

M^a Soledad Cuétara

4.1. Introducción

En los últimos años, se ha observado una tendencia creciente, por parte de los micólogos, a separar las infecciones de la piel, pelos y uñas en dos grupos (Tabla 4.1): micosis superficiales (incluyen aquellas enfermedades que generalmente no producen una respuesta inflamatoria en el huésped) y micosis cutáneas (donde el hongo se confina al estrato córneo y produce cambios inflamatorios); sin embargo, en sentido estricto, esta clasificación es artificial ya que las micosis profundas oportunistas, las subcutáneas y las causadas por hongos dimórficos también pueden tener manifestaciones cutáneas.

Tabla 4.1. Clasificación de las micosis que afectan a la piel y sus anejos.

Micosis superficiales:

- Pitiriasis versicolor (*Malassezia* spp.)
- Piedra blanca (*Trichosporon* spp.)
- Piedra negra (*Piedraia hortae*)
- Tinea nigra (*Phaeoannelomyces werneckii*)

Micosis cutáneas:

- Candidiasis y micosis por otras levaduras (*Geotrichum* spp., *Hansenula* spp.)
- Dermatofitosis (*Epidermophyton* spp., *Trichophyton* spp. y *Microsporum* spp.)
- Dermatomicosis (*Penicillium* spp., *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., etc.)

4.2. Diagnóstico de laboratorio de las micosis superficiales

Ante la sospecha clínica de una micosis superficial (Capítulo 2), el clínico tiene que confirmar la infección recurriendo a una serie de procedimientos de laboratorio que incluyen la detección del organismo en el tejido (por examen directo o estudio histológico), el aislamiento del patógeno en el cultivo y, excepcionalmente, el reconocimiento de la respuesta inmune específica por técnicas histológicas.

El laboratorio, al realizar el diagnóstico etiológico, puede confirmar la sospecha clínica de micosis, permitiendo la elección del tratamiento específico y la valoración del mismo. Para facilitar la labor al micólogo y enfocar el diagnóstico convenientemente, es muy importante que el laboratorio reciba las muestras bien identificadas y los datos de interés clínico (comienzo y evolución de la enfermedad, tratamientos administrados) y epidemiológico (viajes, residencias en el extranjero, contactos con animales, trabajo, etc.) convenientemente cumplimentados [1].

Para el correcto aislamiento del agente etiológico se requiere:

- Una adecuada toma de muestra
- Rápido transporte al laboratorio
- Pronto y correcto procesamiento
- Inoculación en medios de cultivo adecuados
- Incubación a temperatura óptima

4.2.1. Toma de muestras de micosis superficiales

Los resultados de laboratorio dependen de la toma de muestra, la cual debe hacerse antes de instituido el tratamiento o cuando éste se ha suspendido previamente (1-2 semanas, para piel o pelo; varios meses, para las uñas). Las micosis superficiales estudiadas en este capítulo se limitan a la piel, el pelo y las uñas. Otros procesos que afectan a las capas más superficiales de la piel son producidos por bacterias y no forman parte de esta Guía; sin embargo, el eritrasma (producido por *Corynebacterium minutissimum*) se ha estudiado clásicamente dentro de la Micología Médica y requiere habitualmente un diagnóstico diferencial con las micosis superficiales (págs. 4-2 y 4-6).

Para la adecuada toma de muestra de las micosis superficiales se recomienda seguir las siguientes recomendaciones: examen con luz de Wood, limpieza del área afectada y recogida de la muestra.

Examen con luz de Wood

Antes de realizar la toma de muestras de una micosis superficial es aconsejable examinar las lesiones de la piel (sospechosas de pitiriasis versicolor o eritrasma) y cuero cabelludo (dermatofitosis)

en una habitación completamente oscura bajo la luz de Wood (luz ultravioleta de 365 nm de longitud de onda, que pasa a través de un filtro de cristal que contiene óxido de níquel). La piel normal muestra un color azul, mientras que en infecciones bacterianas como el eritema, emite fluorescencia roja coral.

En micosis como la pitiriasis versicolor, las áreas afectas emiten una fluorescencia brillante verdosa amarillenta (pudiendo poner de manifiesto lesiones no perceptibles a simple vista). En *tinea capitis* debidas a *Microsporum* spp. o *Trichophyton schoenleinii*, las lesiones muestran una fluorescencia característica.

El descubrimiento de Margot y Devez, en 1925, de que pelos infectados por ciertos dermatofitos producían una fluorescencia característica bajo la luz ultravioleta de la lámpara de Wood fue un importante avance en la Micología Médica. La naturaleza y fuente de las sustancias fluorescentes en los pelos infectados no son del todo conocidas y la sugerencia de que era una pteridina ha sido cuestionada. El pelo permanece fluorescente después de que el hongo deje de ser viable, y el material fluorescente puede ser extraído del pelo en agua caliente o solución fría de bromuro de sodio. Debido a que el crecimiento del hongo, en el medio de cultivo o de forma *in vitro* en el pelo, no origina fluorescencia, esta se atribuye a alguna sustancia producida por la interacción entre el crecimiento del hongo y del pelo. Solamente algunos dermatofitos capaces de invadir el pelo producen fluorescencia:

- *M. canis* y *M. audouinii*, siempre producen fluorescencia verde; sin embargo, *M. gypseum* y *M. nanum*, lo hacen ocasionalmente.
- *T. schoenleinii*, causa una fluorescencia verde pálida.

En áreas geográficas donde *Microsporum* spp. y el favus son prevalentes, la luz Wood es una herramienta esencial tanto en el diagnóstico y el tratamiento del enfermo, como en el control de epidemias. Además, la lámpara es fácilmente transportable y puede ser usada en instituciones para el rápido examen de los contactos.

Un consejo...

- La fuente más común de errores en el examen con luz de Wood es una habitación insuficientemente oscura o la existencia de sustancias químicas capaces de emitir fluorescencia (cosméticos, productos terapéuticos, etc.).

Limpieza del área afectada

Antes de realizar la recogida de la muestra, la piel, pelos o uñas afectados deben limpiarse con etanol (70%) para eliminar la flora bacteriana, exudación o restos de excipientes de tratamientos previos que dificultan el examen directo y el cultivo.

Recolección del material

Escamas

En las lesiones descamativas, deben recogerse las escamas de las zonas afectas con fluorescencia positiva (pitiriasis versicolor o eritema) o con fluorescencia negativa (candidiasis y dermatofitosis), raspando su borde activo con un **escapelo** desechable, ya que dicho borde es el que más probablemente contenga elementos fúngicos viables. Cuando existen lesiones satélites (candidiasis), el raspado se realiza de dichas lesiones por ser las más jóvenes.

