrenadante y depositarlos en el fondo de un tubo de vidrio, que se sella con parafilm.
4. En un baño a 56 °C sumergir el fondo del tubo durante 30 min para inactivar el sistema de complemento. Dejar enfriar hasta que la muestra alcance la temperatura ambiente. Como alternativa puede hervirse durante 5 min a 100 °C.

Procesamiento del suero

1. Extraer asépticamente 5 ml de sangre por venopunción en un tubo libre de anticoagulantes. El volumen mínimo para la realización de la prueba es de 0,2 ml de suero por lo que se precisa extraer un volumen mínimo de 0,5 ml de sangre total. Esta prueba no debe realizarse sobre plasma.
2. Permitir la formación de coágulo dejando el tubo en reposo durante 30 min a 21-25 °C.
3. Centrifugar a 1.000 g durante 15 min.
4. Transferir al menos 0,2 ml de suero al fondo de un tubo de vidrio que se sella con parafilm.
5. En un baño a 56 °C sumergir el fondo del tubo durante 30 min para inactivar el sistema de complemento. Dejar enfriar hasta que la muestra alcance la temperatura ambiente. Como alternativa puede hervirse durante 5 min a 100 °C.

Técnica cualitativa

1. Habitualmente se emplea un soporte de vidrio con las celdillas excavadas para depositar sobre él los diferentes reactivos. Se comienza marcando un par de celdillas por cada muestra a probar, una para el látex reactivo y otra para el látex control.
2. Se añaden 50 µl de muestra a cada celdilla del par.
3. Se añaden 50 µl de control positivo en su celdilla y 50 µl de control negativo en la suya. Es recomendable colocar los controles en el otro extremo de la placa de vidrio para evitar mezclas de muestras y controles en la fase de agitación.
4. Se añaden 50 µl de látex reactivo en las celdillas superiores y en los controles positivo y negativo.
5. Se añaden 50 µl de látex control en las celdillas inferiores de la placa de vidrio.
6. Con diferentes palillos, se mezclan los reactivos y las muestras dentro de cada celdilla y lo mismo se hace con los controles positivo y negativo.
7. Se coloca la placa de vidrio en un agitador por rotación a 160 rpm durante 10 min.

Lectura e interpretación de los resultados

Colocar la placa de vidrio bajo una luz potente y sobre fondo oscuro en busca de aglutinación visible a simple vista. Lo primero que se debe mirar es el control positivo. La interpretación de los resultados será la siguiente:

- * *Control positivo:* presencia de aglutinación en la celdilla con látex reactivo y ausencia en la de látex control.
- * *Control negativo:* ausencia de aglutinación en ambas celdillas de látex reactivo y de látex control.
- * *Muestra positiva:* aglutinación en la celdilla de látex reactivo con ausencia de aglutinación en la celdilla de látex control. Si también se obtiene aglutinación en la celdilla de látex control la prueba se considera positiva.
- * *Muestra negativa:* ausencia de aglutinación en la celdilla de látex reactivo con independencia de la presencia de aglutinación o no en la celdilla de látex control.

Técnica cuantitativa

1. Preparar una batería de 8 tubos por cada muestra y una más para el control positivo, rotulando cada uno de los tubos.
2. Pipetear 250 µl de diluyente de muestra en cada uno de los 8 tubos para obtener diluciones seriadas de 1:2 hasta 1:256.
3. Pipetear 250 µl de muestra o de control positivo en el primer tubo de cada serie.
4. Mezclar con la pipeta la muestra y el diluyente en el primer tubo y transferir 250 µl al siguiente tubo, mezclar y repetir sucesivamente hasta el octavo tubo. Hacer lo mismo con la batería de tubos de dilución del control positivo.
5. Emplear una placa de vidrio por cada muestra/paciente y añadir 50 µl de cada tubo a cada par de celdillas (de látex reactivo y de látex control) comenzando por la muestra más diluida para evitar el efecto arrastre.
6. Añadir 50 µl de látex reactivo en cada una de las 8 celdillas, mezclando bien con un bastoncillo diferente cada vez.
7. Añadir 50 µl de látex control en cada una de las 8 celdillas de control y mezclar bien cada una de ellas.
8. Rotar durante 10 min a 160 rpm en un agitador-rotador.

Lectura e interpretación de los resultados

La lectura se realiza de forma análoga a la de la técnica cualitativa.

- * *Resultado positivo:* dilución más alta en que se observa aglutinación visible en la celdilla de reacción con ausencia de aglutinación en la celdilla de control. Cuando las celdillas de control muestran aglutinación se considera el resultado

positivo cuando hay una diferencia de al menos cuatro diluciones entre la aglutinación de la celdilla reactiva y la de control.

- * **Resultado negativo:** la técnica cuantitativa se emplea cuando la cualitativa haya sido positiva. Sin embargo, puede ocurrir que sea positiva en la muestra sin diluir pero al diluir al cincuenta por ciento (primera dilución) no se obtenga aglutinación. En este caso el resultado de la técnica cualitativa debe interpretarse como negativo.

Unos consejos...

- Si aparece aglutinación en la celdilla de látex control del control positivo o en alguna de las celdillas del control negativo, la prueba es inválida y debe repetirse. La aglutinación del control positivo es evidente a los pocos minutos, visible a simple vista y no deja lugar a dudas.
- La sensibilidad de las diferentes técnicas comercializadas varía entre el 93% y el 100% con un 93-98% de especificidad. Puede haber falsos positivos debidos a la presencia de factor reumatoide o en pacientes con lupus o sarcoidosis, que desaparecen al tratar el suero con pronasa o 2-mercaptoetanol. También se han descrito falsos positivos al arrastrar medio de cultivo de agar chocolate junto con la colonia, asas de platino o desinfectantes. La prueba es positiva en la infección sistémica por *Trichosporon ashii*.

