

Antonio Rezusta López
Aurora Sánchez Sousa
Joaquina Gil Tomás

La medicina basada en la evidencia, consiste en la aplicación rigurosa de criterios científicos al trabajo diario, en micología debe estar encaminado a proporcionar datos que ayuden en el cuidado del enfermo o en la prevención de la enfermedad o su diseminación. La finalidad es garantizar alta calidad y coste efectividad [1].

Para alcanzar el éxito en el diagnóstico micológico es fundamental realizar adecuadamente la recogida de la muestra, su transporte y procesamiento, la siembra de la misma en los medios idóneos y a la temperatura adecuada, así como la identificación e interpretación correcta de los aislamientos. Únicamente con el procesamiento adecuado se puede recuperar el hongo claramente asociado con el proceso infeccioso [2].

Teniendo siempre presente, a la hora de valorar un crecimiento fúngico, la necesidad de diferenciar un "aislamiento significativo" de otros debidos a hongos contaminantes, ya que no es lo mismo identificar una especie fúngica que diagnosticar una micosis.

En este Capítulo se detallan los fundamentos y recomendaciones básicas del diagnóstico micológico y en los siguientes, las características específicas del procesamiento de cada muestra según el origen anatómico de la misma.

3.1. Recogida de muestras

El diagnóstico de las micosis comienza con la sospecha clínica y una adecuada obtención de la muestra, a partir de la lesión, y su correcta manipulación, para mantener la viabilidad del agente etiológico y evitar posibles contaminaciones, son aspectos fundamentales que siempre deben tenerse en cuenta para la obtención de un correcto diagnóstico micológico.

No debe olvidarse la importancia de etiquetar y rellenar adecuadamente el volante de petición, de forma que refleje claramente la sospecha clínica y los factores predisponentes del paciente; destacando, si los hubiera, la existencia de tratamientos que pudieran interferir en el aislamiento del miceto. También es necesario reflejar la localización anatómica, cuando ha sido recogida, el medio de transporte, si lo hay, cómo ha sido el transporte y cuanto tiempo ha durado.

3.1.2. Consejos generales para optimizar la recogida de muestras

El método de recogida varía según el tipo de micosis y su localización; así ocurre, por ejemplo, en el caso de las dermatofitosis.

1. Debe disponerse de un protocolo de recogida de muestras actualizado periódicamente.
2. Es necesario recoger las muestras asépticamente, utilizando contenedores estériles, remitirlas al laboratorio antes de 2 h y sembrarlas lo antes posible.
3. La muestra debe recogerse antes de instaurar el tratamiento y siempre de la parte activa de la lesión (cuando se sospecha una micosis pulmonar es preferible una muestra respiratoria antes que un hemocultivo).
4. Los hisopos deben ser evitados, siempre que el tipo de lesión lo permita. Pero hay muestras (conducto auditivo, faringe, vagina o cérvix) que no pueden ser recogidas de otra manera.
5. En el caso de heridas abiertas, drenajes o lesiones superficiales, debe limpiarse la zona previamente para evitar contaminaciones.
6. Las muestras de lesiones cerradas y abscesos suelen ser de gran rendimiento. Deben ser aspiradas con jeringa y transferidas a un contenedor estéril, con CI_{Na} al 0,85% no bacteriostático. Alternativamente, lavar la jeringa y aguja con CI_{Na} al 0,85% no bacteriostático o caldo estéril y remitir la jeringa, sólo cuando se pueda perder la muestra sino se hace así. Hay que prestar atención a la recogida de gránulos, si los hubiese.
7. El raspado de lesiones de piel y faneras puede realizarse con distintos materiales; los más utilizados son bisturí, moqueta o cepillo.
8. En situaciones que requieran un estudio epidemiológico, debe establecerse la necesidad de una recogida de muestras ambientales, familiares o animales.
9. El laboratorio debe ser informado de la sospecha de hongos peligrosos en la manipulación (p. ej., *Coccidioides* spp e *Histoplasma* spp) y aquellos que requieren un procesamiento especial (*Malassezia* spp), así como de viajes u origen de paciente.
10. *Histoplasma capsulatum* no sobrevive por periodos largos a la refrigeración o hielo seco.
11. En general, no se recomiendan los hisopados de heridas abiertas o drenado de lesiones, ya que están contaminados frecuentemente.

12. En general, con la excepción de biopsias, realizar una muestra por día y por localización (sin exceder de 3 por semana).
13. La cantidad de muestra necesaria para el diagnóstico micológico en general es superior al del diagnóstico de las infecciones bacterianas.
14. Es necesario reflexionar sobre afirmaciones como “el laboratorio tiene la responsabilidad de proporcionar el personal en las áreas de recogida (zona quirúrgica, en la cama del enfermo, o pacientes ambulatorios), que proporcione las instrucciones adecuadas” [2].

3.2. Transporte de las muestras

Todas las muestras deben remitirse sin conservantes. Las muestras deben ser transportadas en un recipiente estéril, humidificado y a prueba de vertidos; sin embargo, las muestras dermatológicas pueden transportarse en un recipiente seco (placa de Petri, papel de fotografía negro, entre dos portas) o, de forma ideal, sembrada directamente sobre el medio de cultivo.

No deben introducirse en medios de transporte, a no ser que sea fácil retirar la muestra del medio.

Los raspados corneales y hemocultivos deben sembrarse directamente en el medio de cultivo adecuado.

Las muestras, una vez obtenidas, deben sembrarse lo antes posible después de la recogida. Aunque hay pocos estudios sobre el descenso de la viabilidad de los hongos a temperatura ambiente o por la acción del hielo seco, es conocida la dificultad de recuperar *Rhizopus arrhizus* en muestras demoradas y, también, la pérdida de viabilidad de algunos hongos por la desecación, temperatura elevada (>37 °C) o baja (<10 °C), sobrecrecimiento bacteriano, presencia leucocitos, etc. [3].

Las condiciones de transporte y almacenamiento vienen reflejadas en la **Tabla 3.1**. Teniendo en cuenta ciertas variaciones según el agente probable [4].

La refrigeración puede comprometer el aislamiento de hongos como dermatofitos, *Malassezia* spp. e *H. capsulatum*. Las muestras que están potencialmente contaminadas con microbiota bacteriana (muestras dermatológicas, aspirados transtraqueales, aspirados de oído interno, muestras de conjuntiva) deben enviarse a temperatura ambiente.

3.3. Procesamiento de las muestras

En términos generales, los procedimientos utilizados en el laboratorio de bacteriología son adecuados para el cultivo de hongos, pero hay que tener en cuenta que, habitualmente, la carga microbiana es inferior en el caso de los hongos con respecto a las bacterias. Esto obliga a recoger mayor cantidad de muestra para obtener un rendimiento óptimo.

Las muestras inaceptables no deberían ser procesadas y el facultativo remitente informado inmediatamente. Todo laboratorio debe distribuir por escrito las normas de rechazo de muestras.

3.3.1. Consejos generales para optimizar el procesamiento de muestras

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

3.3.2. Preparación de la muestra

Para optimizar tanto la observación microscópica como el cultivo, es necesario preparar la muestra, aunque algunas se pueden inocular directamente sin que sea necesaria su manipulación previa. Todas las muestras deben observarse macroscópicamente y seleccionar la parte más representativa. En muestras como esputo y tejidos deben buscarse las zonas de pus, caseificación, o necrosis [6].

Tabla 3.1. Muestras más comunes, hongos productores más frecuentes, recogida y transporte.