El material obtenido se recoge en un sobre o placa de Petri (debidamente precintada), con el fin de mantenerlo seco y libre de contaminación. El uso de contenedores de plástico puede tener el inconveniente de que las escamas se adhieran a sus paredes dificultando su recuperación; mientras que el uso de portaobjetos de cristal, tiene el riesgo de pérdida de material por ruptura del vidrio en el transporte. Los dermatofitos en los raspados de la piel pueden permanecer viables durante meses.

En la pitiriasis versicolor parcialmente tratada, la descamación es escasa, por lo que se recomienda hacer la toma con la técnica del **papel cello**, para ello se aplica la zona adherente de la cinta sobre la piel a estudiar, presionando enérgicamente, se despegar y se coloca sobre un portaobjetos.

En intertrigos candidiásicos, las lesiones no suelen ser descamativas sino exudativas, en cuyo caso no se debe raspar porque resultaría una técnica cruenta, sino que el material se recoge con **torunda estéril** con/sin humedad. Si el espécimen no va a ser procesado inmediatamente, se prefiere el empleo de torunda con un medio de transporte (como el de Stuart) ya que las levaduras pierden rápidamente la viabilidad en los hisopos secos. Pero hay que tener presente que el retraso en el procesamiento de estas torundas permite la multiplicación de las bacterias en la muestra y que, además, el medio de transporte la diluye, dificultando la observación directa.

Existe una técnica complementaria o alternativa para la recogida de las escamas en las micosis cutáneas (candidiasis y dermatofitosis): el método del cuadrado de **moqueta** de Mariat y Adan-Campos [2]. Consiste en frotar 5 veces con un cuadrado de alfombra de lana estéril la totalidad de la

superficie a examinar (piel glabra o cuero cabelludo) (Figura 4.1); posteriormente, la moqueta se guarda en un sobre de papel o en una caja de Petri y se envía al laboratorio de Micología para su procesamiento. Este procedimiento tiene varias ventajas: i) no es cruento para el paciente, ii) es útil para realizar tomas de *tinea capitis* con fluorescencia negativa, iii) permite estudiar a portadores asintomáticos de dermatofitos o pacientes ya tratados, cuando la lesión clínica ha desaparecido, iv) facilita los estudios epidemiológicos de tiña y v) permite estudiar animales (gatos, perros, etc.) que pueden ser reservorio de dermatofitos. Sin embargo, tiene el inconveniente de que con esta técnica no se puede realizar la observación directa, solamente el cultivo.



Figura 4.1. Toma de lesión en piel glabra con moqueta.

Pelos

Dependiendo del tipo de lesión observada, los pelos deben recogerse mediante diversas técnicas:

- En la Piedra blanca o la Piedra negra, ambas confinadas a la vaina del pelo, se debe cortar la porción suprafolicular de los pelos enfermos.
- En las tiñas del cuero cabelludo o de la barba, es importante recoger los pelos parasitados arrancándolos con la raíz intacta, ya que cortar los pelos es menos eficaz. En muchas ocasiones, los pelos parasitados se reconocen porque tienen una fluorescencia positiva con luz de Wood, están deslustrados, rotos, friables o se desprenden fácilmente con el raspado.

Las tiñas microspóricas (*M. canis* y *M. audouinii*) se reconocen por presentar una placa escamosa blanquecina con escasa o nula inflamación, que puede alcanzar varios centímetros de diámetro, y en la cual se observan pelos rotos a 5-10 mm de la superficie cutánea, estos pelos parasitados son friables y se arrancan con facilidad al raspar con el escalpelo (Figura 4.2).



Figura 4.2. Paciente con lesiones de *tinea capitis* por *M. canis*.

Las tiñas tricofíticas antropofílicas (*Trichophyton tonsurans* y *T. violaceum*), forman pequeñas placas escamosas con pelos de poca longitud, en forma de W o Z, situados en el espesor de la escama o bien rotos al nivel de la superficie dando un aspecto de “puntos negros”, casi siempre en ausencia de inflamación. Estos “puntos negros” son los que deben extraerse con la punta del escalpelo o mediante pinzas. Sin embargo, cuando la infección se debe a especies zoofílicas (*T. mentagrophytes* var. *mentagrophytes* y *T. verrucosum*) se observan placas escamosas de tamaño variable, que se inflaman y se elevan sobre la superficie cutánea, apareciendo numerosas pústulas foliculares que originan un Kerion (Figura 4.3). Los pelos situados en la placa tienen una longitud variable pudiéndose extraer con facilidad sin causar dolor al paciente.

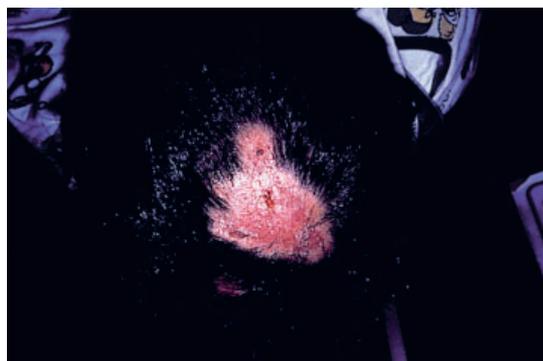


Figura 4.3. Paciente con lesiones de *tinea capitis* por *T. mentagrophytes* var. *mentagrophytes*.

La tiña favosa (*T. schoenleinii*) presenta costuras amarillentas, cóncavas y centradas por un pelo, denominadas escútlulas o cazoletas fávicas. Están formadas por un conglomerado de hifas que originan una foliculitis y, con el tiempo, alopecia cicatricial por destrucción de la matriz. La muestra de estas lesiones debe ser tomada con asa (el pus folicular) y cucharilla (las cazoletas).

Algunos autores recomiendan que en lesiones de tiña tricofítica, en las cuales se encuentran mezclados pelos sanos y enfermos, es útil cortar 20 a 30 pelos a una altura de 1 cm (en un área de 4-5 cm de diámetro) y, posteriormente, depositarlos en un portaobjetos, previamente calentado o en una placa de Petri, destinando una parte del mismo al examen directo y otra al cultivo.