Detección de antígeno capsular con anticuerpos monoclonales

Se han comercializado técnicas de detección de antígeno capsular criptocócico basadas en EIA con anticuerpos monoclonales como Premier EIA Assay (Meridian Diagnostics, Cincinnati, USA). Estas técnicas son rápidas y específicas y no presentan falsos positivos en pacientes con lupus o debido a la presencia de factor reumatoide. Además, se han empleado con éxito sobre muestras de orina de pacientes con meningitis criptocócica, con alto grado de correlación con la antigenemia en LCR y constituyen una alternativa menos invasora en estos pacientes.

Candidiasis

A pesar del gran número de antígenos estudiados, la detección de antígeno en pacientes con candidiasis invasora no ha permitido solucionar el problema diagnóstico que presenta esta micosis y no existe una prueba aceptada universalmente. La detección de manano parece ser más sensible y específica que el Cand-Tec, y ya que la detección de manano por aglutinación de partículas de látex puede estar al límite de detección de la técnica, es

posible que el formato ideal para su detección sea el ELISA. La comercialización de pruebas para la detección de antígenos de *Candida* debería de haber facilitado el diagnóstico serológico de la candidiasis invasora al disponerse de pruebas estandarizadas. Sin embargo, los resultados obtenidos hasta el momento son poco esperanzadores, al haberse retirado del mercado varias pruebas, presentado las que quedan bastante variabilidad en las evaluaciones realizadas. Dado que la antigenemia en los pacientes con candidiasis invasora es transitoria, es posible que se necesite la combinación de técnicas que detecten diferentes antígenos o epitopos para aumentar la sensibilidad diagnóstica [3].

Platelia Candida Ag

(Bio-Rad)

Es un ELISA que detecta manano en suero utilizando el anticuerpo monoclonal EBCA1. Este anticuerpo reconoce residuos β -1,5 del manano de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis* y *C. pseudotropicalis* pero no de *C. krusei*. El límite de detección de la prueba es 0,25 ng/ml de suero. Para aumentar su rendimiento, el fabricante aconseja utilizarla conjuntamente con la técnica de detección de anticuerpos Platelia *Candida* Ac/Ak/Ab.

Reactivos y material

Además de los reactivos proporcionados con la prueba, se necesitan los siguientes reactivos y materiales:

- Pipetas de 50, 100, 300 y 1.000 μ l.
- Tubos Eppendorf o similares de 1,5 ml con tapones herméticos que resistan el calentamiento a 100 °C.
- Centrífuga para tubos de 1,5 ml que permita la centrifugación a 10.000 g.
- Agitador para tubos.
- Baño para hervir las muestras.
- Baño o estufa para incubar las muestras a 37 °C.
- Lavador de microplacas.
- Lector de microplacas equipado con filtros de 450 y 620 nm.

Almacenamiento y transporte de las muestras de suero

1. Procesamiento en menos de 24 h: refrigerar a 2-8 °C.
2. Procesamiento después de 24 h: congelar a -80 °C. No congelar y descongelar innecesariamente.

Procesamiento del suero

1. Extraer asépticamente la sangre por venopunción en un tubo libre de anticoagulantes. Permitir la formación de coágulo dejando el tubo en reposo durante 30 min a 21-25 °C. Retirar rápidamente el coágulo para evitar la hemólisis del suero.

- Se introducen 300 µl del suero a estudiar en un tubo Eppendorf de 1,5 ml.
- Se añaden 100 µl de la solución de tratamiento proporcionada con la prueba. Cerrar el tubo con tapón hermético.
- En un termobloque a 120 °C introducir el tubo durante 6 min para liberar el manano de los complejos con los anticuerpos.
- Centrifugar a 10.000 g durante 10 min. Retirar el sobrenadante para la detección de manano.

Técnica

- Se añaden 50 µl de conjugado a cada uno de los pocillos de las placas de la prueba que se vayan a utilizar.
- Se añaden 50 µl del sobrenadante de cada uno de los sueros tratados en su pocillo. En pocillos diferentes, se añaden también 50 µl de los sueros negativo y positivo, así como de los calibradores para la realización de la curva patrón.
- Se cubren los pocillos con plástico adhesivo y se incuban a 37 °C durante 90 min.
- Se lavan los pocillos 5 veces rellenándolos cada vez con 370 µl de la solución de lavado y se secan los pocillos invirtiéndolos sobre papel de filtro.
- Se añaden 200 µl de la solución sustrato-cromógeno a cada uno de los pocillos y se incuban en la oscuridad, a temperatura ambiente, durante 30 min.
- Se añaden 100 µl de la solución de parada a cada pocillo, utilizando el mismo orden que se siguió para añadir el sustrato.
- Se limpia el fondo de los pocillos y se lee la densidad óptica a 450 nm utilizando un lector de placas. Esto debe hacerse dentro de los 30 min siguientes a realizarse la parada de la reacción.

Interpretación de los resultados

Previamente, preparar la recta patrón utilizando los resultados de los calibradores. Calcular la concentración de antígeno 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 0,5 ng/ml.
- * *Resultado intermedio*: concentración entre 0,25 y 0,5 ng/ml.
- * *Resultado negativo*: concentración inferior a 0,25 ng/ml.

Unos consejos...

- Los sueros con concentraciones superiores a 2,5 ng/ml deben diluirse 1:5 con el suero control negativo y volverse a estudiar.
- El tratamiento del suero para liberar el manano de los inmunocomplejos es un paso crítico en la técnica. Tradicionalmente, se utilizaba el calentamiento a 100 °C durante 3 min. Para asegurarse que los sueros alcanzan la temperatura apropiada el tiempo necesario se recomienda calentar los tubos en un termobloque a 120 °C durante 6 min.
- Un resultado negativo no excluye el diagnóstico de candidiasis invasiva, ya que la mananemia es de corta duración. Se ha demostrado la existencia de una complementación 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 invasiva que no tenga manano puede tener altos títulos de anticuerpos anti-manano y viceversa [4].
- Reduciendo el punto de corte a 0,25 ng/ml, Prella et al. [5] han detectado manano en 10/28 pacientes (36%) con candidiasis invasora. Cuando los resultados de la detección de manano se combinaron con los de la detección de anticuerpos anti-manano, obtuvieron una sensibilidad de 89%, una especificidad del 84%, un valor predictivo positivo del 86% y un valor predictivo negativo del 88%.
- La prueba puede ser positiva en pacientes tratados con Expafusin, debido a la reactividad del anticuerpo monoclonal con el almidón.