Muestra	Hongo probable	Recogida y transporte	Tiempo y temperatura (transporte / conservación)	Nota
Absceso / herida	Levaduras Filamentosos	Muestra aspirada y transporte en jeringa sin aguja. Remitir en contenedor estéril		Muestra del margen activo. Si la muestra se recoge por cirugía, remitir también una porción de la pared del absceso. Si se utiliza hisopo, deberían remitirse varios.
Gránulos subcutáneos	- Gránulo blanco: <i>Acremonium falciforme</i> , <i>Acremonium recifei</i> , <i>Aspergillus nidulans</i> , <i>Neotestudina rosatii</i> , <i>Pseudoallesheria boydii</i> ; - Gránulo negro: <i>Exophiala jeanselmei</i> , <i>Leptosphaeria senegalensis</i> , <i>Madurella grisea</i> , <i>Madurella mycetomatis</i> , <i>Pyrenochaeta romeroi</i>	Recoger pus, exudado, biopsia y drenaje tractos sinuosos. Lavar los gránulos con solución salina conteniendo antibióticos	≤ 2h, TA / ≤ 24h, TA	Granos o gránulos en eumicetoma
Abscesos subcutáneos		Aspirar con jeringa y agua. Transporte anaerobio o inoculación directa ≥1ml	≤ 2h, TA / ≤ 24h, TA	Muestra de la base de la lesión y pared del absceso
Sangre	<i>Candida</i> spp., <i>Malassezia</i> spp., <i>Cryptococcus neoformans</i> , <i>Histoplasma capsulatum</i>	Desinfectar la zona con compuesto yodado. Lisis centrifugación. Sistemas automatizados. Medios bifásicos de infusión cerebro-corazón. Extraer la máxima cantidad recomendada por el fabricante	≤ 2h, TA / ≤ 24h, TA	La mayoría de las <i>Candida</i> spp. se pueden recuperar en los sistemas de hemocultivos. Si se usa sistema automatizado determinar qué hongos pueden ser detectados. Para los hongos dimórficos (lisis centrifugación). Puede detectarse antígeno de <i>Cryptococcus</i> , de <i>Histoplasma</i> o de <i>Aspergillus</i>
Médula ósea	<i>Cryptococcus neoformans</i> , <i>Histoplasma capsulatum</i>	Preparar para incisión quirúrgica. Lisis centrifugación. Medio apropiado en la cabecera del enfermo	Como la sangre	Si se usa un sistema automatizado, revisar las normas del fabricante
Catéter	<i>Candida</i> spp., <i>Malassezia</i> spp.	5 cm distales, colocarlos en contenedor estéril		No estandarizado actualmente
Raspado corneal	<i>Candida albicans</i> , <i>Cryptococcus neoformans</i> . Hongos filamentosos muchas especies (<i>Aspergillus</i> spp., <i>Fusarium</i> spp., <i>Paecilomyces</i> spp., <i>Penicillium</i> spp., hongos dematiáceos)	Inocular directamente en el medio y en el porta, mediante raspado con espátula	Inocular directamente en la cabecera del enfermo	Sembrar tocando con ambos lados de la espátula dibujando una C en el medio
Líquido intraocular		Recoger en un contenedor estéril, o inocular directamente	≤ 15 min, TA / ≤ 24h, TA	Si es lavado intraocular, centrifugar antes de sembrar

Sigue

Tabla 3.1 (cont.). Muestras más comunes, hongos productores más frecuentes, recogida y transporte.

Muestra	Hongo probable	Recogida y transporte	Tiempo y temperatura (transporte / conservación)	Nota
Pelos*	<i>Trichophyton</i> spp., <i>Microsporum</i> spp. (<i>tinea capitis</i>)	Seleccionar el área, arrancar ≥ 10 -12 pelos y recoger escamas. En niños con exudado puede ser útil frotar con un hisopo.	Contenedor seco, sobre de papel. Si se hace con hisopo sembrar directamente. ≤ 72 h, TA / ≤ 72 h, TA	Para el transporte no usar tubos que mantengan la humedad, favorece el sobrecrecimiento bacteriano.
Uñas*	<i>Trichophyton</i> spp., <i>Epidermophyton floccosum</i> , <i>Microsporum</i> spp., <i>Candida</i> spp., <i>Scopulariopsis brevicaulis</i> , otros hongos filamentosos de más difícil interpretación	Desinfectar con alcohol 70%. Raspar la uña y cortar trozos pequeños, recoger detritus.	≤ 72 h, TA / ≤ 72 h, TA	La humedad favorece el sobrecrecimiento bacteriano
Piel*	<i>Trichophyton</i> spp., <i>E. floccosum</i> , <i>Microsporum</i> spp., <i>Candida</i> spp., <i>Malassezia</i> spp., <i>Sporothrix schenckii</i>	Desinfectar con alcohol 70%. Raspar los márgenes de la lesión	Directamente sobre el medio o en contenedor estéril o entre dos portas ≤ 72 h, TA / ≤ 72 h, TA	La humedad favorece el sobrecrecimiento bacteriano
Respiratorio	Levaduras Hongos filamentosos	Recoger 3 esputos en 3 días consecutivos después de tos profunda. Cuando sea posible lavado broncoalveolar, cepillado bronquial. Contenedor estéril >1 ml	≤ 2 h, TA / ≤ 24 h, 4 °C	Esputo de 24 h no es aceptable. Los hongos dimórficos sobreviven poco tiempo Considerar <i>P. jiroveci</i> en inmunodeprimidos
Oral	<i>Candida</i> spp., <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	Hisopar la lesión activa; enjuagar con solución salina para <i>Candida</i> . Medio de transporte para el hisopo o contenedor estéril	≤ 2 h, TA / ≤ 24 h, TA	Medio selectivo para levaduras
Seno nasal		Recoger el contenido del seno quirúrgicamente. Inocular directamente o en una gasa estéril húmeda	≤ 2 h, TA / ≤ 24 h, TA	
Líquidos estériles	<i>Candida</i> spp., <i>H. capsulatum</i> , <i>C. neoformans</i>	Recoger como para bacterias, al menos 2 ml en contenedor estéril	≤ 15 min, TA o 30 °C / ≤ 24 h, TA. Nunca refrigerar.	El aspirado o biopsia cerebral pueden ser necesarios
Tejidos / biopsias	Levaduras, hongos filamentosos	En contenedor estéril añadir un poco de SF estéril no bacteriostático para prevenir la desecación	≤ 15 min, TA / ≤ 24 h, TA	Biopsias por Punch pueden utilizarse para las lesiones de piel
Orina	Levaduras <i>C. neoformans</i> , <i>C. immitis</i> , <i>H. capsulatum</i> , <i>B. dermatitidis</i>	Primera orina de la mañana en contenedor estéril. Orina obtenida por sondaje. Orina postmasaje prostático	≤ 15 min, TA / ≤ 24 h, 4 °C	Recoger la orina a mitad de la micción. Puede utilizarse para detección de antígeno de <i>Histoplasma</i>
Oído externo	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Aspergillus flavus</i>	Girar con firmeza el hisopo en el canal externo	< 2 h, TA / < 24 h, 4 °C	
Vagina	<i>C. albicans</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>Candida</i> spp.	Como para bacterias	Medio de transporte. < 2 h, TA / < 24 h, TA	

*La toma de muestras se realizará preferentemente en el laboratorio

TA: temperatura ambiente

Modificado de Shea *et al.* [5] y Sutton [2]

1. Los tejidos deben ser troceados e inoculados en pequeños trozos en el medio de cultivo con el fin de facilitar el crecimiento o la penetración de algunos colorantes como el blanco de calcoflúor. La utilización de homogenizadores no está completamente aceptada ya que puede destruir a los hongos no septados. El troceado puede realizarse con tijeras o bisturí, el proceso puede realizarse en una placa de petri añadiendo unas gotas de agua destilada estéril. Las muestras altamente viscosas, como el esputo, deben fluidificarse, sin diluirlas excesivamente. Y si son muy diluidas deben concentrarse mediante centrifugación. Este proceso es especialmente útil para *Pneumocystis jiroveci*.
2. Los líquidos orgánicos (LCR, pleural, peritoneal, articular, etc.) deben concentrarse por centrifugación (1500-2500 g durante 10 min) o filtración (0,2 µm de poro), siempre que haya suficiente cantidad. Estas muestras pueden requerir un procesamiento especial o ser sembradas directamente en el medio de cultivo.
3. Los fragmentos ungueales se trocean progresivamente con un bisturí y se pulverizan.

3.3.3. Cultivo de la muestra

En la **Tabla 3.2** se resumen los medios de cultivo recomendados habitualmente según el tipo de micosis.

3.3.4. Observación de la muestra

El diagnóstico definitivo de la mayoría de las micosis requiere el aislamiento e identificación del hongo a partir del cultivo, lo que supone, con frecuencia, varios días o semanas de dilación.

No obstante, el método más rápido para la detección de estructuras fúngicas en una muestra clínica es el examen microscópico de la misma. Este examen puede aportar, en ocasiones, un diagnóstico definitivo (pitiriasis versicolor) y en otras, un diagnóstico de sospecha previo a la confirmación definitiva por cultivo. Por lo tanto, es un procedimiento que debería ser realizado en todos los laboratorios ya que puede realizarse mediante técnicas sencillas, aunque a veces puede requerir tinciones complejas, permitiendo dirigir los medios adecuados para el cultivo de la muestra. En el Capítulo 14a de esta Guía se detallan las características de las técnicas de examen microscópico más utilizadas en Micología. Sin embargo, si la muestra es escasa, el cultivo debe ser prioritario. Las técnicas moleculares comienzan a ser una realidad y permitirán un diagnóstico más rápido que el cultivo, si bien están menos desarrolladas que para las bacterias o los virus (Capítulo 20).