En la *tinea capitis*, además, se pueden realizar tomas con la moqueta de Mariat y Adan-Campos y con un cepillo de plástico estéril de diámetro inferior a la placa de Petri donde se va a sembrar (Figura 4.4). Este método de cultivo es extremadamente sensible y de gran valor para estudios epidemiológicos de contactos de niños infectados y de animales domésticos sospechosos. Consiste en cepillar enérgicamente 10 veces el cuero cabelludo y posteriormente implantar las púas del cepillo sobre la superficie del agar (técnica descrita por MacKenzie [3] y usada por Clayton y Midgley [4,5]). Antes de reutilizar estos cepillos deben esterilizarse con óxido de etileno.

Un consejo...

- En lesiones dolorosas e inflamatorias, como el Kerion, o en niños sensibles, puede ser difícil la toma de muestras. En estos casos, el uso de una torunda humedecida sobre la zona afectada puede ser el único medio incruento de realizar la toma. Con esta técnica es posible obtener cultivos positivos, pero resultados negativos no excluyen la infección.

Uñas

En las onicomicosis, la toma de muestras varía en función del tipo de lesión clínica [6-8]:

Onicomicosis distal y lateral subungueal o uña en “médula de junco”: la lesión comienza en el epitelio del lecho ungueal del borde libre de la uña y va extendiéndose hacia la parte más profunda (ventral) de la tabla ungueal y proximalmente hacia la matriz. La sustancia de la uña se sustituye por un material amarillento y friable, mientras que la lámina exterior puede estar infectada o destruida. Los tres signos clínicos mayores interdependientes son: hiperqueratosis subungueal, onicolisis y paroniquia; los alicates son esenciales para recoger el material subungueal y cortar los trozos de la parte más proximal de la tabla ungueal, ya que aunque sea la menos accesible, es la que menos se contamina y presenta elementos fúngicos más jóvenes y viables [9]. Esta forma se ve típicamente en la *tinea unguium* (*Trichophyton rubrum*), y en infecciones por *Scopulariopsis* spp. o *Scytalidium dimidiatum*. En ocasiones, en formas excepcionales de onicomi-

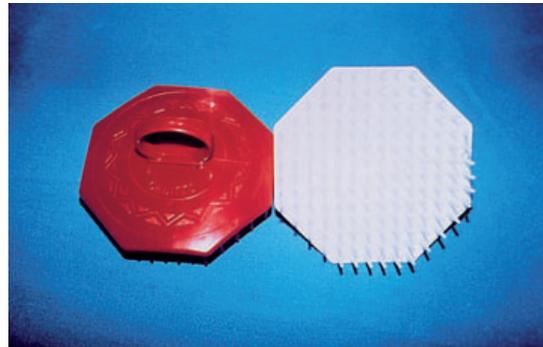


Figura 4.4. Cepillo de plástico empleado en la toma de muestras de cuero cabelludo.

cosis por *Candida* spp. en pacientes con enfermedad de Raynaud o con corticoterapia, la lesión comienza con una inflamación del borde periungueal y termina con una afectación lateral de la tabla ungueal que aparece plisada. En estos casos se tomará como muestra complementaria el pus de la paroniquia acompañante con torunda o asa estéril, tras una incisión con lanceta o compresión de la porción lateral del dedo.

Onicomicosis proximal subungueal: comienza en la porción ventral del pliegue proximal de la uña y luego invade el área proximal de la tabla ungueal y eventualmente la matriz. Pueden cursar sin paroniquia (en recidivas de *tinea unguium* tratadas o algunas por *Candida* spp.) o con paroniquia (por *Candida albicans* o por hongos miceliales no dermatofitos como *Fusarium* spp., *Scopulariopsis* spp. o *Aspergillus* spp.). En estos casos se debe recoger el material decolorado (blanquecino, verde o negruzco) de la porción más profunda de la tabla ungueal más cercana a la cutícula, raspando con el bisturí en la profundidad del surco periungueal, así como en caso de paroniquia acompañante proceder a la toma del pus como previamente se menciona.

Onicomicosis superficial: afecta a la superficie de la tabla ungueal y comprende:

La **onicomicosis blanca superficial** se manifiesta como una mancha blanca lechosa en un punto cualquiera de la superficie de la uña que se va extendiendo progresivamente. Es debida a dermatofitos (*T. mentagrophytes* var *interdigitale* o a *T. rubrum* en niños o en pacientes con sida) o a hongos miceliales (*Acremonium* spp., *Fusarium* spp. o *Aspergillus* spp.). Para recoger la muestra se raspa con el escalpelo la superficie afectada.

La **onicomicosis negra superficial** afecta también al dorso de la tabla ungueal dando un aspecto negruzco y es debida a *T. rubrum* o a *S. dimidiatum*.

Onicomiosis endonix: es una forma de presentación clínica reciente que afecta de forma primaria y casi en exclusiva a la tabla ungueal (superficial y profundamente) sin dañar el lecho ungueal (sin hiperqueratosis ni onicolisis) [10], se debe a organismos que producen la forma endotrix de *tinea capitis* (*T. soudanense* y *T. violaceum*).

Onicomiosis distrófica total: se afecta el lecho, la matriz y la tabla ungueal, como consecuencia de una afectación primaria en la candidiasis mucocutánea crónica o de forma secundaria al estado final de cualquier forma clínica de onicomiosis. En estos casos se debe raspar preferentemente el material subungueal.

Un consejo...

- En la *tinea unguium* y en la onicomiosis por *Scytalidium* spp., la piel adyacente suele estar afectada, por lo que, en estos casos, también es recomendable procesar muestras cutáneas ya que su cultivo es más sensible que el procedente de las uñas.

4.2.2. Transporte de la muestra superficial

Las muestras superficiales de pitiriasis versicolor y dermatofitosis deben ser transportadas en un contenedor seco; sin embargo, si se sospecha la presencia de *Candida* spp. y se demora su procesamiento, se debe emplear un medio de transporte como el de Stuart, para preservar su viabilidad. Las distintas opciones de transporte, ya han sido comentadas en el Capítulo 3 en función de la lesión clínica, agente etiológico y posibilidades de recolección.

El almacenaje de muestras dermatológicas se debe realizar a temperatura ambiente.

4.2.3. Procesamiento de las muestras superficiales

Los pelos y escamas pueden procesarse directamente y ser examinados al microscopio o sembrados en los medios de cultivos sin más preparación. Sin embargo, las uñas deben homogenizarse previamente para aumentar la superficie de contacto del espécimen con el medio de cultivo y posibilitar el aislamiento del agente causal; para ello se fragmentan con alicates en piezas de 1 mm, en condiciones asépticas.