Aspergilosis

La detección de antígeno se considera la posibilidad más interesante para el diagnóstico de la aspergilosis invasora en pacientes neutropénicos. La detección de galactomanano mediante un ELISA comercializado permite el diagnóstico de la aspergilosis invasora con una especificidad del 89,6% y una sensibilidad del 87,5% [6]. 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.

Platelia *Aspergillus* EIA (Bio-Rad)

La prueba es un ELISA que detecta galactomanano en suero utilizando el anticuerpo monoclonal EBA-2, que reconoce el galactomanano de *A. fumigatus*, *A. flavus* y *A. niger*. El límite de detección de la prueba es 1 ng/ml de suero.

Reactivos y material

Además de los reactivos proporcionados con la prueba, se necesitan los siguientes reactivos y materiales:

- Pipetas de 50, 100, 300 y 1.000 µl.
- Tubos Eppendorf o similares de 1,5 ml con tapones herméticos que resistan el calentamiento a 120 °C.
- Centrífuga para tubos de 1,5 ml que permita la centrifugación a 10.000 g.
- Agitador para tubos.
- Baño para hervir las muestras.
- Baño o estufa para incubar las muestras a 37 °C.
- Lavador de microplacas.
- Lector de microplacas equipado con filtros de 450 y 620 nm.

Unos consejos...

- La realización de la prueba se debe llevar a cabo en condiciones ambientales óptimas, en una habitación donde no se realicen cultivos de *A. fumigatus*, evitando el contacto de los conidios que puedan estar presentes en el aire con el medio de los tampones, soluciones y material que entra en contacto con las muestras. Dicho material debe ser desechable y encontrarse en condiciones óptimas de limpieza y esterilización.
- La prueba se debe realizar siguiendo meticulosamente las indicaciones del fabricante. Podemos citar como excepción el caso del volumen de suero y de solución de tratamiento utilizado en el pretratamiento de las muestras, pudiéndose utilizar la mitad de lo indicado por el fabricante en aquellos casos en que nos encontremos con un volumen pequeño de suero. Tal modificación no afecta a la prueba ELISA en sí.

Almacenamiento y transporte de las muestras de suero

1. Procesamiento en menos de 24 h: refrigerar a 2-8 °C.
2. Procesamiento después de 24 h: congelar a -80 °C. No congelar y descongelar innecesariamente.

Procesamiento del suero

1. Extraer asépticamente la sangre por venopunción en un tubo libre de anticoagulantes. Permitir la formación de coágulo dejando el tubo en reposo durante 30 min a 21-25 °C. Retirar rápidamente el coágulo para evitar la hemólisis del suero.
2. Introducir 300 µl del suero a estudiar en un tubo Eppendorf de 1,5 ml.
3. Añadir 100 µl de la solución de tratamiento proporcionada con la prueba (EDTA). Cerrar el tubo con tapón hermético y homogenizar.

4. En un termobloque a 120 °C introducir el tubo durante 6 min para liberar el galactomanano de los complejos con los anticuerpos.
5. Centrifugar a 10.000 g durante 10 min. Retirar el sobrenadante para la detección de galactomanano.

Técnica

1. Los sueros liofilizados control se recomponen añadiendo 1 ml de agua destilada ultrapura estéril y esperando 2 o 3 min para permitir la rehidratación del suero, tras la cual se mezcla bien con la pipeta.
2. Se añaden 50 µl de conjugado a cada uno de los pocillos de las placas de la prueba que se vayan a utilizar.
3. Se añaden 50 µl del sobrenadante de cada uno de los sueros tratados en su pocillo. En pocillos diferentes, se añaden también 50 µl de los sueros negativo y positivo, así como de los patrones para la realización de la curva patrón.
4. Se cubren los pocillos con plástico adhesivo y se incuban a 37 °C durante 90 min.
5. Se lavan los pocillos 5 veces rellenándolos cada vez con 370 µl de la solución de lavado diluida 1/10 y se secan los pocillos invirtiéndolos sobre papel de filtro.
6. Se añaden 200 µl de la solución sustrato-cromógeno, preparada mezclando el cromógeno con el tampón sustrato (dilución 1/50), a cada uno de los pocillos y se incuba en la oscuridad, a temperatura ambiente, durante 30 min. No utilizar el plástico adhesivo en este paso.
7. Se añaden 100 µl de la solución de parada a cada pocillo, utilizando el mismo orden que se siguió para añadir el sustrato.
8. Se limpia el fondo de los pocillos y se lee la densidad óptica a 450 nm y 620 nm utilizando un lector de placas. Esto debe hacerse dentro de los 30 min siguientes a realizarse la parada de la reacción.

Interpretación de los resultados

Para interpretar los resultados se debe calcular el índice "i", aplicando la siguiente ecuación:

$$i = \frac{\text{densidad óptica de la muestra}}{\text{densidad óptica del suero umbral}}$$

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:* $i \geq 0,5$
- * *Resultado negativo:* $i < 0,5$

Unos consejos...

