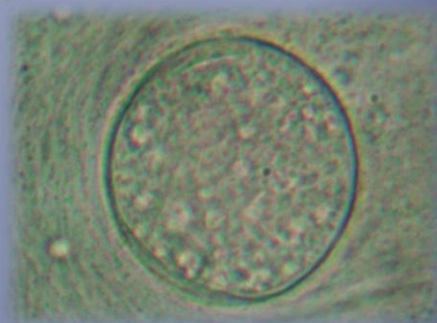
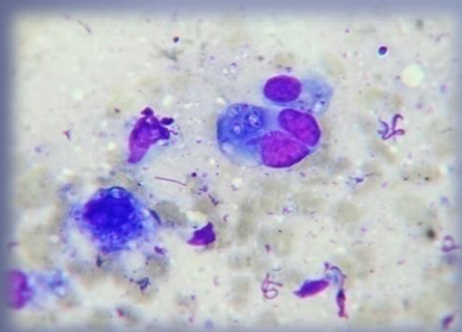




MANUAL DE DIAGNÓSTICO DE LAS MICOSIS SISTÉMICAS

Asunción - Paraguay

Primera edición 2016



**TESAI HA TEKO
PORAVE**
MOTENOMDEHA
MINISTERIO DE
**SALUD PÚBLICA
Y BIENESTAR SOCIAL**



TETĀ REKUÁI
GOBIERNO NACIONAL
Jajapo ñande raperà ko'aga guive
Construyendo el futuro hoy

MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA Y BIENESTAR SOCIAL

Dr. Antonio Barrios Fernández

Ministro

Dra. María Teresa Baran Wasilchuk

Vice-Ministra

Dr. Gustavo A. Chamorro Cortesi

Director General
Laboratorio Central de Salud

Ing. Hideyuki Yoshida

Representante Residente Oficina en Paraguay
Agencia de Cooperación Internacional (JICA)

Sr. Gustavo Godoy Ochipinti
Presidente – Asociación de Ex Becarios de la JICA



Ficha Técnica

Laboratorio Central de Salud Pública

Dr. Gustavo Chamorro Cortesi
Director General

Dr. Natalie Weiler G.
Directora Técnica

Dr. Mario Fabián Martínez
Jefe Departamento Bacteriología
y Micología

Control de Calidad

Dra. Carmen Almada

Autores

Bioq. Msc. Patricia Violeta Araújo López
Dr. Gustavo Aguilar Fernández

Edición

Lic. Azucena Melgarejo Sanabria
Lic. Felicita Mabel Duré Pérez

Con los auspicios de la Asociación de Ex Becarios de la JICA

Sr. Gustavo Godoy Ochipinti
Presidente Asociación de Ex becarios
de la JICA

Catalogado por la Biblioteca del LCSP

Paraguay. Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social. Laboratorio Central de Salud Pública. Departamento de Bacteriología y Micología. Sección Micología. **Manual de diagnóstico de las micosis sistémicas.** Asunción: Asociación de Ex Becarios de la JICA, 2016. 66 p.

ISBN 978-99967-36-36-0

I. ENFERMEDADES. II. MICOSIS. III. PARACOCCIDIOIDOMICOSIS. IV. PARAGUAY. 1. Título.

Prólogo

El objetivo de este manual es brindar un material de apoyo para el diagnóstico micológico a los laboratorios del Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social y servir de material complementario para los cursos de capacitación realizados por la sección Micología del Departamento de Bacteriología y Micología del Laboratorio Central de Salud Pública, y de esta manera fortalecer la capacidad diagnóstica de las micosis sistémicas, especialmente la Paracoccidioidomicosis, la principal micosis sistémica del Paraguay.

Las micosis sistémicas son enfermedades que afectan primariamente el aparato respiratorio, pero pueden diseminarse y afectar varios otros órganos. Considerando que no son enfermedades de notificación obligatoria, la prevalencia de estas enfermedades está subestimada.

En este material se presenta una amplia variedad de ilustraciones de lesiones de pacientes y microscopía de las estructuras fúngicas de los tres principales hongos sistémicos del país, con el objetivo de proporcionar al profesional un material de referencia que contribuya al diagnóstico de estas micosis.

	Páginas
Índice	2
Capítulo 1 : Introducción a la Micología	5
1.1. Conceptos morfológicos básicos	7
1.2. Términos utilizados para denominar estructuras fúngicas	7
1.3. Métodos de diagnóstico laboratorial en Micología	9
1.3.1. Métodos directos	9
1.3.2. Métodos indirectos	10
Capítulo 2 : Paracoccidioidomicosis (PCM)	11
2.1. Definición	11
2.2. Descripción del agente patógeno	11
2.3. Epidemiología	12
2.4. Manifestaciones clínicas	14
2.4.1. Forma Crónica	14
2.4.1.1. Descripción de lesiones en la mucosa bucofaríngea	15
2.4.2. Forma aguda/subaguda (tipo juvenil)	16
2.4.2.1. Principales manifestaciones clínicas de forma aguda/subaguda	17
2.4.3. Forma cutánea	18
2.4.4. Otras localizaciones	19
2.5. Criterios de gravedad	20
2.6. Diagnóstico diferencial	20
2.7. Tratamiento	21
2.8. Importancia del diagnóstico precoz	22
2.9. Diagnóstico laboratorial de la Paracoccidioidomicosis	22

2.9.1. Métodos directos de diagnóstico laboratorial	22
2.9.1.1. Examen en fresco	22
2.9.1.1.1. Características claves de identificación de <i>Paracoccidioides sp.</i>	23
2.9.1.2. Coloraciones	29
2.9.1.3. Informe de laboratorio	30
2.9.1.4. Cultivo	30
2.9.2. Métodos indirectos de diagnóstico laboratorial	32
2.9.2.1. Método de inmunodifusión radial (inmunodifusión doble)	33
2.9.2.2. Interpretación de resultados	35
Capítulo 3: Coccidioidomicosis	36
3.1. Definición	36
3.2. Descripción del agente patógeno	36
3.3. Epidemiología	36
3.4. Manifestaciones clínicas	37
3.5. Diagnóstico diferencial	38
3.6. Tratamiento	38
3.7. Diagnóstico laboratorial de la coccidioidomicosis	38
3.7.1. Examen directo	38
3.7.2. Coloraciones	40
3.7.3. Informe de laboratorio	40
3.7.4. Cultivo	41
Capítulo 4: Histoplasmosis	43
4.1. Definición	43
4.2. Descripción del agente patógeno	43
4.3. Epidemiología	43

4.4. Manifestaciones clínicas	44
4.5. Diagnóstico diferencial	46
4.6. Tratamiento	46
4.7. Diagnóstico laboratorial de la histoplasmosis	47
4.7.1. Examen directo	47
4.7.2. Coloración de Giemsa	47
4.7.3. Informe de laboratorio	48
4.7.4. Cultivo	48
Capítulo 5: Muestra para diagnóstico laboratorial de Micosis Sistémicas	50
5.1. Muestras respiratorias	50
5.1.1. Esputo por expectoración espontánea	50
5.1.2. Esputo inducido	51
5.1.3. Calidad de la muestra de esputo	51
5.1.4. Secreción traqueal	51
5.1.5. Lavado bronquial y lavado broncoalveolar (BAL)	52
5.2. Otro líquidos de punción: líquido pleural, ascítico (peritoneal), pericárdico y sinovial	52
5.3. Muestras de lesiones en mucosas	53
5.4. Muestras de lesiones en piel	53
5.5. Muestra de sangre para serología de micosis sistémicas	54
5.6. Conservación y transporte de la muestra	54
Capítulo 6: Soluciones, colorantes y medios de cultivo	57
Referencias bibliográficas	60
Anexo Formulario de remisión de muestras	62

Capítulo 1

Introducción a la Micología

En la naturaleza existen distribuidos una amplia variedad de hongos que desempeñan un papel crucial para el equilibrio de los ecosistemas. En la industria alimenticia los hongos también desempeñan un importante rol aportando las enzimas necesarias para los procesos enzimáticos necesarios para la producción de una gran diversidad de alimentos. Solo una pequeña cantidad de hongos forman parte del grupo capaz de producir enfermedades en los seres vivos.

El número de pacientes susceptibles a los más variados tipos de infecciones crece paulatinamente con el paso del tiempo, y con este crecimiento, las infecciones fúngicas son cada día más frecuentes. Las circunstancias que favorecen la mayor frecuencia de infecciones fúngicas son la utilización de terapéuticas inmunosupresoras en diferentes patologías, la aparición del sida y la mejora de los métodos diagnósticos, aumentando el número de pacientes en los cuales son detectados infecciones fúngicas.

La **Micología médica** es la ciencia especializada en estudiar los hongos y las enfermedades causadas por éstos.

Los hongos pueden afectar la salud de los humanos y animales, los tipos de enfermedades causadas por hongos son:

- **Micetismo:** Estos cuadros se producen cuando los hongos tóxicos son ingeridos, es generalmente producido por hongos del género *Amanita* spp. Las lesiones principales se producen a nivel del hígado.
- **Micotoxicosis:** Son cuadros producidos por la ingestión de micotoxinas de *Aspergillus flavus*, *A. ochraceus*, *Fusarium* sp., entre otros. Pueden contaminar los granos vegetales produciendo aflatoxinas, ocratoxinas, fumonisinas entre otras micotoxinas que muchas veces resultan letales para los animales de granja y los seres humanos.
- **Alergias:** Los hongos del aire se depositan en las mucosas de las vías respiratorias y sus antígenos pueden provocar cuadros de sensibilización que llevan a desarrollar rinitis, asma, alveolitis y neumonitis alérgicas.
- **Micosis:** Son denominadas así a todas las infecciones causadas por hongos. A la terminación micosis se le antepone el nombre del agente causal (ej: paracoccidioidomicosis) o la zona del cuerpo de la lesión (dermatomicosis).

Las micosis que afectan a los humanos pueden ser clasificadas en cuatro grandes grupos: (figura 1)

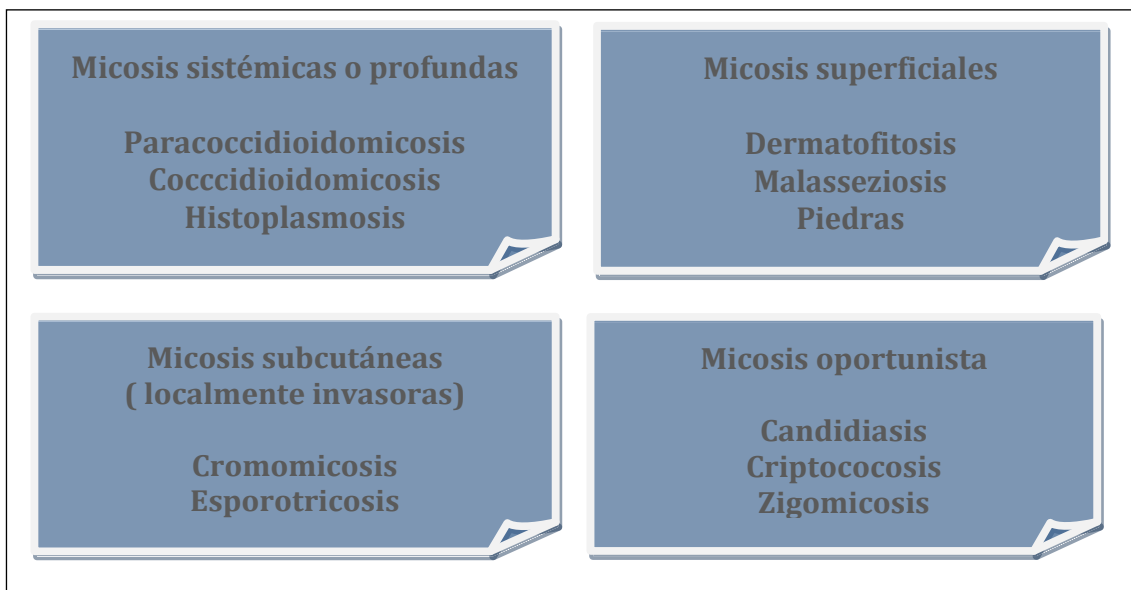


Figura 1: Clasificación de las micosis

Micosis sistémicas o profundas: son enfermedades producidas por hongos dimorfos, que viven en forma filamentosa en el ambiente de áreas geográficas definidas y una vez que ingresan, vía inhalación, en el hospedero mamífero, se convierten en formas parasitarias que son causantes de los signos y síntomas de la enfermedad que producen.