4.2.4. Examen microscópico directo en las micosis superficiales

El examen microscópico directo permite un diagnóstico presuntivo rápido de las micosis superficiales y, con ello, la instauración de un tratamiento precoz sin tener que esperar al crecimiento de los cultivos (Capítulo 14). Su sensibilidad varía según la experiencia del micólogo, la clínica y la muestra (cantidad y calidad de la misma). Habitualmente, el examen directo se efectúa en fresco, utilizando sustancias que favorecen la disgregación de la queratina y aclaran la preparación. Además, estas sustancias facilitan la visualización de las estructuras fúngicas (micelios, esporos o levaduras) por su alto índice de refracción.

El examen microscópico con **hidróxido potásico (KOH)**, utilizado clásicamente, puede mejorarse añadiendo ciertas sustancias:

- *Dimetil sulfóxido (DMSO)*. Se prepara añadiendo, en el mismo orden, 20 g de KOH, 40 ml de DMSO y 60 ml de agua destilada. La muestra se examina en un porta con unas gotas este líquido, calentando ligeramente en la llama para acelerar la digestión (aunque esto último no es estrictamente necesario).
- *Lactofenol de Amman, con o sin azul algodón*. Solución de lactofenol de Amman: fenol, 20 g; ácido láctico, 20 ml; glicerina, 40 ml; agua destilada, 20 ml. Mezclar el ácido láctico y la glicerina con el agua destilada y, seguidamente, añadir el fenol bajo agitación y calentamiento hasta su disolución. Se puede agregar 2 ml de azul algodón al 1%.
- *Azul de metileno*. Azul de metileno 1 g y 250 ml de agua destilada.
- *Glicerina*.

Un consejo...

- La adición de DMSO permite el examen directo inmediato sin que sea necesario el calentamiento. Evita la ruptura de portas, cristalizaciones, aparición de artefactos y permite el examen microscópico pasadas 24 ó 48 h, siempre que se conserve la preparación en una cámara húmeda.

Existen colorantes que tiñen de azul las levaduras lipofílicas como:

- **Colorante de Cohen**. Hidróxido potásico al 30% con tinta Quink (Parker) azul negra, a partes iguales.
- **Colorante de Kane**. Glicerol, 10 ml; Tween 80, 10 ml; fenol, 2,5 g; azul de metileno, 1 g y agua destilada, 480 ml.

El **blanco de calcoflúor** (Capítulo 14) tiñe específicamente los polisacáridos de la pared de los hongos proporcionando imágenes excelentes. Según estudios comparativos es más sensible que la microscopía óptica clásica en fresco con KOH, pero exige el uso de un microscopio de fluorescencia.

Para valorar el examen directo en una micosis superficial, se requiere la suficiente experiencia como para no confundir la presencia de artefactos como algodón, hilo, burbujas de aire, grasa intercelular (*mosaic fungus*) con estructuras fúngicas.

Si se necesita disponer de tinciones permanentes, debe realizarse una tinción de PAS o de plata metenamina (Capítulo 14), aunque en las micosis superficiales, tienen más valor didáctico que diagnóstico.

El tipo de examen microscópico recomendado en las micosis superficiales varía en función de la estructura afectada y la lesión observada:

Piel

En la **pitiriasis versicolor**, la observación del material (raspado o papel cello), demuestra los microorganismos en una disposición característica: una combinación de formas redondeadas (2-8 μm de diámetro) con gemación e hifas cortas (de 2-5 μm de ancho por 25 μm de largo). Su visualización se facilita con el Colorante de Cohen (Figura 4.5), ya que las formas fúngicas del género *Malassezia* se tiñen inmediatamente de azul, mientras que *Candida* spp. y los dermatofitos, se tiñen pasadas unas horas. La tinción con Cohen del pus obtenido en foliculitis por *Malassezia* spp. revela únicamente estructuras levaduriformes.

El colorante de Kane tiñe intensamente de azul las levaduras lipofílicas, *Dermatophilus* spp., y, lo que es más importante, *Corynebacterium minutissimum*, agente causal del **eritrasma**, de modo que la visión en fresco de las escamas con este colorante, bajo inmersión, permite visualizar los bacilos teñidos de azul (Figura 4.6), proporcionando de forma inmediata el diagnóstico de eritrasma.

En la **tiña negra**, el examen directo cutáneo revela hifas septadas, ramificadas, de 5 μm de diámetro, con un característico color oscuro, marrón u oliváceo, junto con células levaduriformes elongadas.

En las **candidiasis superficiales**, la visualización de levaduras, blastosporas, pseudohifas o verdaderas hifas septadas, evidencia la existencia de levaduras, aunque la identificación de la especie requiera el cultivo. En las candidiasis sistémicas con lesiones cutáneas hematógenas el diagnóstico se realiza por estudio histológico de la biopsia cutánea.



Figura 4.5. Pitiriasis versicolor: visión con microscopio óptico y tinción de Cohen de las escamas (x400).

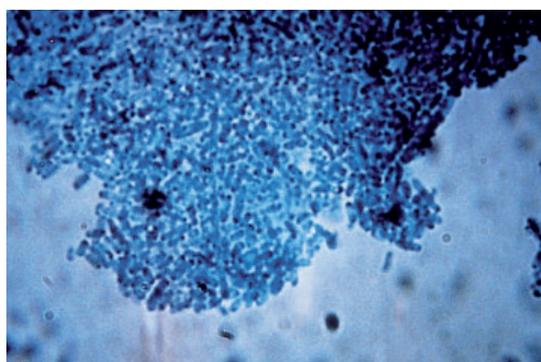


Figura 4.6. Eritrasma: visión con microscopio óptico y tinción de Kane de las escamas (x1.000).



Figura 4.7. Examen de escama de piel lampiña con KOH. Se observan hifas de dermatofito (x200).

En las **dermatofitosis** de piel lampiña, se observan filamentos miceliales artrosporados, estrechos, regulares, septados, ramificados y birrefringentes (Figura 4.7). Ocasionalmente, se visualizan en el espesor de las escamas folículos pilosos parasitados ("tiña del vello").