- Hasta hace poco, uno de los mayores inconvenientes del Platelia *Aspergillus* era la falta de consenso en el punto de corte entre Europa (1,5 ng/ml) y Estados Unidos (0,5 ng/ml), lo que creaba grandes dificultades a la hora de comparar datos. En un estudio realizado en Europa, Maertens et al. [7] estudiaron la utilidad de considerar un punto de corte estático a $\geq 0,8$ ng/ml en el diagnóstico de la aspergilosis invasora, y consideraron que un único resultado positivo para este punto de corte justificaba el comienzo de la terapia antifúngica anti-*Aspergillus*. Además consideraron que un punto de corte dinámico (dos muestras consecutivas con $\geq 0,5$ ng/ml) permitía el diagnóstico de la aspergilosis invasora con una sensibilidad del 96,5 %, una especificidad del 98,6 %, un valor predictivo positivo del 98,6 %, un valor predictivo negativo del 98,4 % y una eficiencia del 98 %. Actualmente, se considera un resultado positivo cuando el paciente presenta dos muestras consecutivas con un índice $\geq 0,5$.
- La detección de galactomanano puede verse disminuida en pacientes con enfermedad granulomatosa crónica y Síndrome de Job.
- El Platelia *Aspergillus* EIA no ha sido evaluado en profundidad en plasma, orina, BAL y LCR.
- La prueba puede dar positiva con hongos del género *Penicillium*, *Alternaria* y *Paecilomyces*.
- Algunos alimentos como los cereales, pollo, pastas y productos lácteos pueden contener galactomanano que puede ser adsorbido en niños y pacientes con alteraciones en la barrera intestinal.
- Se han comunicado resultados falsos positivos en pacientes tratados con algunos antibióticos, especialmente piperacilina-tazobactam y amoxicilina-clavulánico.

14b.3. Detección de anticuerpos

14b.3.1. Aplicaciones a las micosis habituales en nuestro medio

Criptococosis

La detección de anticuerpos en pacientes con criptococosis no tiene utilidad diagnóstica. Sin embargo, en un modelo de criptococosis animal se ha demostrado que la cinética de anticuerpos frente a antígenos de naturaleza proteica de *C. neoformans* puede servir para predecir la evolución de la enfermedad [8].

Candidiasis

En los últimos años, se ha cuestionado la utilidad de la detección de anticuerpos anti-*Candida* en pacientes con candidiasis 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* y 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, la enolasa y los antígenos del micelio. 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 [3].

Aspergilosis

La detección de anticuerpos específicos en suero es, desde hace muchos años, una prueba complementaria clásica para confirmar el diagnóstico de aspergiloma pulmonar y de la aspergilosis broncopulmonar alérgica (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, y 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.

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) [9], la dipeptidildipeptidasa 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 ABPA se detectan anticuerpos anti *A. fumigatus* específicos de la clase IgG en casi el 100% de los casos.

Varias técnicas pueden utilizarse 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.

14b.3.2. Técnicas comercializadas

Platelia Candida Ab/Ac/Ak (Bio-Rad)

La prueba es un ELISA que detecta anticuerpos anti-manano en suero.

Reactivos y material

Además de los reactivos proporcionados con la prueba, se necesitan los siguientes materiales:

- Pipetas de 20, 100 y 400 μ l.
- 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.

Almacenamiento y transporte de las muestras de suero

1. Procesamiento en menos de 24 h: refrigerar a 2-8 °C.
2. Procesamiento después de 24 h: congelar a -80 °C. No congelar y descongelar innecesariamente.

Procesamiento del suero

Extraer asépticamente la sangre por venopunción en un tubo libre de anticoagulantes. Permitir la formación de coágulo dejando el tubo en reposo durante 30 min a 21-25 °C. Retirar rápidamente el coágulo para evitar la hemólisis del suero.

Técnica

1. Diluir el suero a estudiar realizando dos diluciones sucesivas 1:81 (10 μ l del suero + 800 μ l 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.
2. Se añaden 100 μ l de cada uno de los sueros diluidos en su pocillo. En pocillos diferentes, se añaden también 100 μ l de los sueros negativo y positivo, así como de los calibradores para la realización de la curva patrón.
3. Se cubren los pocillos con plástico adhesivo y se incuban a 37 °C durante 60 min.
4. Se lavan los pocillos 4 veces rellenándolos cada vez con 370 μ l de la solución de lavado y se secan los pocillos invirtiéndolos sobre papel de filtro.
5. Se añaden 100 μ l del conjugado a cada uno de los pocillos.
6. Se cubren los pocillos con plástico adhesivo y se incuban a 37 °C durante 60 min.
7. Se lavan los pocillos 4 veces rellenándolos cada vez con 370 μ l de la solución de lavado y se secan los pocillos invirtiéndolos sobre papel de filtro.
8. Se añaden 200 μ l de la solución de revelado a cada uno de los pocillos y se incuban en la oscuridad, a temperatura ambiente, durante 30 min.
9. Se añaden 100 μ l de la solución de parado a cada pocillo, utilizando el mismo orden que se siguió para añadir la solución de revelado.
10. Se limpia el fondo de los pocillos y se lee la densidad óptica a 450 nm utilizando un lector de placas. Esto debe hacerse dentro de los 30 min siguientes a realizarse la parada de la reacción.

Lectura e interpretación de los resultados

Preparar la curva 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.

Unos consejos...

- 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 invasiva en pacientes inmunocomprometidos, ya que su capacidad para producir anticuerpos puede estar disminuida. Se ha demostrado la existencia de una complementación 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 invasiva que no tenga manano puede tener altos títulos de anticuerpos anti-manano y viceversa [4].
- Reduciendo el punto de corte a 5 AU/ml, Prella et al. [5] 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%.

Anticuerpos antimicelio

(Vircell SL)

La prueba es una inmunofluorescencia indirecta para detectar anticuerpos contra antígenos del micelio de *C. albicans* en el diagnóstico y seguimiento de la candidiasis invasora [3]. La realización de la prueba se encuentra descrita en formato DVD [10].