Micosis superficiales: son aquellas micosis que invaden la capa superficial de piel, mucosas, pelos y uñas.

Micosis subcutáneas (localmente invasoras): son infecciones de curso agudo, subagudo o crónico, que involucran al tejido cutáneo, subcutáneo y pueden extenderse a órganos adyacentes (huesos) y en algunos casos también se puede producir una enfermedad diseminada.

Micosis oportunistas: son producidas por hongos que se comportan como saprófitos o comensales del hombre, que en determinadas circunstancias presentes en el hospedador como al disminuir las defensas, pueden colonizar, infectar y producir enfermedad.

1.1. Conceptos morfológicos básicos

Los hongos son seres eucarióticos, poseen una membrana nuclear que envuelve los cromosomas y el nucléolo. Por no poseer pigmentos fotosintéticos, capaces de absorber luz y transformarla en energía, se clasifican como seres heterotróficos, pues extraen materia prima y energía de la materia orgánica para sobrevivir.

La pared celular constituye la superficie de contacto de la célula fúngica con el medio externo. En ella observamos una gama de factores relacionados a la adherencia, crecimiento e interacciones enzimáticas implicadas en la digestión de sustratos nutritivos complejos. Las glicoproteínas de la pared desempeñan un papel enzimático y estructural.

1.2. Términos utilizados para denominar estructuras fúngicas:

Esporo: también llamado conidio o levadura, es la unidad estructural unicelular básica de los hongos levaduriformes.

Hifa: es la unidad estructural básica de los hongos filamentosos. Tiene forma tubular y es pluricelular. Las hifas pueden estar divididas por tabiques llamados septos o también pueden ser aceptadas, éstas son denominadas cenocíticas.

Colonia: conjunto de esporos y/o hifas, que crece en medios artificiales en forma visible macroscópicamente. Presenta características propias de cada especie de hongo como color, tamaño, aspecto, textura, consistencia, contorno, borde, olor, temperatura para el crecimiento, exigencias nutricionales, etc., datos importantes para su identificación.

Micelio: es el agrupamiento de hifas.

Hallazgos en microscopía óptica que caracterizan primariamente a los hongos

Una clasificación básica en cuanto a la morfología de los hongos patógenos que pueden hallarse en el laboratorio es la siguiente:

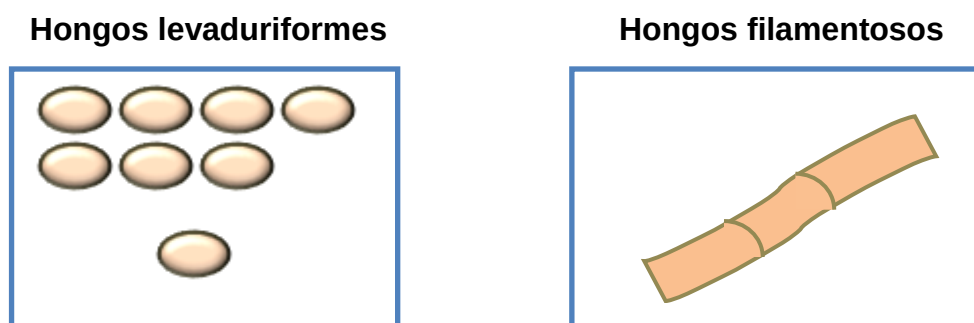


Figura 2. Unidades estructurales de los hongos: esporos micóticos e hifa tabicada.

- **Hongos levaduriformes:** hongos cuya unidad estructural básica es el espora o levadura, el aspecto de las colonias es cremoso y con macromorfología semejante a las colonias de bacterias.



Figura 3. Colonia de hongo levaduriforme: *Cryptococcus* sp. en agar girasol

- **Hongos filamentosos:** están compuestos por hifas o filamentos que se pueden unir y entrelazar de forma abundante hasta formar el micelio que puede verse a simple vista.



Figura 4: Colonias Hongos filamentosos izq. a der., *Trichophyton mentagrophytes*, *Microsporum canis*, *Aspergillus fumigatus*

- **Hongos dimorfos:** este grupo puede presentarse en la forma filamentosa o levaduriforme, dependiendo de la temperatura de crecimiento. En la temperatura ambiente (25-28°C) se presenta como filamentosa y a 37-39°C se presenta en forma de levadura.

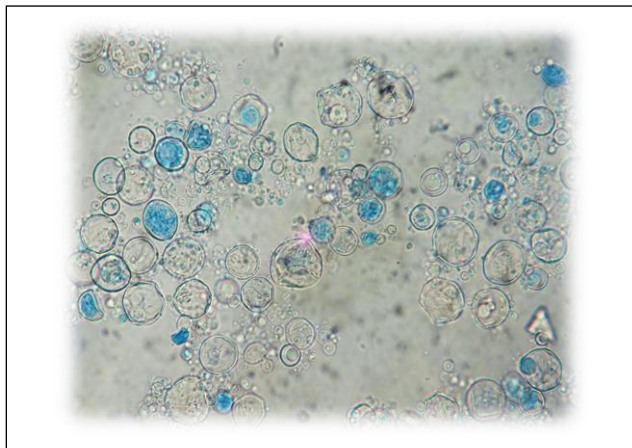


Figura 5: Examen microscópico de cultivo de la forma levaduriforme de *Paracoccidioides sp.*

1.3. Métodos de diagnóstico laboratorial en Micología

1.3.1. Métodos directos

El Diagnóstico de las micosis es realizado por la demostración de la presencia del hongo causante de la enfermedad.

Microscopía a través del análisis microscópico de muestras biológicas como secreciones respiratorias, muestras de piel, pus pueden hallarse hongos con estructuras microscópicas que caracterizan al agente causal de la infección.

El examen microscópico puede ser realizado en forma directa (examen en fresco) sin el agregado de ninguna solución o colorante.

Materiales sólidos como pelos, escamas de piel o uña necesitan pasar por un proceso de clareamiento con hidróxido de potasio o sodio para posibilitar la observación de las estructuras fúngicas.

Para mejorar la visualización de las estructuras fúngicas se puede realizar el agregado de colorantes como azul de lactofenol, blanco de calcoflúor. Debido al pequeño tamaño de los esporos fúngicos como es el caso del *Histoplasma capsulatum*, se necesita la coloración de Giemsa o Wright.

Ciertos hongos con características estructurales particulares, como la presencia de cápsulas como el *Cryptococcus sp.* son mejor visualizados con sustancias que posibilitan un contraste como la tinta China.

Cultivo: los medios de cultivo son mezclas complejas de nutrientes que posibilitan el crecimiento de los hongos. En muestras de pacientes cuya carga fúngica es baja los cultivos son muy útiles ya que posibilitan el diagnóstico de las

micosis. Además el aislamiento de los hongos en cultivos posibilita realizar estudios de sensibilidad a los antifúngicos, identificar las especies por métodos fenotípicos y moleculares, desarrollar estudios de factores de virulencia, etc.

1.3.2. Métodos indirectos:

A través de estos métodos pueden detectarse anticuerpos producidos frente al agente etiológico de la infección fúngica.

Uno de los métodos más utilizados para el diagnóstico de micosis sistémicas es la prueba de inmunodifusión radial. (El procedimiento detallado de esta metodología se describe en el capítulo 2)

La prueba de inmunodifusión radial puede ser aplicada para el diagnóstico de la paracoccidioidomicosis, coccidioidomicosis, histoplasmosis y aspergilosis.

Capítulo 2

Paracoccidioidomicosis (PCM)

2.1. Definición

Es una enfermedad crónica, sistémica y progresiva con un desenlace fatal si no es tratada a tiempo. La principal localización de la enfermedad es pulmonar pero también es frecuente la aparición de lesiones en mucosa oral. Esta micosis sistémica causada por *Paracoccidioides* sp, se adquiere por inhalación y se localiza en aparato respiratorio y puede diseminarse a mucosa buconasofaríngea, ganglios linfáticos, piel, huesos u órganos. Puede producir una infección subclínica o ser de evolución aguda, subaguda o crónica e incluso causar la muerte. Representa un importante problema de salud pública por su alto potencial de producir incapacidad y muertes prematuras en grupos poblacionales específicos (especialmente trabajadores rurales).

Sinonimia

Blastomicosis sudamericana, blastomicosis latinoamericana, enfermedad de Lutz-Splendore-Almeida, granuloma paracoccidioidal.

2.2. Descripción del agente patógeno

Es causada por *Paracoccidioides brasiliensis* y la recientemente nueva especie descripta *Paracoccidioides lutzii*.

Es un hongo dimorfo en función a la temperatura, clasificado dentro del filo Ascomycota, Orden Onygenales, familia Onygenaceae.

Desde el punto de vista microscópico, en las muestras biológicas y cultivos a 37⁰ C el hongo aparece como una levadura ovalada o redondeada de tamaño bastante variable (4-40 μ m) rodeada por una pared celular de doble contorno. Es característica la aparición de glóbulos lipídicos intracitoplasmáticos prominentes. Se reproduce por gemación múltiple.

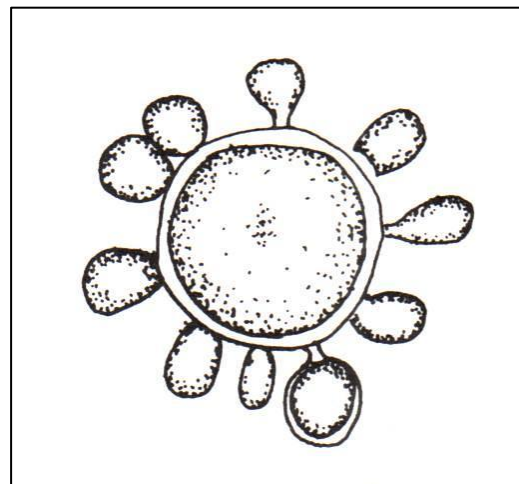


Figura.6: Dibujo esquemático de esporo multibrotante de *Paracoccidioides* sp.

Fuente: www.studyblue.com

El dimorfismo parece estar regulado por factores citoplasmáticos, y la transición a la forma parasitaria es inducida por cambios en la temperatura que modifican la composición de la pared celular, con la transformación de B 1-3 glucanos en α 1-3glucanos.

Por lo general, numerosos blastoconidios, que suelen ser de pequeño tamaño (4-6 μ m) rodean a la célula madre, a la que están conectados por unos puentes citoplasmáticos cortos, en lo que asemeja a la rueda de timón (figura 6), esta célula es característica de *Paracoccidioides* sp. También otra forma característica es la forma con dos brotaciones que recuerda a las orejas de un ratón.

Por estudios moleculares *Paracoccidioides brasiliensis* consta de cuatro especies filogenéticas: *P. brasiliensis* (S1), PS2, PS3, PS4.