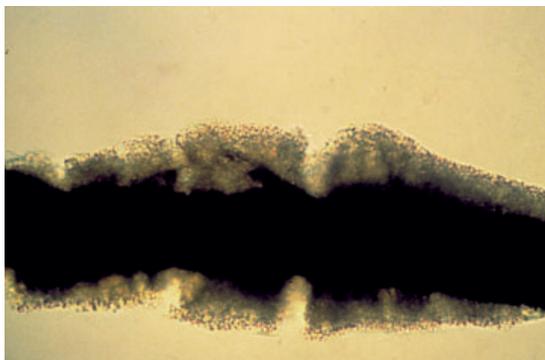


Figura 4.8. Examen de pelo con KOH. Se observan nódulos de piedra blanca (x200).

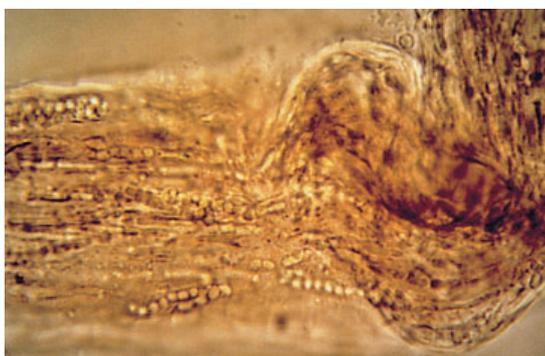


Figura 4.9. Examen del pelo con KOH. Se observan artrosporas compatibles con dermatofito (x400).

Pelos

En las **pedras**, el examen directo de los pelos parasitados permite establecer el diagnóstico [11]. Los nódulos de piedra negra están formados por una masa de células romboidales (parecidos a artroconidios) e hifas ramificadas unidas por una sustancia cementadora. Las hifas y células tienen un diámetro de 4 a 8 μm con pigmentación regular. La sección del nódulo pone de manifiesto la existencia de ascas en cuyo interior existen ocho elementos fusiformes, curvados (30 x 10 μm) con un filamento espiral terminal. En la piedra blanca, *Trichosporon* spp. se tiñe rápidamente con tinta Parker; los elementos fúngicos (hifas con artrosporos y algunos blastoconidios, de 2 a 4 μm de diámetro) se disponen perpendicularmente a la superficie del pelo y carecen de estructura organizada típica de la piedra negra (Figura 4.8).

En la **tinea capitis** el examen microscópico del pelo (Figura 4.9) permite de forma rápida establecer el diagnóstico de tiña y en muchos casos sospechar el agente causal en función del tipo de invasión fúngica:

- **Ectotrix** (el pelo está envuelto por una vaina externa de esporas):

Tiñas microspóricas: Pueden visualizarse pequeñas artroconidas de 2-3 μm de diámetro (*M. audouinii*, *M. audouinii* var *rivalieri*, *M. canis*, *M. canis* var. *distortum*, *M. equinum* o *M. ferrugineum*) o esporas de 5-8 μm de diámetro (*M. gypseum*, *M. fulvum*, *M. nanum* y *M. vanreuselii*).

Tiñas macrospóricas: Las esporas presentan un tamaño superior a 10 μm de diámetro (*T. verrucosum*, *T. mentagrophytes* var *mentagrophytes*, *T. mentagrophytes* var *erinacei*, *T. megninii* o *T. rubrum* -rara vez-).

- **Endotrix** (cuando el dermatofito se encuentra situado en el interior del pelo formando artroconidas con diámetro superior a 8 μm). Son debidas a otras especies de *Trichophyton*: *T. tonsurans*, *T. soudanense*, *T. violaceum*, *T. yaoundei*, *T. gourvilii* o *T. rubrum* (rara vez).

Uñas

El examen directo de las uñas suele realizarse en fresco con KOH y DMSO o con calcoflúor. Es un procedimiento rápido, económico, fácil de realizar y aunque su sensibilidad varía según la experiencia del micólogo, la etiología, la forma clínica y la muestra (número, cantidad y calidad), en *tinea unguium* la sensibilidad del examen directo es superior a la del cultivo, siendo en la primera muestra de un 73,8% con un valor predictivo positivo (VPP) del 75,8%; sin embargo, con seguimiento de muestras se alcanza una sensibilidad del 100% [12]. En manos expertas, permite diferenciar los dermatofitos (hifas y artroconidios) (Figura 4.10) de *Candida* spp. (blastosporas y/o pseudohifas), hongos miceliales como *Scopulariopsis* spp. (esporas en forma de limón con pared gruesa) (Figura 4.11), *Aspergillus* spp. y *Acremonium* spp. (hifas en forma de frondas).

Según MK Moore [13], la morfología del examen directo orientará sobre el agente etiológico y el medio de cultivo a emplear (Tabla 4.2).

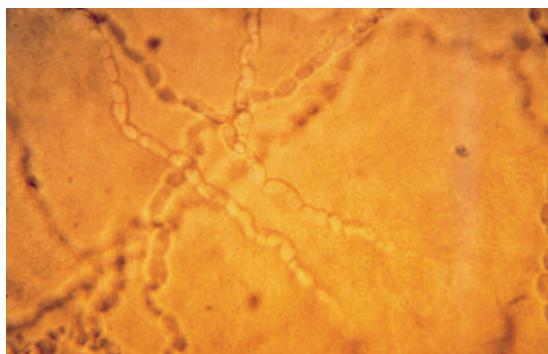


Figura 4.10. Examen de material ungueal con KOH. Se observa micelio artrosporado típico de dermatofito (x400).

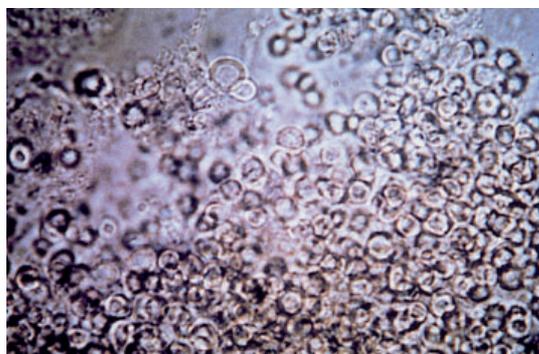


Figura 4.11. Examen de material ungueal con KOH. Se observan abundantes conidios de *Scopulariopsis* spp. (x400).

Tabla 4.2. Morfología habitual de los diferentes agentes causales de micosis superficiales en visión microscópica directa.