Reactivos y material

Además de los reactivos proporcionados con la prueba, se necesitan los siguientes reactivos y materiales:

- Papel absorbente
- Guantes de látex
- Micropipetas de 5, 20 y 250 μ l
- 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

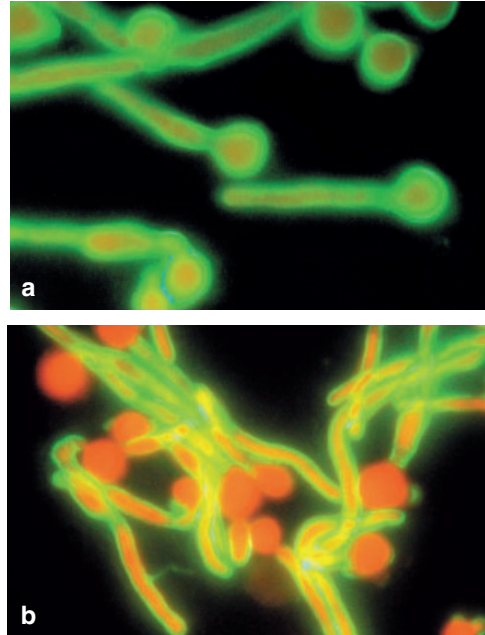


Figura 14b.1. Observación de anticuerpos antimanano (a) y antimicelio de *C. albicans* (b) mediante inmunofluorescencia indirecta.

Procesamiento del suero

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* (Figura 14b.1a). Para poder observar la existencia de anticuerpos contra la fase micelial (anticuerpos antimicelio, Figura 14b.1b), el suero debe de absorberse con levaduras de *C. albicans* invariables por calentamiento.

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

Técnica

1. Dado que los portaobjetos de la prueba tienen 10 pocillos, se pueden estudiar ocho diluciones del suero en un portaobjetos. Añadir 20 μ l 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 μ l de los sueros control positivo y negativo proporcionados con la prueba.

2. Incubar durante 30 min a 37 °C en cámara húmeda.
3. Lavar tres veces con PBS y dejar secar al aire o con una corriente de aire frío.
4. Añadir 20 µl del anticuerpo secundario conjugado con FITC a todos los pocillos e incubar durante 30 min a 37 °C en cámara húmeda.
5. Lavar tres veces con PBS y dejar secar al aire o con una corriente de aire frío.
6. Montar el portaobjetos con el líquido de montaje y examinar con un microscopio de fluorescencia.

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 (Figura 14b.1b). 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 $\geq 0,8$.** 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 antimanano y, por tanto, el suero adsorbido la primera vez debe de adsorberse 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. Títulos menores pueden ser significativos en pacientes inmunocomprometidos. Si no se observan tubos germinales fluorescentes la prueba se considera negativa.

Unos consejos...

- Si vamos a estudiar varios sueros, lo primero que podemos hacer es probar la dilución 1/20 de cada suero y titular posteriormente sólo los que sean positivos a esa dilución.

Detección de anticuerpos frente a antígenos de *Aspergillus*

Estas técnicas detectan precipitinas frente a antígenos de diversas especies de *Aspergillus*

Reactivos y material

- *Extractos antigénicos (6)*: antígeno somático (extracto de micelio) y metabólico (filtrado de cultivo) de *A. fumigatus* y antígeno metabólico de: *A. flavus*, *A. nidulans*, *A. niger* y *A. terreus*. Se presentan en frascos separados, liofilizados, y se reconstituyen con 1 ml de agua destilada. Una vez resuspendidos deben conservarse a -20 °C para evitar degradación de los antígenos.
- *Sueros control positivo (6)*: son sueros de conejo inmunizados frente a cada extracto antigénico, dos para *A. fumigatus* (Ag somático y metabólico) y uno para cada una de las restantes 4 especies.
- *Azul de Coomassie*: Tinción: disolver 1 g de Coomassie Brilliant Blue R-250 en 90 ml de etanol. Después añadir 20 ml de ácido acético glacial y 90 ml de agua destilada. Esta solución puede reutilizarse muchas veces. Destinción: emplear la misma mezcla pero sin azul de Coomassie.
- *Tampón veronal pH 8,2*: disolver 15,85 g de barbital sódico en 1.000 ml de agua destilada y 23 ml de HCl 1 N. Opcionalmente puede emplearse tampón barbital-barbital sódico tris glicina pH 8,8.
- *Tampón barbital-barbital sódico-Tris glicina pH 8,8*: Solución A: mezclar 65 g de barbital sódico y 23 ml de HCl 1 N en 1.000 ml de agua desionizada. Solución B: mezclar 281 g de glicina, 226 g de Tris y 5.000 ml de agua desionizada. Ambos tampones se mezclan a partes iguales dependiendo del volumen de la cubeta de electroforesis, obteniendo el tampón de electroforesis, que tiene un pH de 8,8 y es 0,08 M.
- *Agarosa al 1% (peso/volumen)*: disolver 10 g de agarosa en 500 ml de agua destilada, llevar hasta la ebullición. Dejar enfriar hasta 60 °C y añadir 500 ml de tampón veronal pH 8,2.
- *Detección de actividad catalasa*: mezclar 0,3 ml de peróxido de hidrógeno al 30% con 50 ml de tampón Tris 0,05 M pH 7,4. Solución de fijación: ácido acético al 5% en agua destilada.
- *Detección de actividad quimotripsina*: Solución A: disolver 5 mg de naftil éster de N acetil DL fenilalanina en 2 ml de dimetilformamida. Solución B: disolver 10 mg de Diazoblue B en 18 ml de tampón Tris 0,05 M pH 7,4. Solución de fijación: ácido acético al 2% en agua destilada.

Además de los reactivos proporcionados con la prueba, se necesitan los siguientes materiales:

- Pipetas de 20, 100 y 400 µl.
- Tubos para realizar diluciones.
- Agitador para tubos.