Recientemente fue descrita la nueva especie: *Paracoccidioides lutzii*, nombrada así en homenaje al investigador brasileño Adolfo Lutz, el primero en describir un paciente con PCM, en el año 1908, en So Paulo.

2.3. Epidemiología

En la naturaleza, *Paracoccidioides* sp se presenta como estructuras filamentosas conteniendo propágulos infectantes llamados conidios. Una vez inhalados, los propágulos dan origen a formas levaduriformes del hongo que constituirán su forma parasitaria en los tejidos del hospedero. El hábitat ambiental de la fase micelial del *Paracoccidioides* sp. es el suelo, especialmente en suelos ácidos de áreas húmedas. Cuando los conidios o fragmentos de micelio son inhalados en los alveolos pulmonares, el hongo cambia su morfología a la fase levaduriforme debido a la temperatura, hormonas, y la respuesta inmune. Este paso es crucial para la supervivencia y mantenimiento del *Paracoccidioides* sp. y otros hongos dimórficos en el hospedero. La transición dimórfica promueve cambios en la composición de la pared celular. La presencia de una capa más externa de α -1,3 glucano en la pared de las células levaduriformes ha sido propuesta como un escudo protector contra las defensas del hospedero.

Es una enfermedad exclusiva de zonas húmedas tropicales y subtropicales de Latinoamérica, es la micosis sistémica más frecuente de esta región.

Se estima que se presentan infecciones asintomáticas en 30% de los individuos de áreas endémicas. Su distribución geográfica está limitada por los trópicos de Cáncer y Capricornio. La zona donde se presenta se conoce como reservárea de paracoccidioidomicosis entre los 30 grados de latitud sur y los 34 grados al norte y precipitación pluvial de 500 a 2000 mm. Brasil tiene el primer lugar en frecuencia.

En relación a los datos epidemiológicos de casos detectados en el Paraguay, estudios publicados por autores nacionales (ROLON, PEREZ, GILL OVIEDO, AGUILAR) coinciden que los principales departamentos de origen de los pacientes con PCM son: Caaguazú, San Pedro, Paraguarí, Cordillera y Alto Paraná. La real prevalencia de la enfermedad se desconoce, por no ser una enfermedad de notificación obligatoria.



Figura 7: Regiones endémicas de Paracoccidioidomicosis en el Paraguay. Los principales departamentos con casos de Paracoccidioidomicosis son: Caaguazú, San Pedro, Paraguarí, Cordillera, Alto Paraná

El grupo ocupacional con más riesgo para la adquisición de la infección son las personas con profesiones o actividades relacionadas al manejo del suelo contaminado con el hongo, como por ejemplo actividades agrícolas, ganadería, constructores, entre otras actividades relacionadas al contacto con la tierra. No se transmite de un humano a otro, Se consideran factores predisponentes: depresión de la inmunidad, desnutrición, y factores hormonales y fisiológicos. Se ha relacionado con HLA-A9, HLA-B13 HLA-B40 y el alelo DRB1*11 es el más frecuente.

El armadillo de nueve bandas *Dasypus novemcinctus*, (comúnmente conocido en nuestro país como tatú hu) cuya distribución geográfica es similar a la de la PCM, es considerado reservorio animal del *Paracoccidioides* sp., el hongo fue aislado de este animal a partir de cultivo de órganos como el hígado y bazo. Reportes recientes han descrito el aislamiento del hongo a partir de caninos.



Figura 8: Armadillo *Dasypus novemcinctus*

Fuente: <http://www.summagallicana.it/lessico/a/armadillo.htm>

La infección activa en adultos predomina en el sexo masculino, en una proporción que varía entre 10 a 15 hombres para 1 caso en mujeres.

El *Paracoccidioides sp.* posee un receptor de estrógeno citoplasmático, se ha demostrado in vitro que el estradiol suprime la conversión de la forma filamentosa a la forma levaduriforme, condición indispensable para que se establezca la enfermedad, motivo por el cual dicha hormona actúa como un factor protector contra la enfermedad en las mujeres.

2.4. Manifestaciones clínicas

2.4.1. Forma Crónica: esta forma clínica representa más de 90% de los pacientes, se presenta principalmente en adultos de 30 a 60 años, predominantemente del sexo masculino. La enfermedad evoluciona lentamente, de forma silenciosa, pudiendo llevar años hasta que sea diagnosticada. Las manifestaciones pulmonares están presentes en 90% de los pacientes. Los principales síntomas son: tos persistente, expectoración mucopurulenta o sanguinolenta, dificultad respiratoria, cansancio, fiebre. Esta forma crónica puede ser:



Figura 9. Pulmones. Principal órgano afectado por la PCM

a) Forma crónica unifocal: es la forma que está restringida a un solo órgano. Los pulmones pueden ser el único órgano afectado en hasta 25% de los casos.

b) Forma crónica multifocal: es cuando la enfermedad afecta a más de un órgano simultáneamente, siendo los pulmones, mucosas y piel los sitios más afectados por la infección. En la mayoría de los pacientes se presentan lesiones en la mucosa bucal.

En la radiografías de tórax, las lesiones pueden ser bilaterales y nodulares, y con frecuencia hay fibrosis extensa.

En algunos pacientes los nódulos linfáticos cervicales, axilares, inguinales y/o supraclaviculares están agrandados, son dolorosos y adheridos a la piel que los cubre, pueden supurar.

También puede afectar esófago, estómago, páncreas, glándulas suprarrenales, huesos, articulaciones y sistema nervioso.

La afectación de la laringe se manifiesta por lesiones verrugosas que simulan un carcinoma y se acompañan de disfonía, disnea, disfagia y tos.

En pacientes con sida, se presenta en etapas avanzadas y en pacientes que no usan profilaxis de trimetoprim-sulfametoxazol para infecciones por *Pneumocystis jirovecii*.

Las manifestaciones clínicas incluyen fiebre prolongada, pérdida de peso, linfadenopatía generalizada, hepatoesplenomegalia y manifestaciones cutáneas; en estos pacientes, la serología es negativa, otros tipos de inmunosupresión también presentar resultados negativos con los métodos de diagnóstico inmunológicos indirectos.

2.4.1.1. Descripción de las lesiones en la mucosa bucofaríngea

Las lesiones en mucosa oral son consideradas secundarias a la diseminación del agente a partir de los pulmones.

La mucosa bucofaríngea queda afectada en 51 a 82% existe aumento de volumen, deformación de la región, y formación de nódulos y ulceraciones.

Las lesiones que se presentan exulceradas y ulceradas son de contorno y bordes irregulares, con superficie granulomatosa, de fondo amarillo con puntos hemorrágicos que le confieren aspecto moriforme. Estas lesiones se localizan en el velo del paladar, encías, carrillos, piso de la boca. En la mayoría de los pacientes se encuentra más de una lesión. Cuando las lesiones se localizan en las encías, producen gingivitis y en muchos casos, pérdida de los dientes

Estas lesiones son dolorosas durante la masticación, perjudicando la higiene oral y contribuyendo efectivamente a la depleción del cuadro nutricional del paciente. La cicatrización de las lesiones provoca macrostomia de intensidad variable como secuela de la PCM.

En muchos casos, las manifestaciones en la mucosa bucal son el motivo de la primera consulta, el profesional odontólogo puede ser uno de los primeros profesionales de blanco en sospechar de un caso de PCM.



Figura 10. a) b) Lesiones en mucosa oral en pacientes con Paracoccidioidomycosis
Fotos 10 c) d) Fuente: VARGAS J, VARGAS R. Paracoccidioidomycosis. Revista de Enfermedades infecciosas y tropicales, v.1 2009.

2.4.2. Forma aguda/subaguda (tipo juvenil): presenta en 5 a 10% de los casos de la enfermedad, predominando en niños y adolescentes, pero pudiendo, eventualmente afectar a individuos de hasta 35 años. La distribución de la forma aguda/subaguda es semejante en niños del género masculino y femenino.

Esta forma clínica se caracteriza por una evolución más rápida, en la cual el paciente busca atención médica entre las 4 a 12 semanas de instalación de la enfermedad.

2.4.2.1. Principales manifestaciones clínicas de la forma aguda/subaguda:

- Rápido compromiso del estado general
- Anorexia
- Fiebre
- Poliadenopatías en varias regiones (cervical, axilar, inguinal, cadenas paravertebrales y peritoneales)
- Lesiones polimorfas en piel de diversas localizaciones (nodulares, forunculoides, verrucosas, ulcero - granulomatosas)
- Compromiso digestivo (hepatoesplenomegalia y ascitis)
- Lesiones osteoarticulares



Figura 11: Adenopatías en pacientes con PCM. Fotos gentileza Dra Rossana Franco

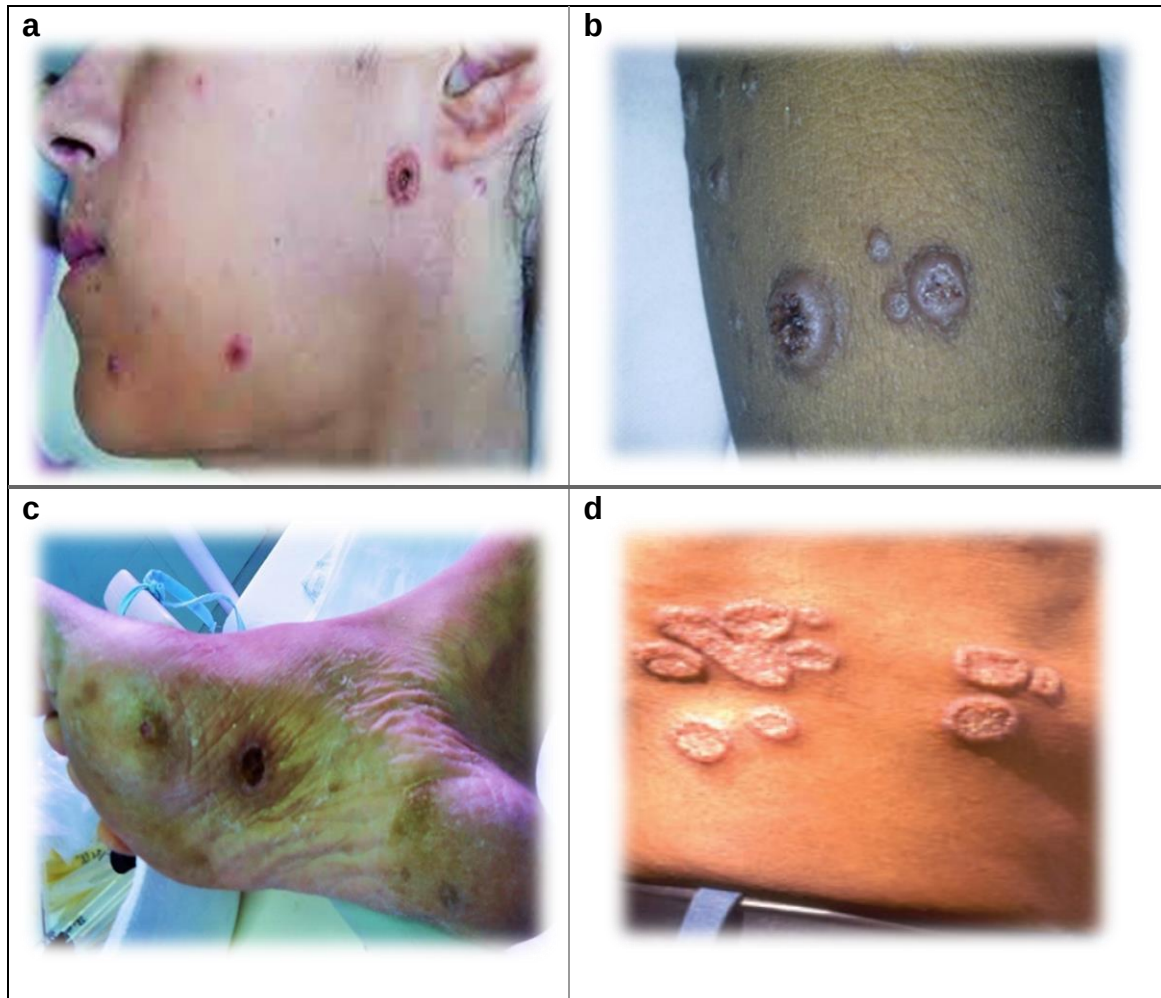


Figura 12: Lesiones en piel en pacientes con PCM Fotos a y c Fuente: VARGAS J, VARGAS R. Paracoccidioidomicosis. Revista de Enfermedades infecciosas y tropicales, v.1 2009.