Las limitaciones y los problemas del examen microscópico también deben ser tenidos en cuenta: i) un examen negativo no excluye la infección; ii) el examen microscópico puede originar falsos positivos al confundirse ciertas estructuras con elementos fúngicos (linfocitos lisados por *C. neoformans* en la tinción con tinta china, fibras de colágeno o del

Tabla 3.2. Medios de cultivo básicos recomendados.

Micosis superficiales	<ul style="list-style-type: none"> • Agar glucosado de Sabouraud (SDA) + cloranfenicol (SDAC) • Agar glucosado de Sabouraud + cloranfenicol + cicloheximida (Mycobiotic®, Mycosel®) • <i>Dermatophyte test medium</i> (DTM), opcional • Ante la sospecha de <i>Malassezia</i> utilizar medio de Leeming (LNA) o de Dixon modificado (mDixon), en el caso de pitiriasis no es necesario el cultivo para el diagnóstico • Para la detección de <i>Candida</i> en las muestras mucocutáneas, la utilización de medios cromogénicos facilita la detección de cultivos mixtos y la identificación rápida
Micosis subcutáneas	<ul style="list-style-type: none"> • SDA, SDAC, Mycobiotic o Mycosel (MYC), Agar infusión cerebro-corazón (BHIA)
Micosis sistémicas	<ul style="list-style-type: none"> • SDAC • BHIA (Dimórficos) • Agar de Staib (<i>Cryptococcus</i>) • BHIA con antibacterianos e, incluso, con cicloheximida en muestras muy contaminadas (Dimórficos) • LNA o mDixon (<i>Malassezia</i>)
Miscelánea (aspergilosis, mucormicosis, otomicosis)	<ul style="list-style-type: none"> • SDAC

hisopo pueden confundirse con elementos fúngicos, gotas de grasa con levaduras gemantes, etc).

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

Las muestras para estudio micológico deben ser examinadas tanto macroscópica como microscópicamente:

Observación macroscópica

Antes de inocular los medios de cultivo y realizar el examen microscópico, la muestra debe ser examinada en busca de gránulos, material caseoso, purulento, hemorrágico o necrótico.

Examen microscópico

La observación microscópica se realiza con bajo aumento, seguida de alto aumento en seco y, si es necesario, con objetivo de inmersión. Las dos formas observadas habitualmente son levaduras y/o elementos miceliares.

Es aconsejable utilizar periódicamente controles positivos y negativos y, si una tinción se emplea ocasionalmente, deben incluirse siempre controles que aseguren su correcta utilización.

Aunque es muy difícil identificar una especie fúngica por la morfología observada en el examen microscópico directo de la muestra, algunas imágenes pueden asociarse a ciertos géneros o especies:

Levaduras

- Células, con o sin gemas, de varios tamaños y formas, posiblemente sean *Candida* spp. u hongos dimórficos.
- Células de pared gruesa, generalmente con una gema de base amplia, podrían corresponder a *Blastomyces dermatitidis*.
- Células de pared delgada con gemación múltiple rodeando a la célula madre, posiblemente sean *Paracoccidioides brasiliensis*.
- Células rodeadas de una cápsula grande, probablemente corresponden a *C. neoformans*.
- Células pequeñas, de gemación simple observadas en tinciones especiales, posiblemente son *H. capsulatum*.
- Células con pseudohifas: *Candida* spp., *Geotrichum* spp., o *Trichosporon* spp. Las dos últimas pueden mostrar artrosporas.
- Células redondas de pared gruesa de varios tamaños, algunas de las cuales (las más grandes)

pueden contener esporas podrían tratarse de esférulas de *Coccidioides immitis*. Sin embargo, *Rhinosporidium seeberi* también puede mostrar esférulas grandes y endosporas.

- Células gemantes de paredes gruesas acompañadas o no de pseudohifas, pueden corresponder a *Malassezia*. Cuando la lesión es característica de pitiriasis, este es el procedimiento correcto para realizar el diagnóstico

Elementos miceliales (con o sin otras estructuras asociadas)

- Hifas no septadas, de pared gruesa, algunas de las cuales pueden mostrar ramificaciones en 90°: *Rhizopus* spp., *Mucor* spp., *Absidia* spp.
- Hifas septadas, ramificadas, algunas en V, con o sin cabezas de *Aspergillus*, posiblemente correspondan a *Aspergillus* spp.
- Hifas septadas, pigmentadas (marrones oscuras) con o sin cuerpos esféricos, pueden pertenecer a hongos dematiáceos.
- Racimos de pared gruesa y oscura, con apariencia de gemas, posiblemente pertenezcan a un agente de cromomicosis.
- Fragmentos de hifas con o sin esporas, con o sin levaduras probablemente correspondan a dermatofitos o a *M. furfur* complex.

Las técnicas más habitualmente utilizadas para la observación microscópica de las muestras se resumen en la [Tabla 3.3](#).

3.4. Medios de cultivo

El objetivo fundamental de la utilización de los medios de cultivo es optimizar el crecimiento de los microorganismos. El primer medio de cultivo que permitió el aislamiento de los gérmenes en medios artificiales fue el propuesto por Koch, en 1876, basado en el uso de gelatina. Posteriormente, Frost en 1909 utilizó medios deshidratados y, en 1919, añadió agar, lo que proporcionó un gran avance en el estudio de la microbiología.

La composición básica de un medio incluye nutrientes, agente solidificante (en los medios sólidos o semisólidos), pH adecuado y componentes específicos. En los medios de cultivo para el aislamiento de hongos, los antimicrobianos se utilizan con frecuencia, tanto para inhibir el crecimiento bacteriano como el de otros hongos ambientales. Atendiendo a su composición, los medios de cultivo

Tabla 3.3. Técnicas de observación microscópica.

En fresco	Tinciones
<ul style="list-style-type: none"> • KOH • KOH + tinta Parker negra • KOH + blanco calcoflúor • Tinta china (<i>Cryptococcus</i>) 	<ul style="list-style-type: none"> • KOH + tinta Parker negra, KOH + blanco calcoflúor: Uso general • Giemsa: micetoma, histoplasmosis, coccidioidomicosis, <i>neumocistosis</i>, otras micosis cutáneas con exudado o pus • PAS: micetoma, coccidioidomicosis, onicomosis • Grocott: <i>neumocistosis</i> • Fontana Masson: <i>neumocistosis</i> • Inmunofluorescencia: <i>neumocistosis</i>

puede ser generales, enriquecidos, selectivos, diferenciales y especializados:

A. **Generales:** El más característico y clásico es el agar glucosado de Sabouraud (SDA) y su equivalente en EEUU, el medio para mohos. Ambos se utilizan frecuentemente para el aislamiento a partir de la muestra y para la descripción de las características de la mayoría de los hongos.

B. **Enriquecidos:** Se utilizan especialmente en micosis sistémicas endémicas (histoplasmosis, coccidioidomicosis, etc.), un ejemplo es la infusión cerebro-corazón (BHI).

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

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

F. **Especializados:** Son aquellos medios que contienen algún componente (*Guizotia abyssinica*) destinado a aislar un agente concreto (*Cryptococcus neoformans*) o a favorecer la identificación de ciertas especies (medio de Czapeck).

3.4.1. Preparación de los medios de cultivo

La buena calidad de los medios es indispensable para conseguir el aislamiento y la identificación en Micología; por lo tanto, cuando se utilicen medios comerciales es necesario tener en cuenta la garantía que aporta el proveedor y la calidad de la distribución.

Cuando se prepara un medio deshidratado deben seguirse rigurosamente las instrucciones del fabricante, evitando errores en la forma de disolverlo o suspenderlo, en la temperatura y/o duración de la esterilización, para preservar la calidad del producto final. La esterilización en autoclave es más eficaz si se utilizan frascos de volúmenes inferiores a 500 ml; si se han utilizado imanes para la disolución, deben retirarse antes de introducir los medios en el autoclave. También hay que tener presente que algunos antibióticos deben añadirse al medio una vez esterilizado y a la temperatura adecuada, para no ser desactivados por las altas temperaturas de la esterilización.

3.4.2. Control de calidad

Para asegurar la correcta utilización de los medios, debe controlarse periódicamente sus características más importantes: apariencia, esterilidad, pH y funcionamiento. El funcionamiento se puede evaluar utilizando las cepas de control adecuadas para cada medio. En este proceso se recomienda seguir las especificaciones del documento M22-A del CLSI (antes NCCLS) en aquellos casos en los que está establecido [3].

Los controles de calidad deben realizarse tanto a los medios elaborados en el laboratorio, como a los medios comerciales ya preparados; en este caso, es conveniente solicitar al fabricante los controles a utilizar y los resultados para el lote suministrado. En el Capítulo 18 de esta Guía se detallan los aspectos del control de calidad.