Agente etiológico	L	HE	ART	FR+	HI	CEG	FR++	HH
Levaduras	+	-	-	-	-	-	-	-
Dermatofito	-	+	+	+	-	-	-	-
<i>Scopulariopsis</i> spp.	-	-	-	-	+	+	-	-
<i>Aspergillus</i> spp.	-	-	-	+	+	-	+	-
<i>Fusarium</i> spp.	-	+	-	+	+	+	+	+
<i>Scytalidium</i> spp.	-	+	-	+	+	-	-	-

L: levaduras con/sin pseudomicelios; HE: hifas septadas y estrechas; HI: hifas irregulares; HH: hifas hinchadas; ART: artroconidias; FR+: frondas ligeras o moderadas; FR++: frondas abundantes; CEG: conidios específicos de género.

4.2.5. Cultivo de las muestras superficiales

El cultivo es un procedimiento de diagnóstico lento pero específico, permitiendo establecer con certeza el diagnóstico etiológico del género y especie, esto tiene importancia tanto epidemiológica como terapéutica (*tinea capitis* y onicomicosis).

Medio de cultivo

Preferentemente, las muestras deben ser procesadas de forma inmediata. Las escamas, pelos y uñas, se siembran en tubo con el medio de cultivo elegido en pico de flauta (ya que de este modo el medio resiste mejor la desecación y estas muestras requieren largos periodos de incubación). Necesariamente, el cuadrado de moqueta y el cepillo deben implantarse sobre la superficie del agar dispensado en placas de Petri, las cuales serán selladas para evitar la desecación (Figura 4.12).

El medio habitual para el aislamiento de los hongos es el agar glucosado de Sabouraud (SDA) al que pueden añadirse antibióticos como el cloranfenicol y la gentamicina, para reducir la contaminación bacteriana, o la cicloheximida (actidiona) para reducir el crecimiento de hongos saprofitos (Capítulo 3). Sin embargo, la actidiona no debe ser utilizada si el microorganismo que se sospecha es *Candida no albicans*, *Scopulariopsis* spp., *Acremonium* spp., *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp. o *Scytalidium* spp., ya que estos son sensibles a dicho antifúngico.

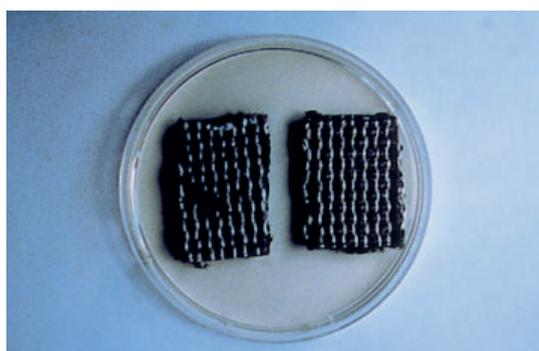


Figura 4.12. Cultivo de la muestra realizada con moqueta.

Cuando se sospechen infecciones por levaduras, es recomendable añadir un medio que contenga substrato cromogénico como el Albicans ID medio (bioMérieux) o el CHROMagar Candida (Becton Dickinson) en los que las colonias de levaduras desarrollan determinados colores en función de la especie aislada (Capítulo 3).

La elección del medio a emplear depende de la muestra y del patógeno causal y, muchas veces, estará orientada por el resultado del examen directo (Tabla 4.2). Así, en las uñas se puede emplear SDA con cloranfenicol con o sin actidiona al 0,04%; además, en uñas con fuerte contaminación bacteriana, algunos autores recomiendan añadir un tercer medio con actidiona al 0,4% para facilitar el aislamiento de los dermatofitos (Tabla 4.3).

Tabla 4.3. Elección del medio de cultivo y condiciones de incubación en función del presunto microorganismo causal.

Agente etiológico	Medio	Temperatura (°C)	Tiempo (días)
Dermatofito	MYC	25-30	28
<i>Scopulariopsis</i> spp.	SDAC	25-30	21
<i>Acremonium</i> spp.	SDAC	25-30	21
<i>Fusarium</i> spp.	SDAC	25-30	21
<i>Aspergillus</i> spp.	SDAC	25-30 y 37	21
<i>Scytalidium</i> spp.	SDAC	25-30	21
<i>Candida</i> spp.	SDAC	37	21

MYC: Sabouraud con cloranfenicol y actidiona (Mycobiotic / Mycosel)
SDAC: Sabouraud con cloranfenicol

Un consejo...

- El Dermatophyte Test Medio (DTM) no puede sustituir al Sabouraud con cloranfenicol con cicloheximida para el cultivo fúngico de las uñas ya que, aunque los dermatofitos liberan metabolitos alcalinos que viran el medio de amarillo a rojo en menos de 21 días, otros hongos pueden hacer lo mismo como especies de *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., algunos mohos negros, levaduras e incluso *Scopulariopsis* spp. [14].

Condiciones de incubación

Si se sospecha un dermatofito, los cultivos de micosis superficiales deben incubarse a 25-30 °C; sin embargo, *Trichophyton verrucosum* y *Candida* spp. crecen mejor a 37 °C (Tabla 4.3).

Los tiempos de incubación varían en función de la especie: mientras que los dermatofitos suelen crecer entre 7-28 días, otros hongos, como *Aspergillus* spp., *Scytalidium* spp. y las levaduras, tienen un crecimiento más rápido y pueden ser identificados en 1 semana (Tabla 4.3).

Identificación del aislamiento

Para la correcta identificación del agente etiológico de las micosis superficiales (levaduras, dermatofitos y hongos miceliarios no dermatofitos), se recomienda consultar los Capítulos 11, 12 y 13 de esta Guía.

Significado del aislamiento

Malassezia spp. El diagnóstico de sospecha de pitiriasis versicolor es clínico y la confirmación se realiza mediante examen microscópico directo en fresco de las escamas, o del papel cello, con colo-

rante de Cohen o de Kane. El aislamiento por cultivo de *Malassezia* spp. resulta laborioso por requerir condiciones determinadas de humedad, temperatura y medios de cultivos ricos en ácidos grasos (Dixon o Leeming), e innecesario para llegar al diagnóstico de pitiriasis versicolor ya que dicha levadura forma parte de la flora saprofita de la piel aunque puede tener un valor epidemiológico.

Candida spp. Las levaduras tienen una distribución ubicua en la naturaleza pero las productoras de candidiasis en el hombre son de hábitat más restringido. En los cultivos con significado clínico la principal especie infectante es *C. albicans*. De hecho, el 10-20% de los individuos son portadores asintomáticos de dicha levadura en el tubo digestivo y en las superficies cutaneomucosas, no así en la piel normal, donde su aislamiento resulta excepcional. Sin embargo, otras especies como *C. parapsilosis* o *C. tropicalis* forman parte de la flora saprofita habitual de la piel. En general, el estado de comensal o saprofita de *Candida* spp., se corresponde con una concentración baja de levaduras, mientras que el estado parasitario o infección se correlaciona con una concentración alta de las mismas, hallando no solo cultivos positivos (en forma masiva o confluyente cuando son semicuantitativos) sino también exámenes directos positivos [15]. Por eso es imprescindible correlacionar la observación directa y los cultivos con la situación clínica.