2.4.3. Forma cutánea: La lesión cutánea más frecuente es una pápula rojo-violácea indurada, que evoluciona a la formación de una pústula central y que secundariamente se ulcera, presentando una costra serohemática adherida al fondo granulomatoso hemorrágico típico (**Figura 12b**).

Se han descrito aparición de pápulas acneiformes diseminadas en todo el tegumento en formas graves de la enfermedad, como también una forma de presentación inusual de aspecto psoriasiforme (**Figura 12 d**).

2.4.4. Otras localizaciones: En ciertos casos la PCM puede presentarse con afectación ósea.

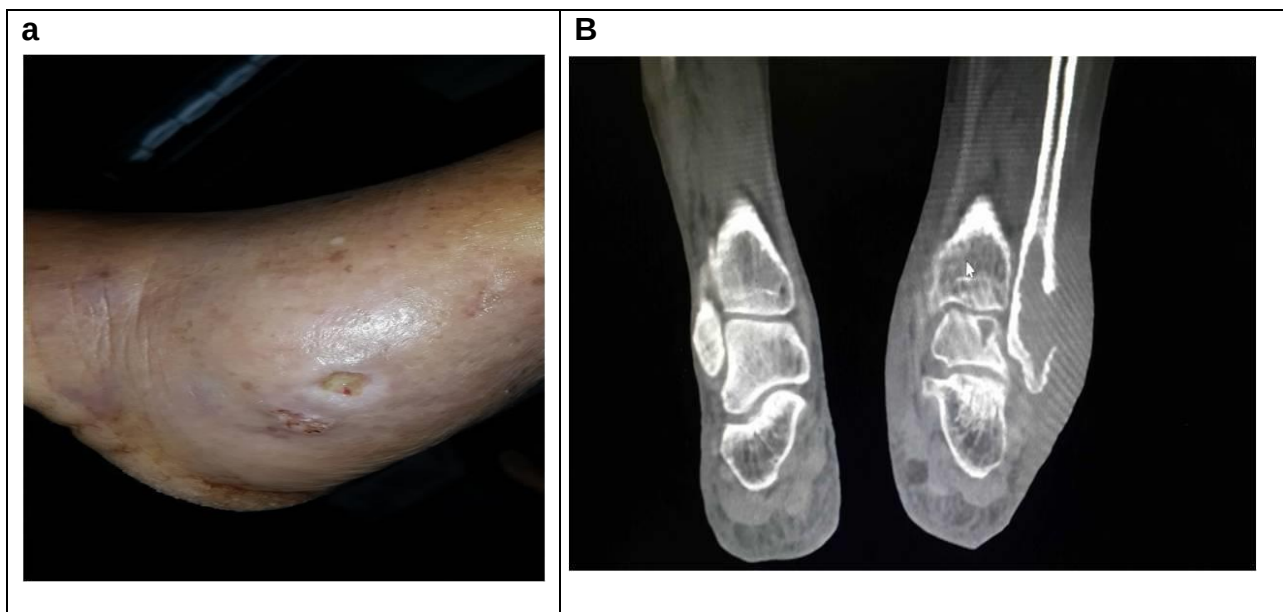


Figura 13: Paciente con a) úlcera crónica en tobillo b) TAC donde se observa afectación ósea con lesión osteolítica en sacabocado en peroné. Fotos gentileza Dr. Juan Manuel Lambaré.

El sistema nervioso central es comprometido en aproximadamente 6 a 25% de los casos de PCM siendo su presentación más común representada por lesiones expansivas, únicas o múltiples en hemisferios del cerebro, cerebelo, o ambos. Los pacientes frecuentemente evolucionan con déficit motor, síndrome convulsivo (epilepsia) y/o hidrocefalia. Envolvimiento cerebelar ocurre en cerca de 20-30% de los casos de neuro-PCM siendo común la evolución rápida a hipertensión craneana, llevando a la necesidad de derivación ventricular.

Pacientes con PCM frecuentemente presentan comorbilidades de naturaleza infecciosa y/o no infecciosa. De los procesos infecciosos, se destacan la tuberculosis, cuya asociación es registrada en 5 a 10% de los casos, enteroparasitosis, exacerbación infecciosa de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica.

Menos frecuentemente en casos de SIDA, leishmaniosis, otras micosis (dermatofitosis, candidiasis, cromoblastomicosis, esporotricosis, histoplasmosis, criptococosis), hanseniasis, sífilis, enfermedad de Chagas, entre otros. Casos de enfermedades no infecciosas fueron relatados como comorbilidades tales como enfermedad de Hodgkin y carcinomas asociados.

En este contexto, individuos que, a pesar del uso regular de la medicación antifúngica, presentan respuesta clínica insatisfactoria, deben ser investigados para la presencia de comorbilidades.

2.5. Criterios de gravedad:

Deberán ser internados los siguientes pacientes:

1. Pacientes con formas diseminadas presentando al menos una de las siguientes complicaciones: alteraciones neurológicas, insuficiencia respiratoria, importante compromiso del estado nutricional, afectación gastrointestinal. Ictericia, ascitis, alteraciones hemodinámicas.
2. Pacientes que presentan co-morbilidades tales como sida, tuberculosis y/o neoplasia, si hubiera necesidad de mejor investigación diagnóstica o con clínica grave.
3. Pacientes con secuelas e inestabilidad clínica tales como enfermedad pulmonar obstructiva crónica descompensada, cor pulmonale, enfermedad de Addison, estenosis de laringe o tráquea, etc.

2.6. Diagnóstico diferencial

Se debe hacer el diagnóstico diferencial de la PCM con otras patologías como:

- Tuberculosis
- Leishmaniosis
- Lepra
- Actinomicosis
- Coccidioidomicosis
- Cromomicosis
- Silicosis
- Papilomatosis
- Enfermedad de Wegener
- Linfoma de Hodking

2.7. Tratamiento

Tabla 1: Esquema de tratamiento para formas leves y moderadas de paracoccidioidomicosis*

Medicamento	Dosis	Duración
Itraconazol**	Adultos: 200 mg por día, luego de las principales comidas (almuerzo o cena) en una única toma Niños con menos de 30 kilos y mayores de 5 años<. 5 a 10 mg/kg/día***	6 a 9 meses en las formas leves y 12 a 18 meses en las formas moderadas
Trimetoprim-Sulfametoxazol	Adultos: Trimetoprim 160 a 240 mg sulfametoxazol 800 a 1200 mg vía oral cada 12 horas Niños: Trimetoprim 8 a 10 mg Sulfametoxazol, 40 a 50 mg/kg/día, vía oral cada 12 horas	12 meses en las formas leves y 18 a 24 meses en las formas moderadas

* Ver ítem criterios de gravedad. Casos graves deben ser encaminados a centros de referencia.

** Primera elección para adultos, en base a la facilidad de la administración, mejor adherencia y tolerabilidad. Niños que no degluten cápsulas de itraconazol pueden ser tratadas con la solución oral de trimetoprim/sulfametoxazol.

***Mayor experiencia en niños se tiene con trimetoprim/sulfametoxazol.

Pacientes con formas graves, que necesiten internación hospitalaria deben recibir anfotericina B o trimetoprim/sulfametoxazol por vía intravenosa. La

duración del tratamiento se relaciona con la gravedad de la enfermedad y al tipo de medicamento utilizado.

Los pacientes con formas graves de PCM con pérdida de peso de más del 10%, asociada a dificultad de deglución y compromiso del estado general, insuficiencia respiratoria, signos o síntomas neurológicos o evidencias de compromiso de glándulas adrenales deben preferencialmente realizar el tratamiento en régimen hospitalaria . Las drogas que pueden ser usadas son la anfotericina B, en la dosis 1mg/kg/día o solución intravenosa de trimetoprim/sulfametoxazol, en la dosis de dos ampollas cada 8 horas hasta mejora clínica del paciente que permita introducción de medicación antifúngica oral.

2.8. Importancia del diagnóstico precoz

Esta micosis representa un importante problema de Salud Pública debido a su alto potencial incapacitante y la cantidad de muertes prematuras que provoca, principalmente para segmentos sociales específicos, como los trabajadores rurales, que además presentan dificultades en el acceso a las redes de servicios de salud, lo que favorece el diagnóstico tardío.

Los individuos afectados por esta micosis, usualmente se encuentran en la fase más productiva de la vida, siendo una enfermedad que produce un importante impacto social y económico. Puede dejar secuelas en la funcionalidad de los pulmones, disfonía crónica, problemas en las glándulas suprarrenales, sistema nervioso central, entre otras complicaciones.

El diagnóstico precoz evitará un sustancial incremento en el costo del tratamiento, ya que con las complicaciones de la PCM, se requieren la atención por varias especialidades médicas y hospitalización.

2.9. Diagnóstico laboratorial de la Paracoccidioidomicosis

En virtud de las diversas lesiones que provoca, es decir, el marcado polimorfismo clínico y el ataque a numerosos órganos y sistemas, la PCM solo puede ser diagnosticada con certeza mediante exámenes de laboratorio.

2.9.1. Métodos directos de diagnóstico laboratorial

2.9.1.1. Examen en fresco

El patrón de oro para el diagnóstico de la PCM es el hallazgo de los elementos fúngicos en el examen en fresco a partir de muestras como esputo, escarificación (raspado) de lesiones en mucosa y piel, aspirado de ganglios y biopsias de lesiones

El examen directo se realiza colocando una gota de la muestra líquida en una lámina, se cubre con una laminilla y se buscan las estructuras fúngicas en un

aumento de 40x, En algunas muestras se hace necesario el agregado de KOH o NaOH al 20% para mejorar la visualización.

En las muestras positivas se observan esporos micóticos esféricos u ovals de doble pared, de 4-40 μm de diámetro y con gemaciones múltiples. En el interior de las levaduras se observan glóbulos lipídicos intracitoplasmáticos prominentes.

Las levaduras pueden estar en forma solitaria, agrupadas o formando cadenas de 4 a 12 elementos, se pueden encontrar esporos micóticos que adoptan una disposición en rueda de timón u orejas de ratón “Mickey”. En la **figura 14** se esquematizan las diferentes morfologías posibles de *Paracoccidioides sp.* que pueden ser halladas al realizar el análisis microscópico.

2.9.1.1.1. Características claves de identificación de *Paracoccidioides sp.*:

- Multibrotación**
- Pared celular doble**
- Glóbulos lipídicos intracitoplasmáticos prominentes**

El examen microscópico debe realizarse en forma minuciosa, se deben observar varios campos, de manera encontrar los esporos micóticos con las características distintivas del *Paracoccidioides sp.* en relación a las otras levaduras.