3.4.3. Soporte de los medios de cultivo

El soporte habitual para los medios de cultivo en Micología suele ser tubos de cristal o placas de Petri (90 mm). La elección depende del usuario; autores como De Hoog y Guarro proponen el uso habitual de placas excepto, por razones de seguridad, en los casos de sospecha de histoplasmosis, coccidioidomicosis, blastomicosis, paracoccidioidomicosis e infecciones por *Penicillium marneffe* [4].

Si se utilizan tubos, deben incubarse en posición horizontal las primeras 24 h para que el inóculo no se concentre en el fondo. Los tubos no deben ser los habituales de Microbiología porque, en ellos, las colonias no son fáciles de aislar. Si los tubos utilizados son de tapón de rosca, el cierre debe mantenerse parcialmente abierto para garantizar las mejores condiciones atmosféricas.

Cuando se eligen placas, es conveniente que contengan 40 ml de medio para evitar que se sequen y deben sellarse con cinta adhesiva para que no se abran involuntariamente, protegiendo al personal de los hongos patógenos y evitando la contaminación con hongos externos. El precintado debe ser permeable al aire, ya que cuando el aire circula libremente se favorece la producción de pigmento y la superficie del agar se seca, permitiendo el desarrollo de micelio aéreo y esporas.

3.4.4. Almacenamiento

Los medios se deben guardar refrigerados a 2-8 °C. Para mejorar su conservación y prevenir la desecación, es aconsejable invertir las placas e introducirlas en bolsas de plástico.

Las placas de Petri suelen conservarse en buen estado unos tres meses, mientras que los medios semisólidos o líquidos en tubo de rosca se conservan bien hasta seis meses. Sin embargo, ciertos medios, al contener sustancias inestables (antibióticos, vitaminas, sangre, etc.), no se conservan en buen estado tanto tiempo. También hay que tener presente que algunos componentes de ciertos medios pueden verse afectados por la luz, por lo que estos medios deben almacenarse en contenedores opacos.

Como norma general, todos los medios deben utilizarse antes de la fecha de caducidad indicada por el fabricante y, antes de su utilización, deben atemperarse durante unos minutos.

3.4.5. Elección de los medios de cultivo

Los medios más utilizados en el cultivo de hongos son: agar glucosado de Sabouraud, habitualmente con la modificación de Emmons (SDA); agar infusión cerebro-corazón (BHIA) con o sin sangre de cordero al 5%, con o sin antibacterianos; agar inhibidor para mohos (MIA); agar Mycosel/Mycobiotic y agar glucosado de patata (PDA). Sin embargo, los hongos también pueden crecer en medios no selectivos, incluidos la mayoría de los medios bacteriológicos, si se incuban el tiempo suficiente.

La elección y el número de medios a utilizar están condicionados por el coste, la disponibilidad y las preferencias personales, pero siempre se deben incluir medios con antibacterianos y sin ellos.

La incorporación de cicloheximida, inhibidor de muchos hongos considerados contaminantes, ayuda especialmente en las micosis de la piel, aunque pueda inhibir algunos patógenos fúngicos importantes; por ello, debe utilizarse siempre en combinación con otro medio sin cicloheximida.

El aislamiento de algún hongo puede verse dificultado por otros factores como la acidificación del medio utilizado (para impedir el crecimiento de bacterias) o, en el caso de *Malassezia* spp., la utilización de gentamicina. [9]

Los medios más empleados en Micología pueden agruparse en dos categorías en función de su utilidad: aislamiento e identificación. Para el aislamiento, la utilización de 3-4 medios prácticamente cubre todas las necesidades: SDA con/sin antimicrobianos (el más utilizado en Europa y sustituido con frecuencia en EE.UU. por MIA); un medio con cicloheximida y agar infusión cerebro corazón, para las micosis sistémicas endémicas.

Sin embargo, en ciertas situaciones es recomendable la utilización de otros medios:

- i) ALN, Dixon, o SDAC con aceite de oliva para el aislamiento de *Malassezia*;
- ii) medio cromogénico en las muestras de mucosas, para facilitar el diagnóstico de infecciones mixtas por levaduras;
- iii) medio para *Cryptococcus*, para facilitar su detección en muestras donde es frecuente el aislamiento de otras levaduras (muestras respiratorias).

Para la identificación, puede ser necesario un número mayor de medios que dependerá de las etiologías más probables en la zona geográfica, las posibilidades del laboratorio y el nivel diagnóstico esperable según el tipo de centro.

3.4.6. Medios de cultivo más utilizados

A continuación se detallan las principales indicaciones, composición, forma de preparación y los controles de calidad de los medios de cultivo más utilizados en el laboratorio de Micología clínica. Los medios comerciales pueden presentar pequeñas variaciones respecto a lo expuesto en los cuadros.

Agar agua
Estimula la formación de conidios. Recomendable para hifomicetes de pigmentación oscura (dematiáceos) e incluso para dermatofitos poco o nada esporulados. Favorece la esporulación de hongos saprofitos.
Composición
Agar 20 g Agua destilada 1.000 ml
Preparación
a) Calentar hasta disolver todos los componentes. b) Esterilizar a 121 °C durante 15 min. c) Dispensar en placas de Petri. d) De forma opcional, se pueden depositar fragmentos de papel estéril en la superficie del medio solidificado.
Control de calidad
Aspecto: sólido transparente. <i>Microsporum canis</i> : abundante producción de macroconidios principalmente en la zona de contacto entre el agar agua y los bordes del fragmento de colonia poco o nada esporulada.

Agar Czapek Dox*
Se utiliza en el cultivo de hongos saprofitos, especialmente <i>Aspergillus</i> spp. y <i>Penicillium</i> spp. Es el medio de referencia para la identificación de <i>Aspergillus</i> spp.
Composición
Nitrato sódico (NO ₃ Na) 3 g Fosfato dipotásico (PO ₄ K ₂ H) 1 g Sulfato magnésico (SO ₄ Mg.7H ₂ O) 0,5 g Cloruro potásico (ClK) 0,5 g Sulfato ferroso (SO ₄ Fe.7H ₂ O) 0,01 g Sacarosa 30 g Agar 15 g Agua desionizada 1.000 ml
Preparación
a) Calentar hasta disolver todos los componentes. b) Esterilizar a 121 °C durante 15 min. c) Dispensar en placas de Petri.
Control de calidad
Apariencia: Ámbar pálido, sólido trasparente. pH final a 25 °C: 7,3 ± 0,2. <i>Aspergillus flavus</i> : crece, colonia amarilla-verde.
(*) Disponible comercialmente (Becton Dickinson, Difco, Merck, Remel)

Agar Dixon modificado (mDixon)

Utilizado en el cultivo de *Malassezia* spp. Puede modificarse añadiendo cloranfenicol o bien cloranfenicol y cicloheximida.

Composición

Extracto de malta	.36 g
Peptona	.6 g
Ox bile, desecada	.20 g
Tween 40	.10 ml
Glicerol	.2 ml
Ácido oleico	.2 ml
Agar	.12 g
Agua desionizada	.1.000 ml

Preparación

- Calentar hasta disolver todos los componentes.
- Esterilizar a 121 °C durante 15 min.
- Dispensar en placas de Petri.

Control de calidad

Aspecto: Blanco amarillento, no muy sólido.
pH final: 6,0

Malassezia restricta: Crece.

En el medio inhibidor:

M. restricta: Crece.

Aspergillus flavus: Inhibición parcial o completa.

Staphylococcus epidermidis: Inhibición parcial o completa.

Comprobar el crecimiento de las 7 especies.

Agar extracto de malta (MEA)*

Medio para el aislamiento y recuento de levaduras y hongos miceliares. Adecuado para la identificación de zigomicetes y especies de *Aspergillus*, *Penicillium*, *Paecilomyces*, etc. Se han descrito varias formulaciones que incluyen el extracto de malta y agar suplementados con peptonas, maltosa y/o dextrina y/o glicerol.

Composición

Extracto de malta	.20 g
Peptona	.1 g
Glucosa	.20 g
Agar	.15 g
Agua destilada	.1.000 ml

Preparación

- Calentar hasta disolver todos los componentes.
- Esterilizar a 121 °C durante 15 min.
- Enfriar a 45 °C.
- Dispensar en placas de Petri.

Importante: no recalentar.

Control de calidad

Aspecto: ámbar, transparente.
pH final: 5,6 ± 0,1.

Aspergillus niger ATCC 9642: micelio blanco, conidias negras.

Candida albicans ATCC10231: buen crecimiento, colonias crema.

Si se desea ajustar el pH a 3,5, enfriar a 55°C añadir 2-3 ml de ácido láctico al 10% a 100 ml de agar extracto de malta.

Una vez acidificado no se debe volver a calentar.