Dermatofitos. El aislamiento de un dermatofito en la piel, asociado a una clínica compatible con dermatofitosis y a la observación directa positiva, es diagnóstico de dermatofitosis. Existen situaciones especiales como los controles post-tratamiento de *tinea* de piel glabra curada clínicamente y los contactos familiares y escolares de niños con *tinea capitis*, en los que sin clínica acompañante y con examen directo negativo, también puede aislarse un dermatofito. Estos casos son catalogados como portadores asintomáticos; en ellos existen pocos elementos fúngicos y los cultivos semicuantitativos son ligeros (<10 UFC/placa). La evolución de estos por-

tadores asintomáticos depende de la especie infectante: si es zoofílica como *M. canis*, la infección tiende a desaparecer en el tiempo sin necesidad de tratamiento; mientras que si corresponde a especies antropofílicas, como el *T. rubrum* o *T. mentagrophytes* var *interdigitale*, el hongo puede quedar acantonado presentando periodos de recrudescencia (portadores crónicos de *T. rubrum* en *tinea pedis*).

El aislamiento de un dermatofito en el pelo, con clínica y visión directa positiva, se correlaciona con un elevado número de estructuras fúngicas en la lesión (Figura 4.13) y con el diagnóstico de *tinea capitis*. También puede existir la figura del portador asintomático de dermatofito en cuero cabelludo entre los contactos familiares y escolares de niños con *tinea capitis*, y entre los controles post-tratamiento de los niños tratados, donde existe un bajo número de elementos fúngicos con visión directa negativa y buena respuesta clínica. La evolución de estos portadores asintomáticos (Figura 4.14) también depende de la especie infectante, si es zoofílica (*M. canis* o *T. mentagrophytes* var *mentagrophytes*) el estado de portador asintomático tiende a desaparecer con el tiempo sin necesidad de tratamiento. Sin embargo, la evolución de las especies antropofílicas, como *T. tonsurans*, suele ser hacia el desarrollo o recrudescencia de la tiña.

La visualización directa, en las uñas, de micelios artrosporados es muy sugerente de la presencia de dermatofito en la muestra. En alrededor del 60% de los exámenes directos positivos, no se consigue aislar el dermatofito en el cultivo. Esto es debido a que las células fúngicas no son viables en la queratina ungueal, por lo que la toma de muestras se debe repetir un mínimo de 3-4 veces para aislar el dermatofito.

Las onicomicosis pueden ser causadas por levaduras y hongos miceliales, dentro de estos si bien los dermatofitos y el *Scytalidium* spp. son patógenos primarios del hombre, otras 35 especies de hongos miceliales han demostrado ser responsables de onicomicosis. El criterio para valorar los aislamientos fúngicos de los cultivos procedentes de uñas distróficas **clásicamente** requería una repetición de muestras, siendo valorable cuando en dos o más ocasiones se aislaba la misma especie con examen directo compatible al menos en una de ellas; sin embargo, cuando el seguimiento del paciente no era posible surgió como alternativa los **criterios de Walsh & English** en 1966 [16] y **las modificaciones de English** en las que restringió dichos criterios a los aislamientos de hongos miceliales no dermatofitos [17-18], según los cuales ante una única muestra si:

- KOH (positivo) + Cultivo (dermatofito) = aislamiento significativo
- KOH (levadura con pseudomicelio) +/- Biopsia (levadura y pseudomicelio) + cultivo (*Candida* spp.) = aislamiento significativo

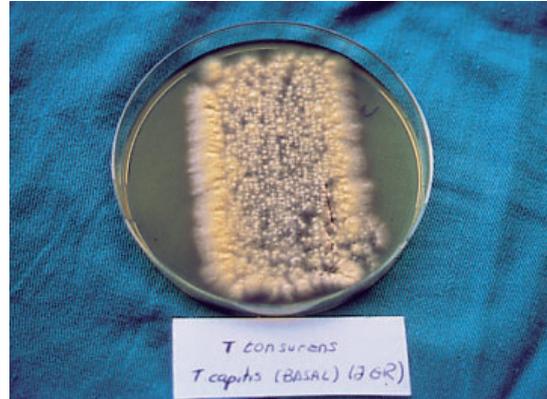


Figura 4.13. Cultivo de cepillo procedente de un paciente con *tinea capitis*.



Figura 4.14. Cultivo de cepillo procedente de un portador asintomático de dermatofito (izquierda). Ausencia de dermatofito en cuero cabelludo (derecha).

- Cultivo (hongo micelial no dermatofito) = criterio contaje/inóculo de English = sólo es significativo si:
 - a) No crecen dermatofitos en el cultivo
 - b) 5/20 inóculos positivos con la misma especie
 - c) y KOH positivo o biopsia compatible morfológicamente con la especie cultivada.

Estos criterios de **contaje/inóculo de English** han sido aplicados durante décadas, sin embargo no habían sido validados hasta Gupta *et al.* [19], estos autores siguiendo 473 enfermos durante 1 a 3 años con repetición de muestras y aplicando por un lado el criterio clásico y por otro el de contaje/inóculo demostraron que en **onicomicosis por hongos miceliales no dermatofitos** con KOH positivo cuando crecían 15/15 inóculos la probabilidad de ser una verdadera onicomicosis era de un 82,6%, pero ésta se reducía conforme disminuía la relación contaje /inóculo llegando a que cuando era 5/15 era de un 29% y en 4/15 de un 23,2%, por lo tanto la aplicación rigurosa de estos criterios llevaría

a un 75% de falsos positivos; es más, en casos con examen directo negativo y contajes de 15/15 inóculos positivos tendríamos una probabilidad de onicomiosis por hongos miceliales no dermatofitos del 56,1%. Por lo tanto, los criterios de English han quedado invalidados y en la actualidad el procedimiento recomendado para el diagnóstico de onicomiosis por hongos miceliales no dermatofitos es el seguimiento del paciente con muestras seriadas (3-5 muestras). Recientemente, Summerbell *et al.* [12], tras seguimiento clínico-micológico durante 3 años de 341 pacientes (al menos 3 veces y la mayoría 5 veces), confirma al criterio clásico con repetición de muestras como el mejor procedimiento diagnóstico, y se consigue llegar al 100% de exámenes directos positivos con un diagnóstico de certeza del 92,7% de reconocer onicomiosis por hongos miceliales no dermatofitos ni *Scytalidium* spp., y una certeza del 100% de no valorar todos los contaminantes de la primera muestra que tuvieran un examen directo positivo y un cultivo positivo de hongo micelial no dermatofito (especificidad final del 100% y VPP del 100%).