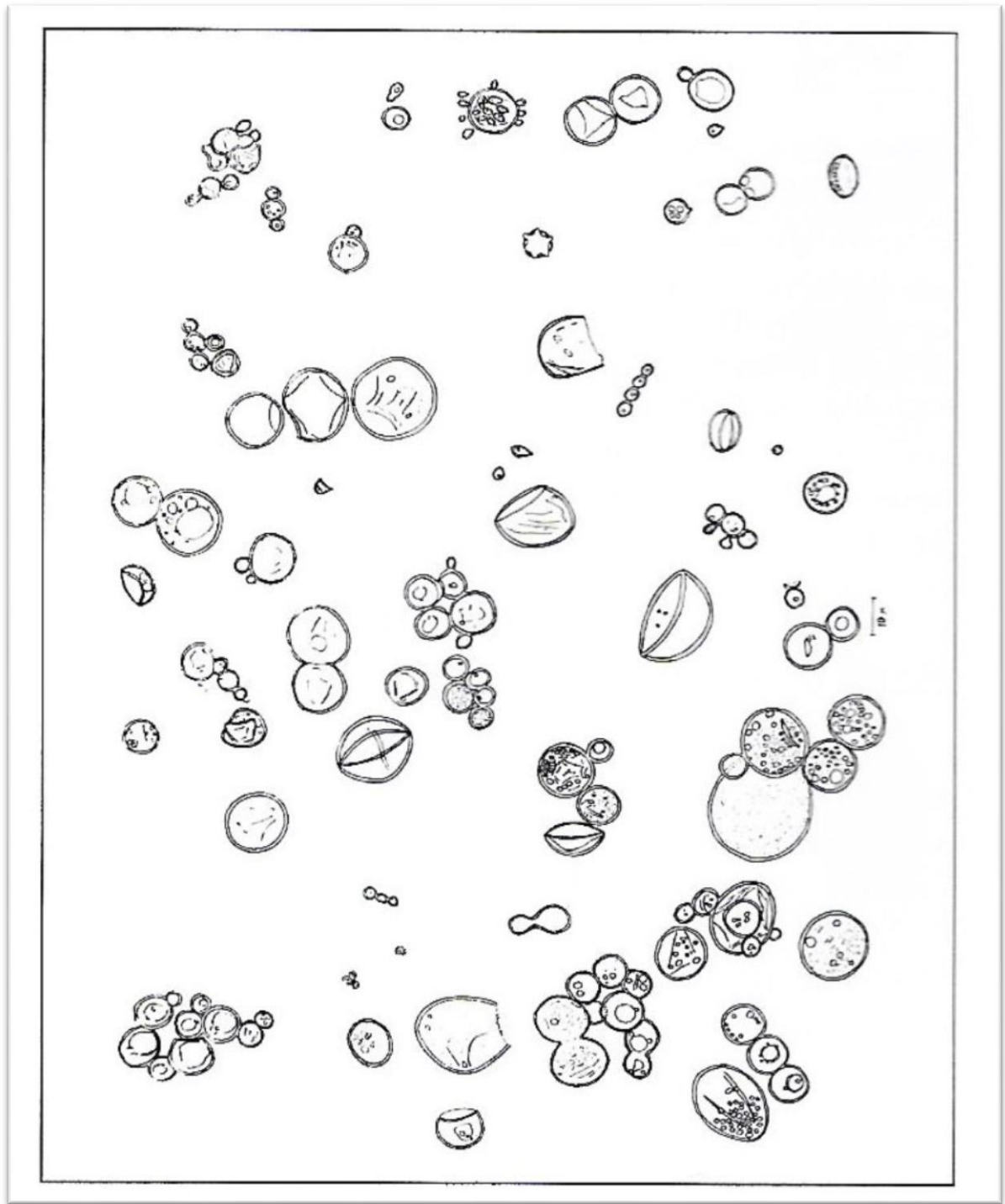


Figura 14. Diferentes morfologías en las que se pueden presentar los esporos de *Paracoccidioides* sp. Extraído de Lacaz C, Micología Médica 2002

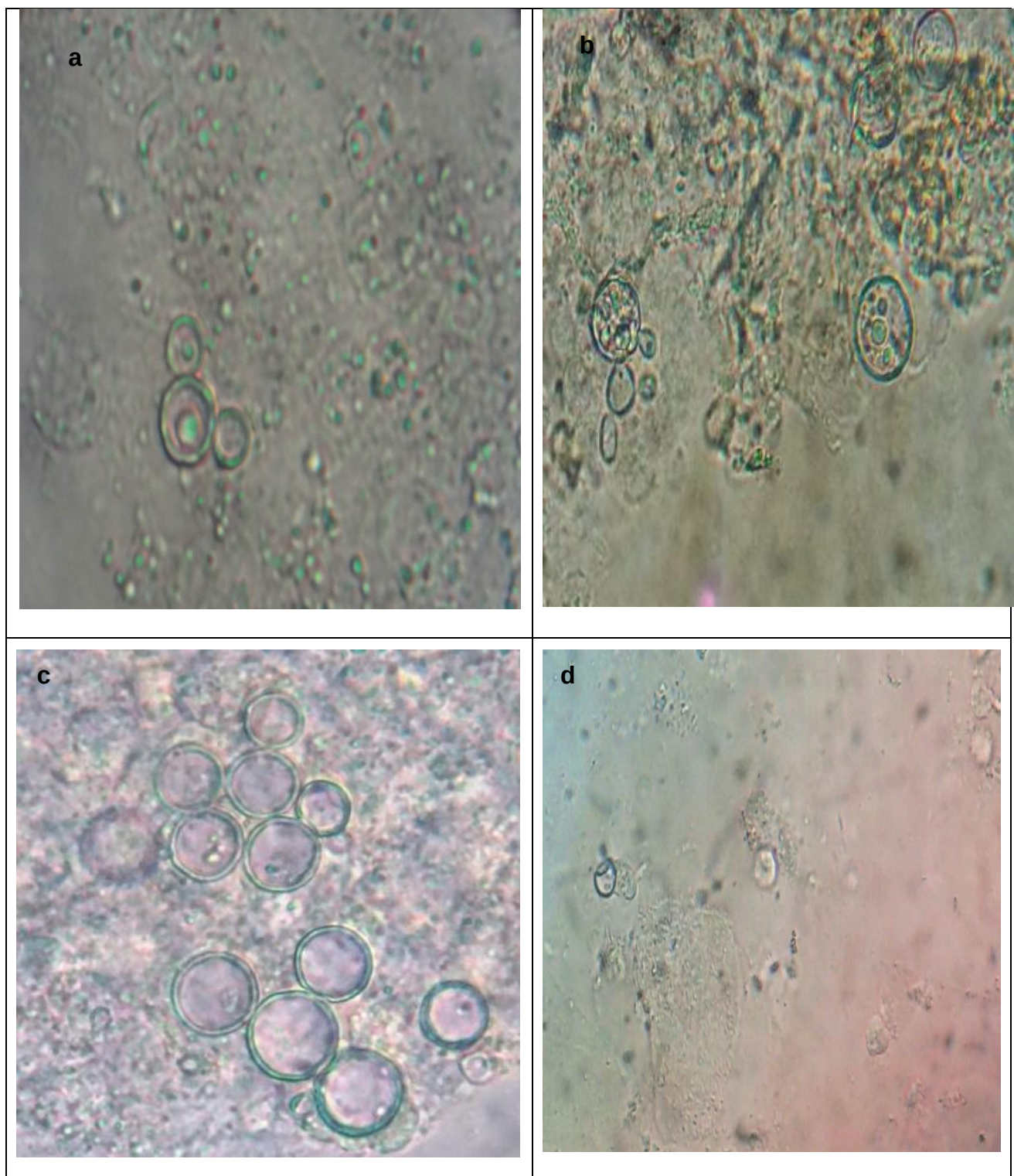


Figura 15: Esporos micóticos de *Paracoccidioides* sp. Microscopía aumento 40x a) Forma con dos brotaciones, se observa en el espora central glóbulo lipídico prominente b) forma multibrotante a la izquierda, forma sin brotación a la derecha c) agrupación de varios esporos d) forma caliciforme

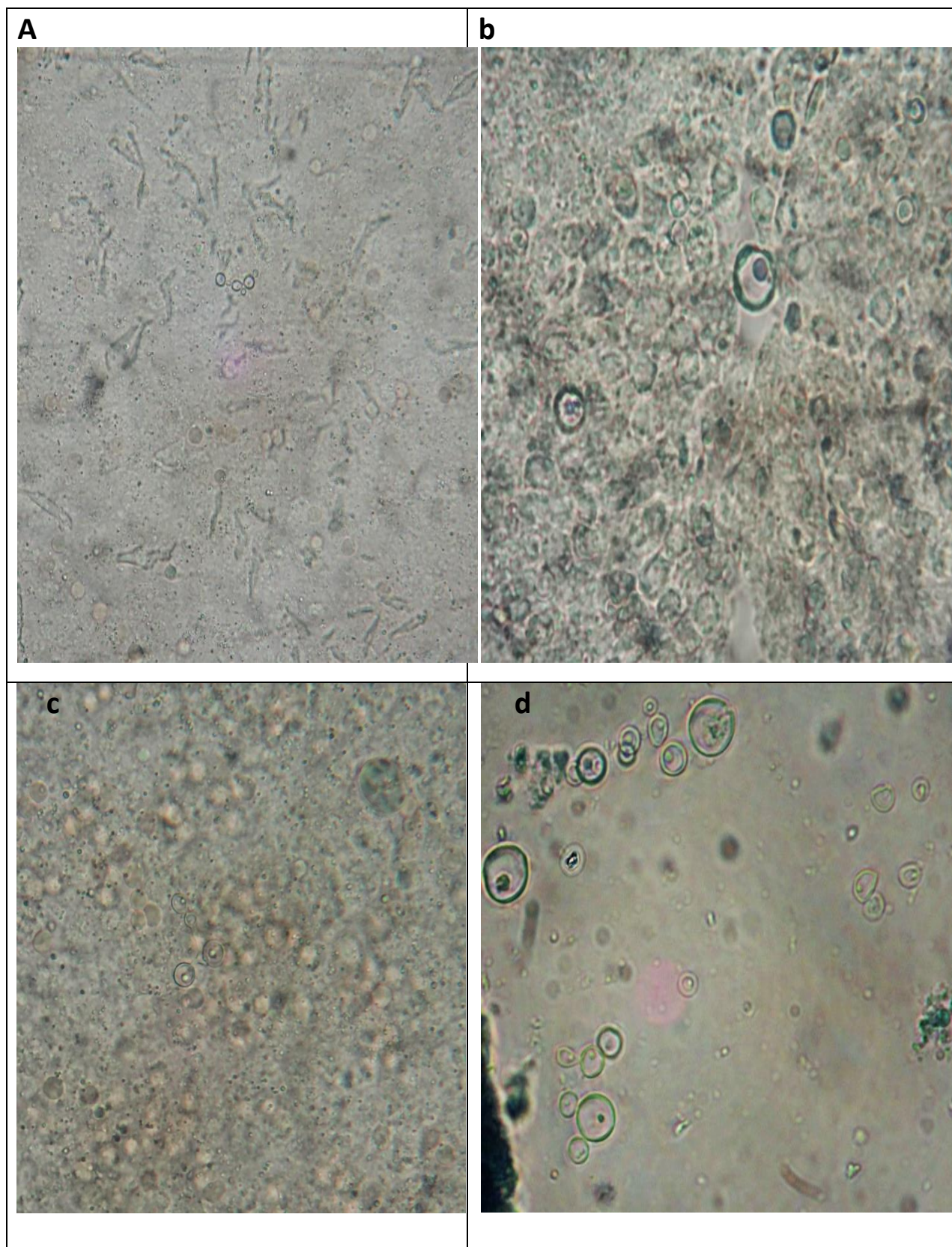


Figura 16. Esporos micóticos de *Paracoccidioides* sp. a) Forma pequeña b) c) d) Grupo de esporos con tamaños variados. Aumento x40.