(*) Disponible comercialmente (Merck; Oxoid)

Agar glucosado de patata* (PDA)

Es un medio utilizado para la estimulación de la formación de conidias, en la preparación de inóculos de hongos miceliales y en la estimulación de producción de pigmentos: rojo en *Trichophyton rubrum*, rosa salmón en *Microsporium audouinii* y amarillo en *Microsporium canis*. Se utiliza con frecuencia en microcultivos para observar las características morfológicas.

Composición

Patata200 g
 Glucosa10 g
 Agar18 g
 Agua desionizada1.000 ml

Preparación

- Pelar las patatas, cortarlas en cubos y hervir en agua durante 1 h.
- Filtrar, añadir la glucosa y el agar y hervir hasta disolver el agar completamente.
- Ajustar el volumen a un litro.
- Esterilizar a 121 °C durante 15 min.

Control de calidad

Aspecto: incoloro o amarillo suave, medio sólido, transparente o translúcido.
 pH final a 25 °C: 5,6 ± 0,2.

M. audouinii: pigmento salmón en el reverso de la colonia.

T. rubrum: rojo intenso en el reverso de la colonia.

T. mentagrophytes: pigmento marrón en el reverso.

(*) Disponible comercialmente (Becton Dickinson, bioMérieux, Merck, Oxoid, Remel)

Agar glucosado de Sabouraud*

Medio poco utilizado ya que normalmente se usa la modificación de Emmons.
 Puede no crecer *Blastomyces dermatitidis*.

Composición

Peptona10 g
 Glucosa40 g
 Agar15 g
 Agua desionizada1.000 ml

Preparación

- Mezclar los ingredientes y hacerlos hervir hasta su disolución completa.
- Esterilizar a 121 °C durante 15 min.
- Dispensar en tubos o placas (si se utilizan tubos de cristal, también se puede dispensar antes de esterilizar).
- Solidificar en posición inclinada.

Modificación

Añadir cloranfenicol (50 mg/l).

Control de calidad

Aspecto: medio sólido, ámbar, transparente.
 pH final a 25 °C: 5,6 ± 0,2.

Trichophyton mentagrophytes: crece.

Staphylococcus epidermidis: inhibición parcial o total en el medio con cloranfenicol.

(*) Disponible comercialmente (Becton Dickinson, Fluka, Oxoid, Remel, Sigma)

Agar glucosado de Sabouraud modificado por Emmons* (SDA)

Es el medio estándar para el aislamiento, esporulación y conservación de muchos hongos. El cambio en el pH y la concentración de glucosa favorece la esporulación.

Composición

Peptona	.10 g
Glucosa	.20 g
Agar	.15 g
Agua desionizada	1.000 ml

Preparación

- Mezclar los ingredientes y hacerlos hervir hasta su disolución completa.
- Esterilizar a 121 °C durante 15 min.
- Dispensar en tubos o placas (si se utilizan tubos de cristal, también se puede dispensar antes de esterilizar).
- Solidificar en posición inclinada.

Modificación (SDAC)

Añadir cloranfenicol (50 mg/l).

Control de calidad

Aspecto: medio sólido, ámbar, transparente.
pH final a 25 °C: 7,0 ± 0,2.

Trichophyton mentagrophytes: crece.

Staphylococcus epidermidis: inhibición parcial o total en el medio con cloranfenicol.

(*) Disponible comercialmente (Becton Dickinson, bioMérieux, Fluka, Oxoid, Remel)

Agar harina de avena (OA)

Favorece la esporulación. Recomendable para la identificación de especies de *Acremonium*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Paecilomyces*, *Phialophora*, *Scopulariopsis*, etc. y para la obtención de las formas teleomórficas asociadas.

Composición

Harina de avena	.30 g
SO ₄ Mg.7H ₂ O	.1 g
PO ₄ H ₂ K	.1,5 g
Agar	.15 g
Agua destilada	1.000 ml

Preparación

- Hervir lentamente los 30 g de harina de avena en 1 l de agua durante 1 h.
- Filtrar y ajustar el volumen del caldo a 1 l.
- Añadir las sales y calentar hasta su disolución.
- Esterilizar a 121 °C durante 15 min.
- Dispensar en placas de Petri.

Control de calidad

Aspecto: medio sólido, blanquecino, opaco.

Fusarium solani: crecimiento rápido, colonia blanco amarillenta, mucosa en el centro.

Cladophialophora carrioni: crecimiento lento, colonia gris verdosa, pulverulenta.

Agar harina de maíz con Tween 80* (Corn Meal Agar, CMA)

Se utiliza en el cultivo y diferenciación de especies de *Candida* basándose en las características miceliales. El Tween 80 se incorpora para demostrar la formación de clamidosporas. Si se le añaden 10 g de glucosa puede utilizarse en la diferenciación de *Trichophyton rubrum* y *Trichophyton mentagrophytes* basándose en la producción de pigmento.

Composición

Harina de maíz40 g
 Agar20 g
 Tween 803 ml
 Agua desionizada1.000 ml

Preparación

- Mezclar la harina de maíz en agua.
- Hervir a fuego lento durante 1 h.
- Filtrar con gasa.
- Medir y completar hasta 1.000 ml.
- Esterilizar a 121 °C durante 10 min. Filtrar.
- Añadir el agar y el Tween 80 y calentar hasta disolver.
- Esterilizar a 121 °C durante 15 min.
- Dipensar en placas de Petri.

Control de calidad

Candida albicans produce clamidosporas.

(*) Disponible comercialmente (Becton Dickinson, Difco, Remel)

Agar infusión de cerebro corazón* (BHIA)

Puede utilizarse como medio enriquecido para aumentar los aislamientos de *Cryptococcus neoformans* a partir de muestras estériles como el LCR. Mantenimiento de la fase levaduriforme de algunas micosis sistémicas, ya sea con sangre o sin ella. En general está indicado para el aislamiento de una gran variedad de patógenos, incluyendo levaduras, mohos y bacterias como *Nocardia*. Adicionado con sangre de carnero al 10%, se utiliza para el aislamiento de todos los hongos incluidos los dimórficos. Pueden añadirse antibacterianos (cloranfenicol y/o gentamicina) para convertirlo en selectivo. En algunas ocasiones también puede adicionarse cicloheximida (facilita el aislamiento de *Histoplasma capsulatum* y *Blastomyces dermatitidis*).

Preparación

- Preparar de acuerdo con el fabricante.
- Hervir los componentes hasta su completa disolución.
- Dispensar en matraces o tubos.
- Esterilizar a 121 °C durante 15 min.
- Enfriar en posición inclinada, si se utilizan tubos.

Control de calidad

Aspecto: Ámbar claro a semitransparente, sin precipitado (cuando no está adicionado de sangre).
 pH final: 7,4 ± 0,2.

Neisseria meningitidis ATCC 13090: crecimiento aceptable a bueno.

Candida albicans: crece bien.

Sporothrix schenckii: conversión a levadura a 37 °C.

(*) Disponible comercialmente. También puede utilizarse en forma de caldo (Becton Dickinson, Biomedic, Difco, Fluka, Oxoid)

Agar inhibidor para mohos* (MIA)

Es un medio enriquecido con sales inorgánicas y adicionado con cloranfenicol y gentamicina. Se utiliza en el aislamiento de hongos sensibles a la cicloheximida (*Cryptococcus*, zigomicetos, etc.) de muestras contaminadas. Permite el desarrollo de la mayoría de los mohos y de las levaduras.

Composición

Triptona	.3 g	Sal A:	
Extracto de carne	.2 g	PO ₄ H ₂ Na	.25 g
Dextrosa	.5 g	PO ₄ HNa ₂	.25 g
Extracto de levadura	.5 g	H ₂ O	.250 ml
Almidón soluble	.2 g	Sal C:	
Dextrina	.1 g	SO ₄ Mg.7H ₂ O	.10 g
Cloranfenicol	.0,125 g	SO ₄ Fe.7H ₂ O	.0,5 g
Gentamicina	.5 mg	ClNa	.0,5 g
Sal A	.10 ml	SO ₄ Mn.7H ₂ O	.2 g
Sal C	.20 ml	Agua desionizada	.250 ml
Agar	.17 g		
Agua desionizada	.970 ml		

Preparación

- Calentar hasta disolver todos los componentes. Enfriar y ajustar el pH a 6,7.
- Esterilizar a 121 °C durante 15 min.
- Dispensar en placas de Petri.

Control de calidad

Trichophyton mentagrophytes: Crece.
Staphylococcus epidermidis: Inhibición parcial o completa.