- Baño termostático.
- Placas petri redondas o cuadradas para la técnica de inmunodifusión.
- Portaobjetos desengrasados para la técnica de contraelectroforesis.
- Cubeta de electroforesis

Técnica de Ouchterlony

También denominada técnica de Doble difusión, consiste en dejar difundir el suero problema y los extractos antigénicos en pocillos separados de una placa de agarosa, permitiendo la migración de antígenos y anticuerpos específicos hasta un punto en el que reaccionan y originan unos arcos de precipitación (precipitinas) visibles a simple vista o mediante tinción de Coomassie. Existen numerosas variantes de esta técnica que afectan tanto al tipo de soporte empleado (placa de petri redonda o cuadrada, portaobjetos) como al número y disposición de los pocillos, dilución de sueros y extractos antigénicos, etc. En el presente capítulo y con ánimo de simplificar, se describe la técnica original, explicando posibles modificaciones en los comentarios.

Técnica

Se emplea una placa de petri con agarosa al 1%, que debe ser lo más fresca posible, de 1-2 mm de altura, siendo aconsejable prepararla en el mismo día. Puede conservarse a 4 °C en cámara húmeda durante una semana. En ella se excava un pocillo central de 14 mm de diámetro y a 6 mm del mismo y dispuestos de forma radial 6 pocillos de 3 mm de diámetro. Para esta operación es aconsejable ayudarse de una plantilla y de un cilindro hueco del diámetro adecuado para practicar los pocillos. Después es aconsejable marcar cada pocillo periférico con la especie de *Aspergillus* cuyo extracto va a albergar.

1. Depositar 300 µl de suero problema en el pocillo central.
2. Diluir cada extracto antigénico al 50% en agua y pipetear 200 µl de cada extracto en su pocillo periférico correspondiente.
3. Incubar a temperatura ambiente en cámara húmeda durante 3 días.
4. Observar la aparición de líneas de precipitación visibles a simple vista. Debe realizarse con luz oblicua sobre fondo oscuro para favorecer la visualización.
5. Además de las líneas de precipitación visibles a simple vista, hay otras más débiles que deberán ponerse de manifiesto mediante la tinción de Coomassie, que es una tinción específica de proteínas.
6. **Tinción de Coomassie:** Colocar un papel absorbente grueso tipo Whatman de la medida de la placa de petri directamente sobre el agar y colocar un peso encima para exprimir el exceso de humedad del gel durante 15 min. Retirar el papel de filtro y realizar 3 lavados

sucesivos de 15 min de duración con cloruro sódico 0,1 M en agua. Retirar el último lavado y nuevamente colocar el papel de filtro con el peso durante otros 15 min. Retirar el papel de filtro y secar con aire caliente (secador de pelo). Inundar la placa con la solución de tinción de azul de Coomassie, incubando durante 5 min. Retirar la solución de tinción e inundar la placa con solución de destinción durante 10 min. Este proceso puede reducirse en el tiempo o repetirse cuanto se quiera hasta ver claramente las bandas más finas.

7. **Detección de actividad catalasa:** Mezclar 0,3 ml de agua oxigenada al 30% con 50 ml de tampón tris 0,05M pH 7. Recubrir la placa de petri y observar la formación de burbujas que identificará el arco de precipitación que posee dicha actividad.
8. **Detección de actividad quimotripsina (Técnica de Mancini):** Mezclar las soluciones A y B y recubrir la placa de petri durante 30 min a 37 °C. Eliminar el exceso de reactivo. Fijar con ácido acético al 2% en agua destilada. Observar el aclaramiento de los arcos de precipitación que poseen dicha actividad.

Lectura e interpretación de los resultados

La primera lectura debe realizarse a simple vista, sin ayuda de las tinciones, buscando la presencia y el número de arcos de precipitación entre el pocillo central (suero problema) y los pocillos periféricos (extractos antigénicos).

Se considera que hay reactividad frente a un extracto antigénico cuando hay 3 o más arcos de precipitación entre el pocillo central y el del extracto. Entonces se informará que se detectan precipitinas frente a dicha especie de *Aspergillus*, lo que ante sospecha de aspergiloma se interpreta como colonización por dicha especie. En el aspergiloma pulmonar es común la positividad frente a más de una especie debido a varios factores que se comentarán en la nota posterior.

Si hay menos de 3 arcos de precipitación puede tratarse de un falso positivo, de un individuo sano con exposición al antígeno (background poblacional) o a que la técnica tiene sensibilidad insuficiente. Para mejorar este último punto se recomienda la tinción de Coomassie, que permite cuantificar con mayor exactitud el número de arcos de precipitación con cada extracto al poner en evidencia bandas más finas que no se aprecian a simple vista.

En todas las especies de *Aspergillus* probadas y especialmente en *A. fumigatus* la especificidad de la técnica mejora sensiblemente con el revelado por actividades catalasa y quimotripsina, cuyos arcos son específicos. La presencia de los mismos indica colonización por esta especie.

Técnica de Ouchterlony

Ventajas...

- Se trata de una técnica sencilla de realizar y no precisa de aparataje especial, por lo que puede realizarse en cualquier laboratorio.
- Permite cierta cuantificación mediante la dilución del suero problema, obteniendo la titulación del mismo.
- Es la técnica clásica de referencia junto con la contrainmunolectroforesis, por lo que existe numerosa bibliografía disponible sobre la misma.

Inconvenientes...