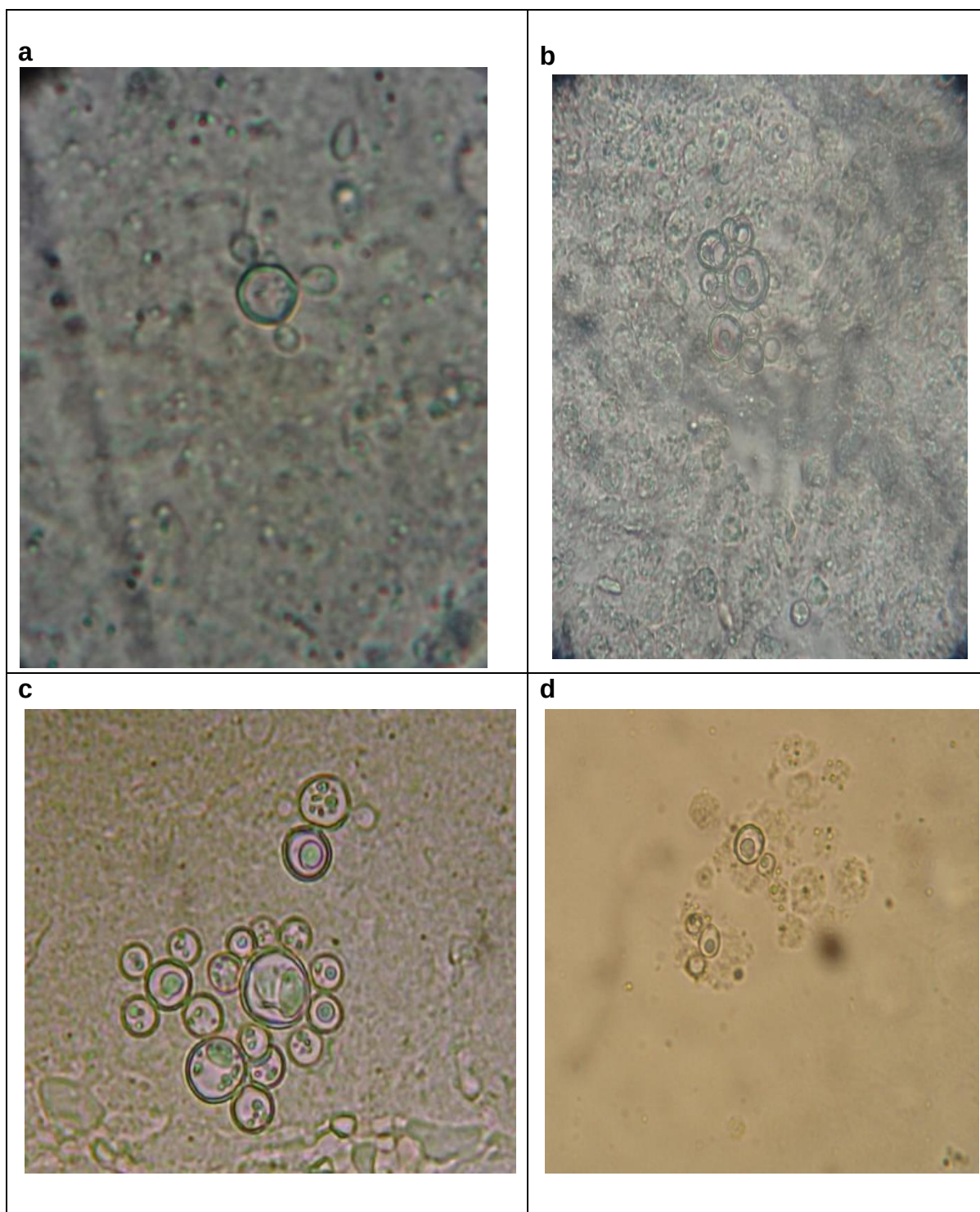
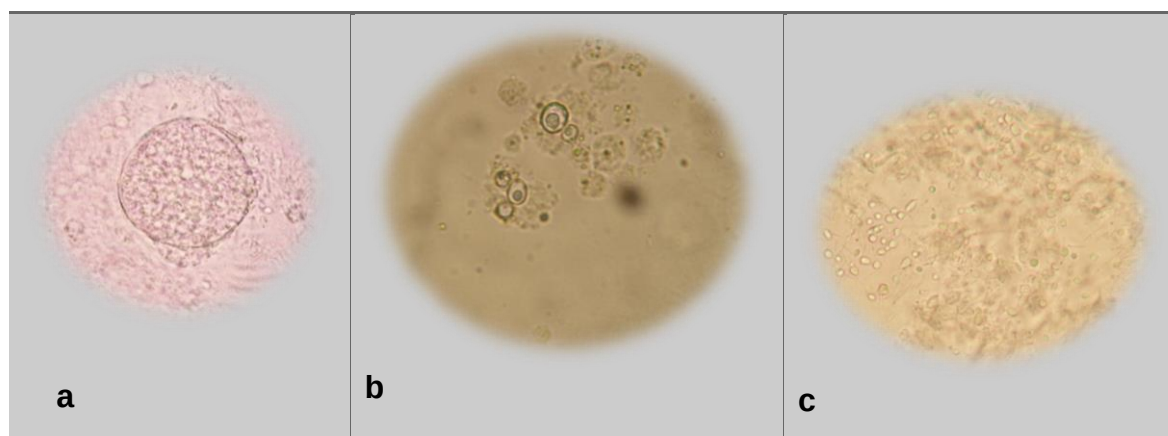


Figura 17. Esporos micóticos de *Paracoccidioides* sp. a) b) y c) Formas multibrotantes d) Izquierda forma con dos brotaciones , arriba a la derecha forma con una brotación. Aumento x40.

Coccidioides sp.***Paracoccidioides sp.******Candida sp.*****Figura18: Comparación de esporos micóticos de hongos levaduriformes**

a- *Coccidioides sp.* presenta endoesporulación y un tamaño mucho mayor que el *Paracoccidioides sp.* presenta exoesporulación y doble pared c) *Candida sp.* esporos más pequeños sin multibrotación, pared celular simple y sin glóbulos intracitoplasmáticos prominentes

Tabla 2. Criterios para diferenciación esporos micóticos de *Paracoccidioides sp*, *Coccidioides sp* y *Candida sp*.

	<i>Coccidioides sp.</i>	<i>Candida sp.</i>	<i>Paracoccidioides sp.</i>
Diámetro	20-150 μm		4-40 μm
Esporulación	Multiendoesporas	única	Multiexoesporas
Pared celular	doble	simple	doble
Cultivo Crecimiento	48-72 hs	24-48 hs	12-30 días

2.9.1.2. Coloraciones

Los esporos micóticos de *Paracoccidioides* sp, pueden ser observados también con coloraciones habitualmente usadas en el laboratorio:

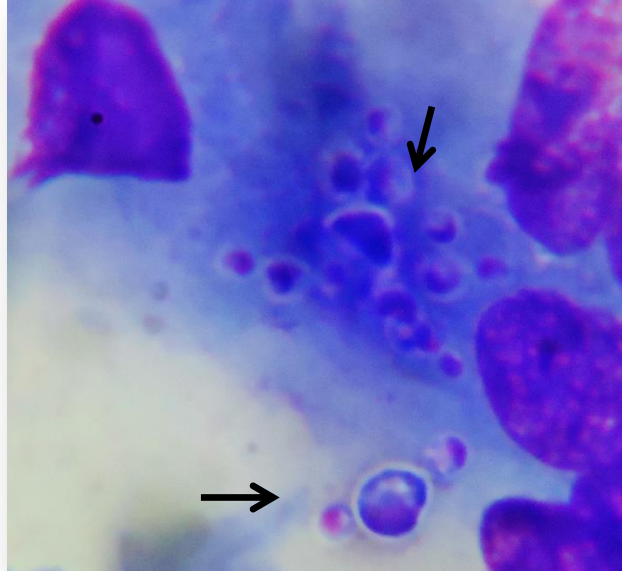


Figura 19. Coloración de Giemsa con esporos micóticos multibrotantes de *Paracoccidioides* sp. en la parte superior de la foto se observa un espora multibrotante, en el extremo inferior derecho un espora con dos brotaciones. Aumento x 100.

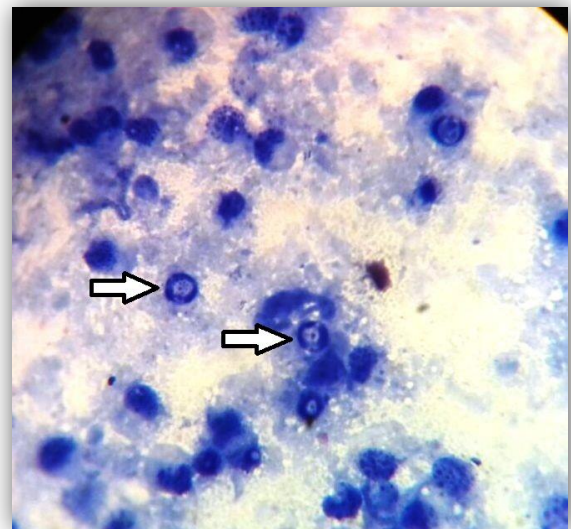
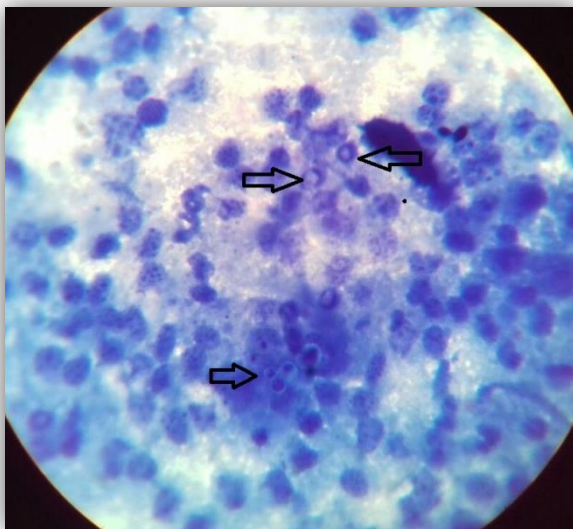


Figura 20. Coloración de Ziehl Neelsen. *Paracoccidioides* sp. a) Esporos micóticos con dos brotaciones abajo flecha b) Esporos micóticos sin brotación. Aumento x 100.