(*) Disponible comercialmente (Becton Dickinson)

Agar con leche, glucosa y púrpura de bromocresol

Puede utilizarse para la diferenciación de *Trichophyton rubrum* y *Trichophyton mentagrophytes*. *Trichophyton rubrum* melanoide secreta un pigmento que puede parecer alcalinización. El pigmento típico de *T. rubrum* puede verse a través de la colonia, pero no a través del medio. *T. mentagrophytes* granular puede necesitar 10 días para originar un positivo claro. *Microsporium persicolor* crece profusamente pero no alcaliniza.

Composición

- Solución A:
 - Leche desnatada en polvo .80 g
 - Púrpura de bromocresol 1,6% .2 ml (diluido en etanol)
 - Agua desionizada .1.000 ml
- Solución B:
 - Glucosa .40 g
 - Agua desionizada .200 ml
- Solución C:
 - Agar .30 g
 - Agua desionizada .800 ml

Preparación

- Preparar las soluciones A y B y esterilizar por separado a 115 °C durante 8 min.
- Hervir la solución C hasta disolver el agar completamente y esterilizar a 121 °C durante 15 min.
- Añadir las soluciones A y B a la C, mezclar, enfriar a 50 °C y ajustar el pH a 6,6 con ácido clorhídrico 1N.
- Dispensar asépticamente en tubos y dejar enfriar en posición inclinada.

Control de calidad

Aspecto: medio sólido, azul cielo, opaco.
 pH final a 25 °C: 6,6 ± 0,1.
T. rubrum: Crecimiento restringido y sin cambio de pH a los 7 días a 25 °C.
T. mentagrophytes: Crecimiento profuso y alcalinización a los 5 días a 25 °C.

Agar Leeming & Notman (ALN)

Utilizado en el cultivo de *Malassezia* spp. Puede modificarse añadiendo cloranfenicol o bien cloranfenicol y cicloheximida.

Composición

Peptona	.10 g
Glucosa	.5 g
Extracto de levadura	.100 mg
Ox bile desecada	.8 g
Glicerol	.1 ml
Monoestearato de glicerol	.500 mg
Tween 60	.0,5 ml
Leche de vaca entera	.10 ml
Agar	.12 g
Agua desionizada	.1.000 ml

Preparación

- Calentar todos los componentes (excepto la leche) hasta disolver correctamente.
- Esterilizar a 121 °C durante 15 min.
- Añadir la leche.
- Dispensar en placas.

Control de calidad

Aspecto: Blanco amarillento, no muy sólido.

Malassezia restricta: Crece.

En el medio inhibidor:

M. restricta: crece.

Aspergillus flavus: inhibición parcial o completa.

Staphylococcus epidermidis: inhibición parcial o completa.

Agar de Leonian modificado

Indicado para estimular la esporulación en cepas que no esporulan o que presentan estructuras aberrantes.

Composición

Maltosa	.6,25 g
Extracto de malta	.6,25 g
Extracto de levadura	.1 g
KH ₂ PO ₄	.1,25 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	.0,625 g
Peptona	.0,625 g
Agar	.20 g
Agua destilada	.1.000 ml

Preparación

- Calentar hasta disolver todos los componentes.
- Esterilizar a 121 °C durante 15 min.
- Dispensar en placas de Petri.

Control de calidad

Aspecto: medio sólido, transparente.

Aspergillus fumigatus a 37 °C: esporulación característica.

Agar patata zanahoria (PCA)

Idóneo para estimular la esporulación de hongos miceliares; muy indicado para la identificación de hongos dematiáceos.

Composición

Patata rallada	.20 g
Zanahoria rallada	.20 g
Agar	.18 g
Agua	.1.000 ml

Preparación

- Lavar, pelar y rallar o trocear los vegetales y hervirlos lentamente en 1 l de agua durante 1 h.
- Filtrar y añadir al caldo el agar correspondiente.
- Esterilizar a 121 °C durante 15 min.
- Dispensar en placas de Petri o tubos.

Control de calidad

Aspecto: medio sólido, transparente o translúcido.

Alternaria alternata: poco micelio y abundante producción de conidios en cadenas.

Agar Sabouraud con cicloheximida y cloranfenicol* (MYC)

Es un medio selectivo utilizado para el aislamiento de hongos patógenos a partir de muestras muy contaminadas con hongos saprofitos y bacterias. Se utiliza fundamentalmente en el aislamiento de dermatofitos y hongos dimórficos. Inhibe algunas especies de hongos de interés médico (*Candida* no *albicans*, *Aspergillus*, *Zygomycetes*, *Cryptococcus neoformans*, etc.).

Composición

Se utilizan fundamentalmente Mycosel y Mycobiotic, ambos comercializados.

Preparación

De acuerdo con las instrucciones, evitar manipular la cicloheximida.

Control de calidad

Aspecto: Agar firme, amarillento, transparente.

Trichophyton mentagrophytes: Crece.

Aspergillus flavus: Inhibición parcial o completa.

Staphylococcus epidermidis: Inhibición parcial o completa.

(*) Disponible comercialmente (Becton Dickinson, Biomedics, Bio-Rad, Difco, Oxoid, Remel, Sigma)

Agar de Staib (*Guizotia abyssinica*). Agar semillas de alpiste

Utilizado para aislar *Cryptococcus* spp. y *Cryptococcus neoformans*. *C. neoformans* es el único que al metabolizar la *Guizotia abyssinica* (alpiste), produce melanina originando un color marrón oscuro. El cloranfenicol lo convierte en medio selectivo. También puede ser útil en la diferenciación de *Candida dubliniensis* [6].

Composición

Glucosa	10 g
Creatinina	0,78 g
Cloranfenicol	0,05 g
Difenilo (disuelto en 10 ml de etanol 95%)	100 mg
<i>Guizotia abyssinica</i>	70 g
Agar	20 g
Agua desionizada	1.000 ml

Preparación

- Moler las semillas y añadir 350 ml de agua.
- Esterilizar en autoclave y filtrar.
- Añadir agua hasta 1.000 ml.
- Añadir el resto de los componentes excepto el difenilo.
- Esterilizar a 121 °C 15 min. Enfriar a 45 °C.
- Añadir el difenilo antes de dispensar el medio en las placas.

Controles

C. neoformans y *Cryptococcus* spp.

Agar *Trichophyton* (1 a 7)*

Son siete medios que se utilizan en la identificación de especies de *Trichophyton* basándose en sus requerimientos nutricionales. El crecimiento se valora desde el 1 al 4 (0 = no-crecimiento; 1 = crecimiento ligero; 2 = parcialmente estimulado, pero inferior al control; 4 = crecimiento comparable con el control).

Composición

- Trichophyton* agar #1:

Ácidos casamínicos (libres de vitaminas)	2,5 g
Glucosa	40 g
Fosfato monopotásico (PO ₄ :KH ₂)	1,8 g
Sulfato magnésico (SO ₄ :Mg.7H ₂ O)	0,1 g
Agar	15 g
Agua desionizada	1.000 ml
- Trichophyton* agar #2 = #1 + inositol50 mg
- Trichophyton* agar #3 = #1 + inositol50 mg
+ tiamina. CIH0,2 mg
- Trichophyton* agar #4 = #1 + tiamina. CIH . . .0,2 mg
- Trichophyton* agar #5 = #1
+ ácido nicotínico (niacina) . . .2,0 mg
- Trichophyton* agar #6:

Nitrato amónico (NO ₃ :NH ₄)	1,5 g
Glucosa	40 g
Fosfato monopotásico (PO ₄ :KH ₂)	1,8 g
Sulfato magnésico (SO ₄ :Mg.7H ₂ O)	0,1 g
Agar	15 g
Agua desionizada	1.000 ml
- Trichophyton* agar #7 = #6
+ histidina.CIH30 mg

Preparación

- Mezclar los ingredientes y hervir hasta disolver completamente.
- Dispensar en tubos.
- Esterilizar a 121 °C durante 15 min.
- Enfriar en posición inclinada.

Control de calidad

Aspecto: Agar inclinado, ámbar, transparente.
pH final a 25 °C: 6,8 ± 0,2

(* Disponible comercialmente (Becton Dickinson, Difco, Remel)

Agar urea de Christensen*

Se utiliza en la identificación de algunos dermatofitos, especialmente para diferenciar *Trichophyton rubrum* de *Trichophyton mentagrophytes*, y de algunas levaduras (*Cryptococcus neoformans*).

Composición

Peptona1 g
Glucosa1 g
ClNa5 g
PO ₄ KH ₂2 g
Rojo de fenol12 mg
Agar20 g
Agua desionizada900 ml

Preparación

- Calentar hasta disolver todos los componentes y esterilizar los 900 ml de agar a 121 °C durante 15 min.
- Añadir 100 ml de solución de urea (20% en agua, esterilizar por filtración) a 900 del medio enfriado a 50 °C.
- Dispensar en tubos. Solidificar en posición inclinada.
- También puede prepararse a partir Urea agar base (Christensen), que se esteriliza por filtración y se añade al agar estéril.