- Es lenta, ya que precisa de una incubación de hasta 3 días, aunque a las 24 h ya se pueden observar arcos de precipitación.
- La falta de pureza y de estandarización de los extractos antigénicos empleados puede producir:
 - i) reacciones cruzadas entre distintas especies de *Aspergillus*: la presencia de precipitinas frente a más de una especie no significa necesariamente colonización por todas ellas. Estas reacciones cruzadas se extienden a otras especies de hongos e incluso algunas bacterias. Esto constituye una fuente de falsos positivos de especial importancia cuando se trata de enfermedades pulmonares no relacionadas con *Aspergillus*.
 - ii) variabilidad entre lotes de extractos antigénicos, lo que implica un patrón diferente de precipitinas.
- Esta técnica no distingue el tipo de anticuerpo específico presente en el suero (IgG, IgM o IgE), lo que tiene especial interés en la ABPA.
- Tiene una sensibilidad baja, ya que en individuos moderadamente inmunodeprimidos no hay suficientes niveles de anticuerpos para formar arcos de precipitación, originando falsos negativos. Debido a éste problema esta técnica no es de utilidad en aspergilosis invasoras, que suelen afectar a individuos con gran inmunosupresión.
- El factor reumatoide y la proteína C-reactiva presentes en el suero y la sustancia C-reactiva presente en algunos extractos antigénicos pueden causar falsas precipitinas. Estas bandas desaparecen con el tratamiento previo del suero con quelantes del calcio (proteína C-reactiva) o con beta-mercaptoetanol (factor reumatoide).

A diferencia con el aspergiloma pulmonar, en la ABPA bastan de 1 a 3 arcos de precipitación frente a *A. fumigatus* para considerar positivo el test de inmunodifusión, que son menos que en el caso de aspergiloma. Hay que recordar que la presencia de arcos de precipitación en las pruebas serológicas de inmunodifusión no es característica exclusiva de la ABPA y que por sí solas no son diagnósticas si no se acompañan de los demás criterios diagnósticos de ABPA.

En el estadio II de la ABPA (remisión) y tras el tratamiento de una exacerbación (estadio III), los niveles de precipitinas pueden ser indetectables por la baja sensibilidad de la técnica.

Inmunolectroforesis

Se trata de una variante de inmunodifusión en la que la migración de los antígenos se ve acelerada al someterse a un campo eléctrico. Su principal ventaja es por tanto la rapidez. Este método presenta al igual que la doble difusión múltiples variantes pero las dos principales son las siguientes:

i) *Inmunolectroforesis (IE)*: cuando los antígenos del extracto migran en el agar por mediación de un campo eléctrico y en un segundo paso los anticuerpos del suero migran por difusión simple.

ii) *Inmunolectroforesis cruzada, electrosinéresis o contrainmunolectroforesis (CIE)*: cuando tanto antígenos como anticuerpos migran por el gel simultáneamente con ayuda de un campo eléctrico. Debido a que la CIE presenta considerables ventajas sobre la IE en cuanto a rapidez y economía de reactivos, únicamente se describe la CIE en el presente capítulo.

Contrainmunolectroforesis (Técnica de Bussard)

Consiste en someter simultáneamente a los sueros y los extractos antigénicos a un campo eléctrico. Los anticuerpos se colocan del lado del ánodo (+) y su baja carga negativa les hace migrar hacia el cátodo por electroendosmosis. Por el contrario los antígenos colocados en el polo negativo se cargan negativamente a pH alcalino y migran hacia el polo positivo, cruzándose en su camino con los anticuerpos y formando líneas de precipitación. El resultado es similar a la inmunodifusión pero más rápido y sensible y además con un menor consumo de reactivos.

Técnica

1. Recubrir uno o varios portaobjetos desengrasados con 7 ml de agar al 2% en solución acuosa caliente y dejar enfriar 10 min. Se pueden conservar en cámara húmeda a 4° C durante unos días.

2. Con ayuda de un cilindro sacabocados de 2 mm de diámetro practicar 2 filas de pocillos separadas 6 mm entre sí. Una fila irá al lado del cátodo (marcar como polo negativo) y la otra irá al lado del ánodo (marcar como polo positivo).
3. Por el dorso del portaobjetos marcar cada pocillo del lado del cátodo (-) con el tipo de extracto antigénico y cada pocillo del lado del ánodo (+) con el suero a probar. Esta operación es recomendable hacerla antes de verter el agar sobre el porta.
4. Distribuir 20 µl de cada extracto antigénico sin diluir en cada pocillo de la fila de antígenos y 20 µl de suero en cada pocillo de la fila de sueros.
5. Colocar el tampón de electroforesis en la cubeta y la lámina de agar teniendo cuidado en orientar los pocillos con suero hacia el polo positivo y los pocillos con antígeno hacia el polo negativo.
6. Si se emplea tampón veronal pH 8,2 la fuente de electroforesis se programará a 5 V/cm durante 90 min. Si se emplea tampón barbital-barbital pH 8,8 la fuente de electroforesis se programará a 10 V/cm durante 60 min.

Lectura e interpretación de los resultados

La lectura ha de hacerse inmediatamente después de la electroforesis y de la misma forma que la ID, primero a simple vista. Si se desea obtener mayor sensibilidad es recomendable emplear la tinción de Coomassie de modo idéntico a la ID, ya descrito. Una mayor especificidad se obtiene mediante el revelado de las actividades catalasa y quimotripsina del mismo modo que con la técnica de ID.

Los criterios de positividad son idénticos a los de la técnica de ID y tiene las mismas limitaciones que ésta. Las principales ventajas de la CIE son su mayor rapidez, su mayor sensibilidad y el menor consumo de reactivos.

Hay que tener cuidado en colocar correctamente la polaridad de la lámina de agar porque de lo contrario la migración se realiza en sentido opuesto y no se observarían líneas de precipitación.

14b.4. Detección de componentes no antigénicos

14b.4.1. Aplicaciones a las micosis habituales en nuestro medio

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, DNA y (1→3)-β-D-glucano.

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. Niveles elevados de D-arabinitol se han detectado en pacientes con candidiasis invasora y su monitorización se ha mostrado útil en el seguimiento de estos pacientes [3]. 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 ADN se describe en el capítulo 20.

La detección de (1→3)-β-D-glucano en plasma es otra posibilidad diagnóstica en las micosis producidas por *Candida*, *Aspergillus* y *Pneumocystis*, ya que 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) la más recientemente comercializada y la que puede obtenerse en nuestro país [6]. 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 [3].