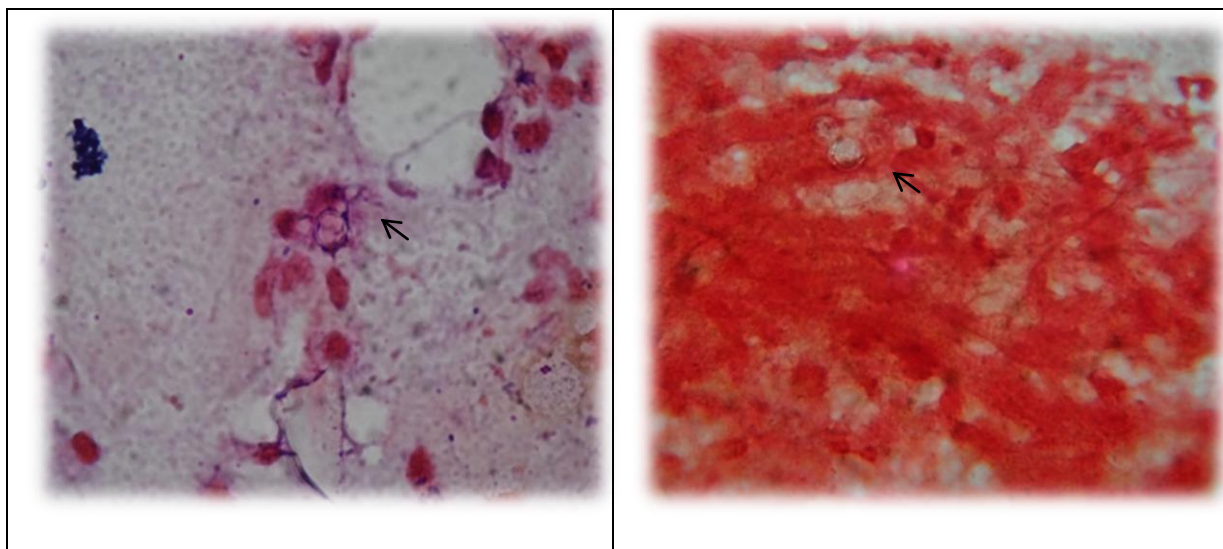


Figura 21. Coloración de Gram. *Paracoccidioides* sp. Aumento x 100.

2.9.1.3. Informe de laboratorio

Para informar el resultado del examen en fresco se recomienda usar la siguiente frase:

”Se observan esporos micóticos exoesporulados morfológicamente compatibles con *Paracoccidioides* sp.”

Se recomienda realizar el análisis de por lo menos tres muestras para aumentar la probabilidad del hallazgo del hongo.

En caso de microscopía negativa y con clínica compatible poner una observación en el informe laboratorio que diga:

“Se sugiere serología p/ Paracoccidioidomicosis”

2.9.1.4. Cultivo

El *Paracoccidioides* sp. es un hongo de difícil crecimiento. Para aumentar la chance de aislamiento se deben utilizar medios de cultivos ricos en nutrientes como: medio de Fava Neto, Medio Inhibidor de mohos, agar BHI sangre, agar chocolate, éste último es un medio habitualmente utilizado en los laboratorios de bacteriología clínica.

Para poder obtener el aislamiento del hongo a partir de muestras a partir de sitios no estériles como materiales respiratorios es importante realizar el agregado de antibióticos para la inhibición de las bacterias que forman parte de la microbiota habitual.

Hay mayor probabilidad de aislamiento a partir del cultivo de muestras obtenidas a partir de punciones de ganglios.



Figura 22. Colonias levaduriformes de *Paracoccidioides* sp. en medio de Fava Netto a 37°C y 30 días de incubación.

Características macroscópicas de las colonias de *Paracoccidioides* sp.

La fase levaduriforme crece a 35-37°C como una colonia de aspecto cremoso, cerebriforme y plegada, de consistencia blanda y color blanco- amarillo claro, que empieza a crecer después de 10 a 15 días de incubación

La fase filamentosa crece a 28°C muy lentamente luego de 20 a 30 días de incubación, desarrollando una colonia pequeña, irregular, blanca, recubierta de un micelio aéreo corto que se adhiere al agar. En muchos aislamientos se observa la producción de un pigmento marrón difusible.

Características microscópicas de las colonias de *Paracoccidioides* sp.

A 35 - 37°C se observan células de levaduras (esporos) de distintos tamaños (4 - 40 μ m) usualmente ovales o elongadas, que tienen una pared gruesa y refringente, cuyo citoplasma tiene gotas de lípidos prominentes. La característica más destacada, es la forma levaduriforme de apariencia de “rueda de timón”; es la célula madre multibrotante que presenta alrededor células hijas periféricas. Además se pueden observar células con brotación simple o cortas cadenas de blastoconidios.

A 28°C las hifas son finas y septadas, y en medios comunes de laboratorio se observan a veces clamidoconidios esparcidos como única característica adicional.

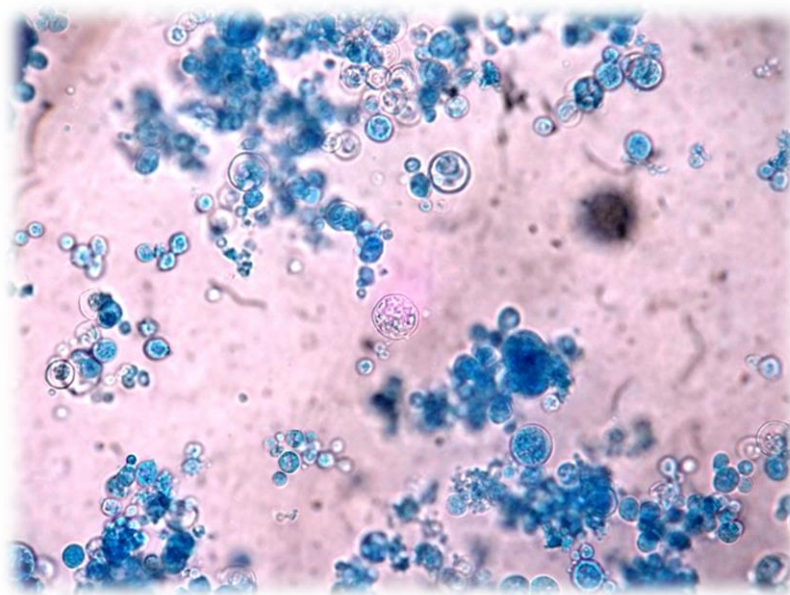


Figura 23. Microscopía de cultivo a 37 °C de *Paracoccidioides* sp. Coloración con azul de lactofenol. Aumento x40.

2.9.2. Métodos indirectos de diagnóstico laboratorial

La Paracoccidioidomicosis puede ser diagnosticada a través de la detección de la presencia de anticuerpos anti Paracoccidioides. En pacientes en los cuales hay dificultad para la toma de muestras respiratorias o de lesiones la serología puede ser una alternativa útil.

La prueba de inmunodifusión radial (ID) es la metodología más utilizada para la detección de anticuerpos antiparacoccidioides en pacientes con sospecha de la enfermedad. Además esta técnica sirve para evaluar la evolución de la enfermedad y deben ser solicitadas cada 6 meses, conjuntamente con la radiografía. Se puede solicitar la prueba en un periodo menor si no se observa respuesta clínica al tratamiento o se sospecha de reactivación de la enfermedad. La reducción de los títulos de anticuerpos debe ocurrir en torno a los 6-10 meses de tratamiento, debiendo dar resultados negativos o estabilizarse en títulos bajos. Las pruebas positivas o el aumento del valor del título pueden preceder a una recaída clínica.

Otras pruebas inmunológica, además de la ID para la detección de anticuerpos son: contrainmunolectroforesis, Elisa, inmunofluorescencia indirecta e inmunoblot. Casos de PCM con resultados falsos negativos pueden ser observados en cualquiera de las pruebas citadas y se asocian con pacientes con la inmunidad celular deprimida.

2.9.2.1. Método de Inmunodifusión radial (inmunodifusión doble)

Fundamento: La técnica de *Outchterlony* o Inmunodifusión Doble (ID) consiste en dejar difundir el suero problema y los extractos antigénicos de hongos en pocillos separados de un gel de inmunodifusión permitiendo la migración de los antígenos y anticuerpos específicos hasta un punto en el que reaccionan y originan arcos de precipitación (precipitinas) visibles a simple vista o mediante la tinción con Coomasie Blue.

El principal componente antigénico de *Paracoccidioides brasiliensis* es una glicoproteína de 43 Kd llamada GP43, que se une a la pared y participa de la adhesión, invasión y patogénesis del hongo. Los anticuerpos (anti gp 43) dirigidos contra este antígeno son detectados en todos los pacientes con PCM por *Paracoccidioides brasiliensis*.

Antes del descubrimiento de la nueva especie de *Paracoccidioides*, *P. lutzii*, (estas anteriormente conocidas como cepas Pb01 like) investigadores habían observado que existían varios pacientes con examen directo positivo para *Paracoccidioides sp.*, sin embargo, pruebas serológicas negativas. Luego de varias investigaciones realizadas, se descubrió que las cepas de *P. lutzii*, predominantes en la región Centro o este del Brasil presentan características antigénicas diferentes a la de *P. brasiliensis*. Debido a esto, para la detección de anticuerpos anti *P. lutzii* se utiliza el antígeno CFA en la prueba de inmuno difusión radial.

Procedimiento para la realización de la prueba de inmunodifusión radial

Muestra Requerida: muestras de suero humano,

Reactivos:

- Agarosa o agar noble al 1%
- Solución salina
- Agua destilada
- Citrato de sodio al 5%
- Colorante Coomassie Blue Brilliant R
- Solución decolorante

Equipos y materiales:

- Láminas
- Perforador de agar
- Tubos
- Bisturí

- Pipeta automática graduable 5-50 μ L
- Punteras
- Centrifuga
- Estufa
- Heladera
- Freezer

Acciones en Forma Secuencial

Preparación del Suero

- Centrifugar por 5 minutos a 1500 rpm la sangre del paciente.
- Separar el suero del paquete globular.

Preparación de la Lámina

- Retirar de la heladera 1 tubo con agarosa al 1%.
- Retirar del congelador los reactivos para la inmunodifusión radial, antígeno, control positivo.
- En un recipiente apto para uso en microondas colocar agua y luego los tubos con agarosa al 1%.
- Calentar en el microondas en el modo cocción rápida por 60 segundos.
- Verificar si el agar está en forma líquida
- Seleccionar una lámina nueva o libre de rayaduras, escribir el código del paciente en uno de los bordes de la lámina, nombre y fecha
- Verter el contenido del tubo (aproximadamente 3 mL) en la lámina
- Esperar enfriar (aproximadamente 10 minutos)
- Con un perforador hacer orificios de 4 mm de diámetro como lo diagramado en la **figura 24**.
- Utilizar una pipeta automática para cargar los pocillos con el antígeno (10 μ L), control positivo (20 μ L), suero del paciente puro y con sus diluciones (20 μ L) de acuerdo a la **figura 24**.
- Incubar por 72 h en cámara húmeda.
- Para eliminar las bandas inespecíficas sumergir la lámina en un recipiente que contenga citrato de sodio al 5% por 1 h.
- Verificar la presencia de líneas de precipitación entre el antígeno, el control positivo y sus diluciones.
- Cuando se observen bandas de precipitación débiles se procederá a la coloración para mejor visualización.

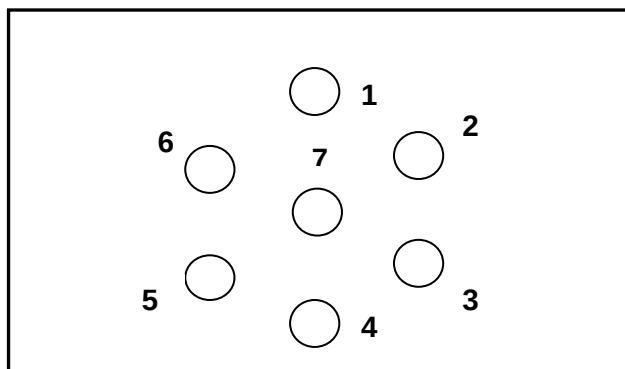


Figura 24: Molde para prueba de Inmunodifusión Radial. 1: Control positivo, 2: suero del paciente sin dilución, 3: suero del paciente dilución 1/2, 4: suero del paciente dilución 1/4, 5: suero del paciente dilución 1/8, 6: suero del paciente 1/6 7: antígeno.