Control de calidad

Aspecto: Agar inclinado, naranja, transparente.
pH final: 6,8 ± 0,2

T. mentagrophytes: ureasa positiva (rojo).

T. rubrum: ureasa negativa (naranja).

Cuando se usa para levaduras: *C. neoformans* (positiva) y *Candida albicans* (negativa).

(*) Disponible comercialmente (Becton Dickinson, Biomedics, Difco, Fluka, Merck, Remel, Sigma)

CHROMagar Candida*

CHROMagar contiene diversos sustratos enzimáticos que están unidos a compuestos cromogénicos. Cuando enzimas específicas descomponen el sustrato, se produce color. Las colonias deben evaluarse a las 48 h. La siembra de muestras directamente aumenta un 20% el número de cultivos mixtos. Puede utilizarse como ayuda en la identificación de levaduras aisladas en otros medios no cromogénicos. Es interesante también su utilización para comprobar la pureza de las cepas en las pruebas de sensibilidad. Permite la identificación rápida de especies resistentes. Puede utilizarse en mucosas, heridas con flora mixta, hemocultivos y orinas, especialmente. Es necesario seguir con rigor las condiciones establecidas por el fabricante. Incubar a 35 °C, en cámara húmeda y en oscuridad, 48 a 72 h (no <48 h). Recientemente se ha modificado para evitar productos de países con encefalopatía espongiforme [10]. Puede adicionarse con fluconazol (8 µg/ml) para la detección de cepas con sensibilidad disminuida [11].

Composición

Peptona10 g
Glucosa20 g
Agar15 g
Cloranfenicol500 mg
Mezcla cromogénica2 g
Agua desionizada1.000 ml

Preparación

Generalmente se suministra preparado.

Si se prepara a partir del polvo deshidratado, disolver en agua caliente, sin hervir. No esterilizar mediante calor (los cromógenos se desnaturalizan). Seguir las instrucciones del fabricante.

Control de calidad

Aspecto: Ámbar claro.

Candida albicans: Crece con color característico (colonia verde esmeralda).

Candida krusei: Crece con color y aspecto característicos (colonia rosa y rugosa).

Escherichia coli: Inhibición.

(*) Disponible comercialmente (Becton Dickinson, Biomedics, CHROMagar). Es el medio cromogénico más utilizado, existiendo otras variantes.

Dermatophyte test medium* (DTM)

Medio utilizado para el aislamiento de dermatofitos en muestras muy contaminadas, proporcionando una identificación presuntiva. Los dermatofitos producen alcalinización, virando el medio de amarillo a rojo, algunas bacterias y hongos también pueden producir alcalinización. El pigmento característico de algunos dermatofitos no se puede identificar. La cicloheximida inhibe muchos de los hongos saprofitos.

Composición

Peptona10 g
Glucosa10 g
Agar20 g
Solución de rojo fenol40 ml
ClH 0,8 M6 ml
Cicloheximida0,5 g
Sulfato de gentamicina100 µg/ml
Clortetraciclina100 µg/ml

Preparación

- Mezclar la peptona, glucosa y agar en 1.000 ml de agua desionizada y hervir hasta disolver el agar.
- Añadir 40 ml de la solución de rojo fenol mientras se remueve (Solución de rojo fenol: 0,5 g de Bacto-Phenol red disolver en 15 ml de NaOH 0,1 N; completar hasta 100 ml con agua desionizada).
- Ajustar el pH añadiendo 6 ml de ClH 0,8 M mientras se remueve.
- Disolver 0,5 g de cicloheximida en 2 ml de acetona y añadir al medio caliente mientras se remueve.
- Disolver el sulfato de gentamicina en 2 ml de agua, añadir al medio mientras se remueve.
- Esterilizar a 121 °C. Enfriar hasta unos 47 °C.
- Disolver la clortetraciclina en 25 ml de agua desionizada estéril. Añadir al medio mientras se agita.
- Dispensar en placas o en tubos.

Control de calidad

Aspecto: Agar amarillo naranja, transparente.

Trichophyton verrucosum: crece y alcaliniza.

Aspergillus flavus: inhibición parcial o completa.

Staphylococcus epidermidis: inhibición parcial o completa.

(*) Disponible comercialmente (Becton Dickinson, Fluka, Merck, Remel)

Medio de arroz

Se utiliza para la diferenciación de cepas atípicas de *Microsporium audouinii* y *Microsporium canis*.

Composición

Arroz blanco no enriquecido8 g
Agua desionizada25 ml

Preparación

- Mezclar los ingredientes en un matraz Erlenmeyer.
- Esterilizar a 121 °C durante 15 min.

Control de calidad

Aspecto: granos de arroz cocido.

M. canis: presenta buen crecimiento, pigmento amarillo y esporulación abundante.

M. audouinii: no presenta crecimiento o es escaso, coloración marronácea.

Con asa micológica, transferir una pequeña porción del aislamiento al matraz con los granos estériles.

3.4.7. Incubación

La temperatura óptima de crecimiento de la mayoría de los hongos patógenos es 30 °C. Sin embargo, *Sporothrix schenckii* es una excepción, crece más rápido a 27-28 °C.

Hay laboratorios que utilizan la temperatura ambiente en lugar de 30 °C, pero no es recomendable, ya que los cambios de temperatura son notables entre el día y de la noche en la mayoría de los laboratorios. La temperatura de 37 °C no se recomienda por dos razones principales: 1) muchas muestras contienen abundantes bacterias que crecen muy bien a esta temperatura y 2) algunos hongos crecen mal a esta temperatura o no crecen, especialmente los hongos que infectan la piel [12].

No hay ventaja en incubar simultáneamente a 30 °C y a 37 °C. La temperatura de 37 °C debe reservarse para hongos dimórficos o algún hongo que se desarrolle mejor a esta temperatura [10]. Una estufa a 37 °C es también necesaria para verificar la tolerancia a esta temperatura. Sin embargo, utilizar 37 °C para el aislamiento del estadio levaduriforme de *Histoplasma* o *Blastomyces* no aporta ventajas y, además, son morfológicamente indistinguibles de otras levaduras.

Si la estufa no está humedecida, es conveniente poner un recipiente con agua cerca de las placas de cultivo [13]. Los cultivos de hongos deben incubarse durante 3-4 semanas antes de ser desechados. Los cultivos no deben desecharse cuando se aísla un hongo, debe completarse el periodo de incubación [11]. Sin embargo, hay muestras que se pueden eliminar a los 7 días de forma habitual (orina y exudados de mucosas).

3.5. Informe de los resultados

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

3.5.1. Observación microscópica

Debe informarse en el día ya que aporta una importante ayuda al clínico; sus pacientes pueden salir de la consulta de dermatología con un diagnóstico presuntivo (dermatofitosis), que habrá que confirmar con el cultivo o definitivo (pitiriasis versicolor). La tinta china en buenas manos (criptococosis) y la inmunofluorescencia (neumocistosis) también son diagnósticas. Otras observaciones positivas permiten una orientación terapéutica (mucormicosis, aspergilosis, etc.). Es recomendable observar los exámenes en fresco negativos al día siguiente.

Este informe es fundamental en toda muestra estéril y permite saber si la muestra posee suficiente calidad.

El informe oral es muy importante para la correcta valoración de la muestra y contrastar la eficiencia del laboratorio, además de adecuar la relación con el clínico. Todo informe oral debe seguirse de otro escrito, reflejando que existe un informe oral previo.

3.5.2. Cultivo

El cultivo negativo se descarta, generalmente, a las cuatro semanas de incubación, con las excepciones citadas en el tiempo de lectura. La prolongación de la incubación después de tres semanas aporta poca información adicional y, dependiendo del sistema de lectura, puede suponer una sobrecarga de trabajo que hay que valorar adecuadamente en cada laboratorio [12].

Los cultivos positivos se informan, de la misma manera que la observación microscópica, en el momento en el que se disponga del crecimiento. En los casos en los que hay que realizar aislamientos repetidos (uña), al cuestionarse el significado del hongo aislado, se informará de la misma manera. En ambos casos, hay que valorar el beneficio para el paciente y el esfuerzo en la localización del clínico responsable, por lo que la utilización del correo electrónico, buzón intranet o cualquier sistema electrónico, siempre y cuando se asegure la confidencialidad, para este tipo de informes, ayuda sensiblemente al establecimiento de una rápida y fluida comunicación entre el micólogo y el clínico.