Este seguimiento clínico-micológico es importante, no solo para el diagnóstico de las onicomiosis sino también para el seguimiento intratratamiento de *tinea unguium* [20], donde un KOH positivo a las 24 semanas o un cultivo positivo a las 12 o 24 semanas puede ayudar a identificar precozmente la falta de respuesta a un tratamiento antifúngico oral convencional a las 72 semanas.

No cabe duda, que los métodos para el diagnóstico de onicomiosis deben ser mejorados pudiendo ayudar al procedimiento clásico (clínico micológico) la incorporación de nuevas técnicas como la **histología** (para confirmar o refutar las onicomiosis por hongos miceliales no dermatofitos; o evaluar la efectividad del tratamiento de una onicomiosis confirmada observando la desaparición del hongo o la existencia de estructuras poco viables: fragmentos irregulares, finos o tenues) [21], **la PCR, la citometría de flujo o técnicas inmunohistoquímicas** [12] pero que aún necesitan ser validadas.

En resumen...

El diagnóstico micológico correcto en las micosis superficiales exige:

- obtención adecuada de la muestra
- transporte adecuado
- rigor en la interpretación del examen directo
- elección de medios de cultivo adecuados
- identificación de la especie fúngica
- valoración/interpretación correctas de los cultivos positivos

Referencias

1. Evans EGV, Richardson MD. Medical mycology. A practical approach. Oxford, Oxford University Press, 1989.
2. Mariat MMF, Adan-Campos C, Gentilini M, Gaxotte P. Presence of dermatophytes chez l'homme en l'absence de lésions cliniques. Soc Dermat Syphil 1976; 74: 724-729.
3. Mackenzie DWR. Hairbrush in detection and eradication of non-fluorescent scalp ringworm. Br Med J 1963; 11: 363-365.
4. Clayton YM. The changing pattern of tinea capitis in London school-children. Mykosen 1978; 1: 104-107.
5. Clayton YM, Midgley G. Scalp ringworm simplified practical diagnostic method to study spread in children. Mod Med 1971; 10: 758-762.
6. Baran R, Hay RJ, Tosti A and Haneke E. A new classification of onychomycosis. Br J Dermatol 1998; 139: 567-571.
7. Baran R, Dawber RPR, Tosti A, Haneke E. Onychomycosis and its treatment. In: Baran R (Ed.) A text atlas of nail disorders. Diagnosis and Treatment. London, Martin Dunitz, 1996; 155-168.
8. Gupta AK and Baran R. Ciclopirox nail lacquer solution 8% in th 21 st century. J Am Acad Dermatol 2000; 43: S96-S102.
9. Weitzman I, Summerbell RC. The dermatophytes. Clin Microbiol Rev 1995; 8: 240-259.
10. Tosti A, Baran R, Piraccini BM, Fanti PA. "Endonix" onychomycosis: a new modality of nail invasion by dermatophytes. Acta Derm Venereol 1999; 79: 52-53.
11. del Palacio-Hernanz A, Piedras. En: Torres-Rodríguez JM, del Palacio-Hernanz A, Guarro-Artigas J, Negrón-Briz R, Pereiro-Miguens M (Eds.) Micología médica. Barcelona, Masson, 1993: 43-49.
12. Summerbell RC, Cooper E, Bunn U, Jamieson F, Gupta AK. Onychomycosis: a critical study of techniques and criteria for confirming the etiologic significance of non-dermatophytes. Med Mycol 2005; 43: 39-59.
13. Moore MK, Howell SA, Duncan G, Cunningham MJ, Midgley G. A comparison of bright field and fluorescent microscopy in onychomycosis. 6th Congress of the European Confederation of Medical Mycology Societies, Barcelona. Rev Iberoam Micol 2000; 17: S131.
14. Daniel CR 3rd, Elewski BE. The diagnosis of nail fungus infection revisited. Editorial. Arch Dermatol 2000; 136: 1162-1164.
15. Odds FC. Candidosis of the skin, nails and other external sites. En: *Candida* and candidosis. A review and bibliography. London, Bailliere Tindall, 1988: 136-142.
16. Walsh MM and English MP. Fungi in nails. Br J Dermatol 1966; 78: 198-207.
17. English MP and Atkinson R. An improved method for the isolation of fungi in onychomycosis. Br J Dermatol 1973; 88: 237-241.
18. English MP. Nails and fungi. Br J Dermatol 1976; 94: 697-701.
19. Gupta AK, Cooper EA, MacDonald P and Summerbell RC. Utility of inoculum counting (Walsh and English Criteria) in clinical diagnosis of onychomycosis caused by non-dermatophytic filamentous fungi. J Clin Microbiol 2001; 39: 2115-2121.
20. Sigurgeirsson B, Paul C, Curran D and Evans EGV. Prognostic factors of mycological cure following treatment of onychomycosis with oral antifungal agents. Br J Dermatol 2002; 147: 1241-1243.
21. Gianni C, Morelli V, Cerri A, Greco C, Rossini P, Guiducci A, Braidotti P, Calcaterra R and Papini M. Usefulness of histological examination for the diagnosis of onychomycosis. Dermatology 2001; 202: 283-288.

Bibliografía complementaria

- Hay RJ, Moore MK. Mycology. En: Rook A, Wilkinson DS, Ebling FJG, Champion RHM, Burton JL, Burng DA (Eds.) Rook Wilkinson / Ebling. Textbook of Dermatology. 6th ed. Oxford, Blackwell Science. 1998: 1281-1376.
- Midgley G, Clayton YM, Hay RJ. Diagnoses in colour Medical mycology. London, Mosby-Wolfe, 1997.
- Summerbell RC. Non dermatophytic fungi causing onychomycosis and tinea. In: Kane J, Summerbell RC, Sigler L, Kraiden S, Land G (Eds.) Laboratory handbook of dermatophytes and other filamentous fungi from skin, hair and nails. Belmont CA: Star Publishing 1997; 213-259.