14b.4.2. Técnicas comercializadas

Fungitell

(Associates of Cape Cod, USA)

La prueba está basada en la capacidad del (1→3)-β-D-glucano para poner en marcha la vía de coagulación de los amebocitos de *Limulus*. Estos amebocitos son las células sanguíneas presentes en la linfa de cangrejos de herradura como el *Limulus polyphemus*, que habita las costas del este de los Estados Unidos. Los amebocitos poseen dos vías de formación de coágulo, una de ellas activada por toxinas bacterianas (que activan el factor C de la coagulación) y otra por (1→3)-β-D-glucano, presente en la pared celular de los hongos. El Fungitell utiliza esta última vía activando el factor G de la cascada de la coagulación y que, mediante una reacción en la que se utilizan reactivos diazo, se generan compuestos coloreados que pueden ser medidos por colorimetría.

Reactivos y material

Todos los reactivos están contenidos en el kit. Estos reactivos son:

- Reactivo Fungitell.
- 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.

Las puntas y los tubos para el pretratamiento de los sueros deben ser especiales, libres de endotoxinas y β-D-glucano, suministrados por la misma compañía.

Además de los reactivos proporcionados con la prueba, se necesitan los siguientes materiales:

- Pipetas de 250-1.000 μl.
- Tubos de ensayo.
- Pipetas de vidrio.
- Lector de microplacas equipado con filtros de 405 nm. Con software para estudios cinéticos
- Bloque térmico.

Procesamiento del suero

Extraer asépticamente la sangre por venopunción en un tubo libre de anticoagulantes. Permitir la formación de coágulo dejando el tubo en reposo durante 30 min a 21-25 °C. Retirar rápidamente el coágulo para evitar la hemólisis del suero. Mantener a 4-8 °C durante 48 h, o congelado a -20 °C si se va a almacenar por periodos más largos.

Técnica

1. Preparar diluciones de (1→3)-β-D-glucano en un rango de concentraciones entre 100 y 6,25 pg/ml en agua destilada para realizar la curva patrón.
2. Preparar el reactivo para el tratamiento de la muestra (0,6 M KCl y 0,125 M KOH). Esta solución debe utilizarse dentro de los 30 min siguientes a su preparación.
3. Añadir 20 μl del reactivo para el tratamiento de la muestra a 5 μl de la muestra. Agitar e incubar durante 10 min a 37 °C.
4. Añadir 25 μl de cada patrón a los pocillos de la microplaca. Esta operación se realiza por triplicado. En tres de los pocillos se añadirá únicamente agua destilada.
5. Añadir 25 μl de cada muestra a los pocillos de la microplaca. Esta operación se realiza también por triplicado.
6. Reconstituir el reactivo Fungitell con 2,8 ml de agua destilada y añadir 2,8 ml de tampón Pyrosol. Agitar suavemente hasta conseguir la disolución total del reactivo. No utilizar el agitador mecánico. Este reactivo debe utilizarse en los 10 min siguientes a su preparación. Si esto no fuese posible puede almacenarse a 2-8 °C durante 2 h.
7. Añadir 100 μl del reactivo Fungitell a cada pocillo y colocar la microplaca en el lector precalentado a 37 °C. Agitar durante 5 s y proceder a la lectura de la absorbancia a 405 nm. Programar el software para que efectúe lecturas cada 10-20 s durante aproximadamente 40 min a 37 °C.
8. Utilizar el software para realizar un gráfico con los resultados de los patrones y así extrapolar la concentración de (1→3)-β-D-glucano en los sueros.

Interpretación de los resultados

Aunque todavía no se tiene suficiente experiencia para recomendar un punto de corte, Odabasi et al. [11] han utilizado un punto de corte de 60 pg/ml para diferenciar a los pacientes con infección fúngica invasora y Pazos et al. [6,12] han utilizado un punto de corte de ≥120 pg/ml en el diagnóstico de la aspergilosis invasora y de la candidiasis invasora en pacientes neutropénicos.

Referencias

1. Kaufman L, Reiss E. Serodiagnosis of fungal diseases. En: Lennette EH, Balows A, Hausler WJJ, Shadomy HJ (Ed) Manual of Clinical Microbiology. Washington DC, American Society for Microbiology, 1985: 924-944.
2. Edson RS, Fernández-Guerrero M, Roberts GD, Van Scoy RE. Clinical and laboratory features of cryptococcosis. A five year experience. *Min Med* 1987; 70: 337-342.
3. Pontón J, Moragues MD, Quindós G. Non-culture based diagnostics. En: Calderone R (Ed.) *Candida* and Candidiasis. Washington DC, American Society for Microbiology, 2002: 395-425.
4. Sendid B, Tabouret M, Poirot JL, Mathieu D, Fruit J, Poulain D. New enzyme immunoassays for sensitive detection of circulating *Candida albicans* mannan and anti-mannan antibodies: useful combined test for diagnosis of systemic candidiasis. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 1510-1517.
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.
6. Pazos C, Pontón J, del Palacio A. Contribution of (1→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.
7. 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.
8. Neuville S, Lortholary O, Dromer F. Do kinetics of the humoral response to *Cryptococcus neoformans* proteins during murine cryptococcosis reflect outcome?. *Infect Immun* 2000; 68: 3724-3726.
9. López-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.
10. Pontón J, Moragues MD, Quindós G. Diagnóstico de la candidiasis invasora detectando anticuerpos anti-micelio. Bilbao, Revista Iberoamericana de Micología, 2004. ISBN: 84-609-2611-7.
11. 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.
12. Pazos C, Moragues MD, Quindós G, Pontón J, del Palacio A. Diagnostic potential of the (1→3)-β-D-glucan and the anti-*Candida albicans* germ tube antibodies for the diagnosis and therapeutic monitoring of invasive candidiasis in neutropenic adult patients. *Rev Iberoam Micol* 2006; 23: 209-215.