En todo informe escrito debe figurar si se trata de un informe provisional o definitivo. Para los aislamientos realizados en Bacteriología y remitidos a Micología, debe establecerse un mecanismo que garantice la correcta llegada del resultado al médico:

1. Si la numeración del laboratorio es única, se realizarán informes provisionales en los que se refleje la transferencia de la cepa.
2. Si la numeración es diferente, en el registro de Micología figurará que es una cepa recibida de Bacteriología y su número original.

En el informe debe figurar el resultado definitivo. En el caso de ser positivo, debe incluir la identificación de la especie aislada y el estudio de sensibilidad, si procede.

Cuando el significado es de dudosa interpretación debe hacerse constar.

3.5.3. Informe telefónico

Por sus especiales características, en este tipo de informes se deben seguir unas recomendaciones especiales:

1. Cuando no sea posible contactar con el facultativo solicitante, se intentará hablar con el responsable o el jefe de servicio. No se dará nunca el informe a una persona no cualificada.

2. Deben facilitarse siempre los datos que garanticen que el informe corresponde al paciente sobre el que se nos pregunta:

- Nombre del paciente
- Localización (habitación, centro de salud, etc.)
- Tipo de cultivo
- Fecha de recogida de la muestra
- Resultados

3. En el registro del laboratorio debe anotarse:

- Día y hora de la llamada
- Nombre del médico que recibe la información
- Persona que proporciona la información

4. La persona que da el informe debe seguir al menos los siguientes pasos:

- Repetir el nombre del paciente
- Repetir la localización del paciente
- Informar el estado actual del estudio

La gestión de la información hay que adaptarla a las circunstancias de cada laboratorio y un modelo podría ser el reflejado en la **Figura 3.1**.

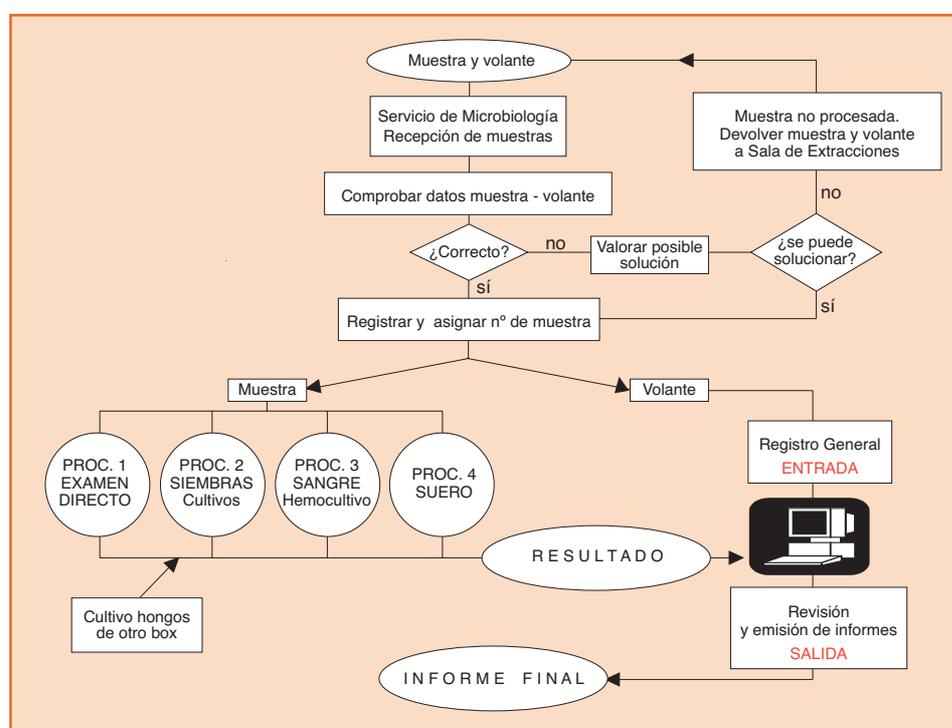


Figura 3.1. Modelo de gestión de la información en un laboratorio de Micología Clínica.

Referencias

- Gilligan PH. Impact of clinical practice guidelines on the clinical microbiology laboratory. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 1391-1395.
- Sutton DA. Specimen collection, transport, and processing: Mycology. En: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC (Eds.) *Manual of Clinical Microbiology*, 8th ed. Washington DC, ASM 2003: 1659-1667.
- Stringfellow J, Flores M. En: Isenberg HD (Ed.) *Clinical microbiology procedures handbook*. Washington DC, ASM (Incluido Supplement 1), 1992.
- Hazen KC. Mycology and aerobic *Actinomycetes*. En: Isenberg HD (Ed.) *Essential Procedures for Clinical Microbiology*. Washington DC, ASM, 1998.
- Shea YR, Witebsky FG, Walsh TJ. Specimen selection, collection, and transport. En: Isenberg HD (Ed.) *Microbiology procedures handbook*. Washington DC, ASM, 2004.
- LaRocco M. Processing specimens for fungal culture. En: Isenberg HD (Ed.) *Microbiology procedures handbook*. 8.4. Washington DC, ASM, 2004.
- National Committee for Clinical Laboratory Standard. QC assurance for commercially prepared microbiological culture media. Approved Standard. M22-A. Villanova, National Committee for Clinical Laboratory Standard., 1990.
- De Hoog GS, Guarro J. Atlas of clinical fungi. Baarn and Delf / Reus, Centraalbureau voor Schimmelfcultures / Universitat Rovira y Virgili, 2000.
- Aspiroz C, Rezusta A, Rubio MC, Gómez-Lus R. *Malassezia pachydermatis* failure to grow on a commercial Sabouraud medium with gentamycin. 14th ISHAM World Congress. Buenos Aires 2000
- Jabra-Rizk MA, Brenner TM, Romagnoli M, Baqui AA, Merz WG, Falkler WA Jr, Meiller TF. Evaluation of a reformulated CHROMagar Candida. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 2015-2016.
- Pfaller MA, Houston A, Coffmann S. Application of CHROMagar Candida for rapid screening of clinical specimens for *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, and *Candida (Torulopsis) glabrata*. *J Clin Microbiol* 1995 34: 59-61.
- Kwon-Chung KJ, Bennett John E. *Medical Mycology*. Philadelphia, Lea & Febiger, 1992.
- Larone D. *Medically important fungi. A Guide to identification*. Washington, ASM, 1995.
- Labarca JA, Wagar EA, Grasmick AE, Kokkinos HM, Bruckner DA. Evaluation of 4-week incubation for fungal cultures: is the fourth week useful? *J Clin Microbiol* 1998; 36: 3683-3685.
- Passarell L. Use and Publishing Guideline. URL: <http://fungus.utmb.edu>, 1999.

Bibliografía complementaria

- Al-Doory Y. *Laboratory Medical Mycology*. Philadelphia, Lea y Febiger, 1980.
- Anaissie E, Pfaller MA, McGinnis MR. *Clinical Mycology*, Londres, Churchill Livingstone, 2002.
- Chapin KC, Murray PR. En: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC. *Manual of Clinical Microbiology*. Washington DC, ASM, 1999: 1687-1707.
- Hazen KC, Howell SA. Isenberg HD. *Clinical microbiology procedures handbook*. Washington DC, ASM, 2004.
- Kane J, Summerbell RC. *Trichophyton, Microsporium, Epidermophyton*, and agents of superficial mycoses. En: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC. *Manual of Clinical Microbiology*. Washington DC, ASM, 1999: 1275-1294.
- Koneman EW, Roberts GD. *Micología práctica de laboratorio*, 3^{ra} ed. Buenos Aires, Ed. Panamericana, 1987.
- Kwon-Chung KJ, Bennett JE. *Medical Mycology*. Philadelphia, Lea & Febiger, 1992.
- Merz WG, Roberts GD. Algorithms for detection and identification of fungi. En: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC. *Manual of Clinical Microbiology*. Washington DC, ASM, 1999: 1167-1183
- Passarell L. Use and Publishing Guideline, 1999. URL: <http://fungus.utmb.edu>.
- Smith E, Rogers AL. *Medical mycology and human mycoses*. Belmont California, Star Publishing Company, 1996.
- St-Germain G, Summerbell R. *Identifying filamentous fungi. A clinical Handbook*. California, Star Publishing-Belmont, 1996.
- Sutton DA. Specimen collection, transport, and processing: Mycology. En: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC (Eds.) *Manual of Clinical Microbiology* 8th ed. Washington DC, ASM, 2003: 1659-1667.
- McGinnis MR. *Laboratory Handbook of Medical Mycology*. New York, Academic Press, 1980
- <http://www.clinical-mycology.com/>
- <http://www.doctorfungus.org/>
- <http://www.aspergillus.man.ac.uk/indexhome.htm>
- <http://dir.yahoo.com/science/biology/mycology/>