Coloración

- Colocar la lámina en un recipiente que contenga solución de NaCl al 0,85% durante 24 h, hacer 3 a 4 cambios de la solución.
- Envolver la lámina en papel de filtro humedecido en agua y secar a 37 °C por una noche.
- Mojar con agua destilada las láminas envueltas en papel de filtro, retirando con cuidado el papel.
- Lavar con agua destilada para retirar fragmentos de papel del filtro sobre el gel.
- En un recipiente colocar la lámina y cubrir la lámina con colorante Azul Brillante de *Coomassie* durante 5 minutos.
- Decolorar con solución decolorante para obtener una mejor visualización de las líneas de precipitación.

2.9.2.2. Interpretación de resultados:

Prueba positiva: Los sueros de pacientes con Paracoccidioidomicosis pueden dar de una a tres bandas de precipitación frente al antígeno específico. Los anticuerpos precipitantes tienen larga persistencia, aunque algunos de ellos pueden desaparecer luego de un tratamiento exitoso disminuyendo el número de bandas detectadas por ID.

Prueba negativa: No se observa ninguna línea de precipitación entre el orificio del suero y el antígeno

Observaciones: Pacientes con CD4 menor a 200 o con otra inmunodeficiencia pueden dar falsos negativos.

Capítulo3

Coccidioidomicosis

3.1. Definición

La coccidioidomicosis es una micosis sistémica causada por dos especies de hongos dimorfos denominados *Coccidioides immitis* y *Coccidioides posadasii*; se caracteriza por una gran variedad de manifestaciones clínicas; en general se presenta como coccidioidomicosis primaria pulmonar y coccidioidomicosis progresiva o diseminada, que afecta piel, tejido celular subcutáneo, ganglios linfáticos, huesos, articulaciones, órganos y sistema nervioso central.

La puerta de entrada es el tracto respiratorio, siendo primariamente una micosis pulmonar profunda que también puede presentarse como una enfermedad granulomatosa y supurativa.

Sinonimia: Fiebre del valle de San Joaquín.

3.2. Descripción del agente patógeno

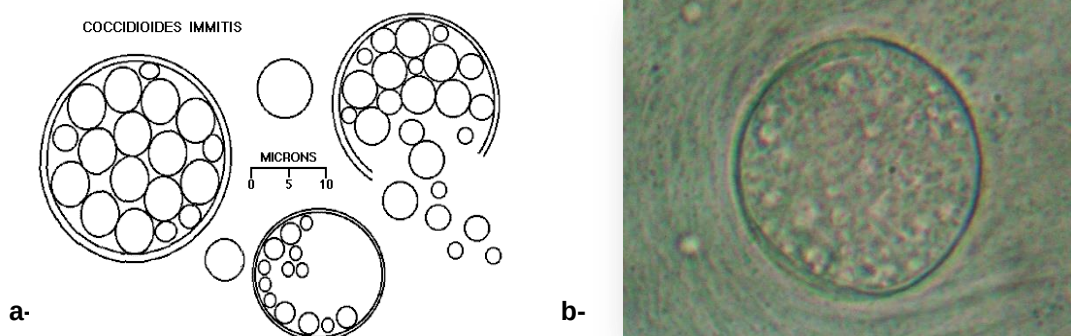


Figura 25. a) Esquema de esférulas de *Coccidioides* Fuente: www.library.med.utah.edu b) Microscopia de *Coccidioides* sp.

Coccidioides sp. es el hongo que con más frecuencia se encuentra involucrado en infecciones adquiridas en el laboratorio. Gran cuidado y precauciones laborales estrictas de bioseguridad deben ser tomadas cuando se trabaja con muestras y cultivos con sospecha de positividad para *Coccidioides* sp.

El hongo se presenta en forma de esférulas conteniendo endosporas. Las esférulas son redondas y refráctiles y con paredes gruesas. Varían en tamaño de 20 μ m para las formas jóvenes hasta 150 μ m para las formas maduras.

3.3. Epidemiología

Este hongo está relacionado principalmente con zonas de clima seco, donde los índices pluviométricos anuales son inferiores a 800 mm con vegetación pobre, siendo más abundante en una profundidad comprendida entre 10 y 28 cm de la superficie y en suelos que presenten elevada salinidad y pH alcalino; en su forma saprofita filamentosa el *Coccidioides* spp. es encontrado en este tipo de suelo.

En el Paraguay la región de la que se reportan más casos es la Occidental, ya que el Chaco paraguayo posee las condiciones climáticas y del suelo favorables para el mantenimiento del hongo en el ambiente.

Es una infección relacionada a los trabajadores del campo y la construcción.

No es transmitido entre animales ni entre humanos. El hombre, así como también los animales domésticos (perro, cerdo, bovinos) y roedores silvestres, se contaminan por la inhalación de los artroconidios de la forma filamentosa, que son particularmente volátiles y virulentos.

3.4. Manifestaciones clínicas

Como otras micosis profundas, la coccidioidomicosis puede ser dividida en cuatro formas distintas:

1. Asintomática
2. Pulmonar aguda autolimitada o residual
3. Diseminada
4. De inoculación primaria

Luego de la inhalación del polvo contaminado, 60% de los individuos presentan una infección primaria asintomática y los demás desenvuelven infección moderadamente severa, generalmente la forma pulmonar aguda.

Los síntomas surgen luego de una a tres semanas de exposición al agente etiológico, siendo típica la infección respiratoria baja, acompañada de fiebre, sudores nocturnos, disnea, anorexia, tos con expectoración productiva, dolor torácico, artralgias, etc. En 20% de los casos pueden ser observadas reacciones exantémicas, eritema polimorfo o eritema nodoso.

En estos casos la radiografía de tórax revela infiltración pulmonar, derrame pleural, y adenopatía hilar. La infección pulmonar aguda autolimitada, como su propio nombre lo sugiere, evoluciona para la cura, en la mayoría de los casos, sin intervención terapéutica específica.

Aproximadamente 5% de los pacientes que desarrollan infección respiratoria permanecen con infección residual, en la forma nodular, con nódulos múltiples o nódulo solitario, o coccidioidoma, o la forma cavitaria, algunas veces con fibrosis y bronquiectasias. Generalmente evolucionan sin sintomatología clínica o pueden

desenvolver formas crónicas y progresivas o agudas y rápidamente fatales. En estos casos, pueden ocurrirempiemas, fístulas broncopleurales y pneumotórax, cuadros de tratamiento difícil, observados con mayor frecuencia en diabéticos, alcohólicos, y pacientes inmunosuprimidos.

Puede ocurrir diseminación, afectando piel, mucosa, meninges, huesos, articulaciones, bazo, hígado, riñones, glándulas adrenales, miocardio, etc, raramente en pacientes inmunocompetentes, siendo actualmente observada en portadores del síndrome de inmunodeficiencia adquirida.

3.5. Diagnóstico diferencial

La forma pulmonar parece neumonía atípica, tuberculosis, influenza.

La forma cutánea esporotricosis, infección por micobacterias atípicas y carcinoma espinocelular,

La forma residual parece tuberculosis e histoplasmosis.

3.6. Tratamiento

Forma clínica	Antifúngico / Dosis	Duración
No grave	Itraconazol ó fluconazol 400 mg	6 a 12 meses
Grave	Anfotericina B 50 mg/día luego itraconazol	Anfo, 2 semanas Itra, hasta 6 meses ó hasta que dure la inmunosupresión
Meningitis	Fluconazol 400-800 mg	Períodos prolongados

3.7. Diagnóstico laboratorial de la coccidioidomicosis

3.7.1. Examen directo

El diagnóstico se realiza mediante la observación de las esférulas de *Coccidioides* sp. en muestras respiratorias: esputo, secreción traqueal, lavados bronquiales, muestras de lesiones de piel y biopsias.

Se realiza un examen directo de la muestra que puede ser efectuado con el agregado de hidróxido de potasio o sodio al 20% (KOH o NaOH).

Al microscopio se observan las estructuras parasitarias o esférulas, con las que se realiza el diagnóstico; tienen forma esférica con doble pared; miden aproximadamente 20 a 150 μm de diámetro con endosporas promedio de 2-5 μm de diámetro; sin embargo, si la esférula está en etapas tempranas tiene un menor tamaño (20 a 30 μm), no posee endosporas y se puede confundir con algunas otras estructuras fúngicas.

Se utiliza también azul de lactofenol, observándose las esférulas teñidas de azul, lo cual descarta algunos artefactos o falsos positivos (burbujas de aire); sin embargo, la tinción puede dificultar la apreciación de endosporas. De manera excepcional se han reportado casos en que se observan tanto esférulas como formas miceliales, es decir, ambas fases del hongo; sucede en particular en pacientes diabéticos; este fenómeno excepcional puede explicar que el hongo actúa no sólo como bifásico, sino como oportunista filamentoso; esto se ha visto en lesiones pulmonares cavitarias, donde hay un incremento en la tensión del oxígeno, creando un microambiente similar al de la naturaleza.

En el examen en fresco se pueden observar esférulas de *Coccidioides sp.* en distintos estados de maduración

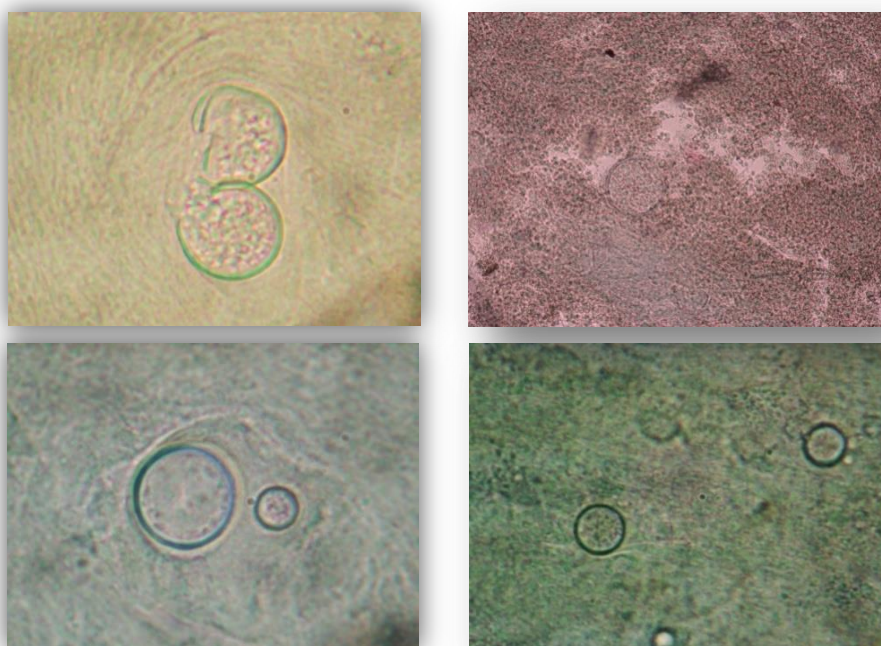


Figura 26. Esférulas de *Coccidioides sp.* en distintos estados de maduración. Examen en fresco aumento 40x.

3.7.2. Coloraciones

Además del examen en fresco, se pueden visualizar las estructuras del *Coccidioides* sp. en otras coloraciones realizadas habitualmente en el laboratorio: como Ziehl-Neelsen y Giemsa. Confirmar siempre con la realización del examen en fresco.

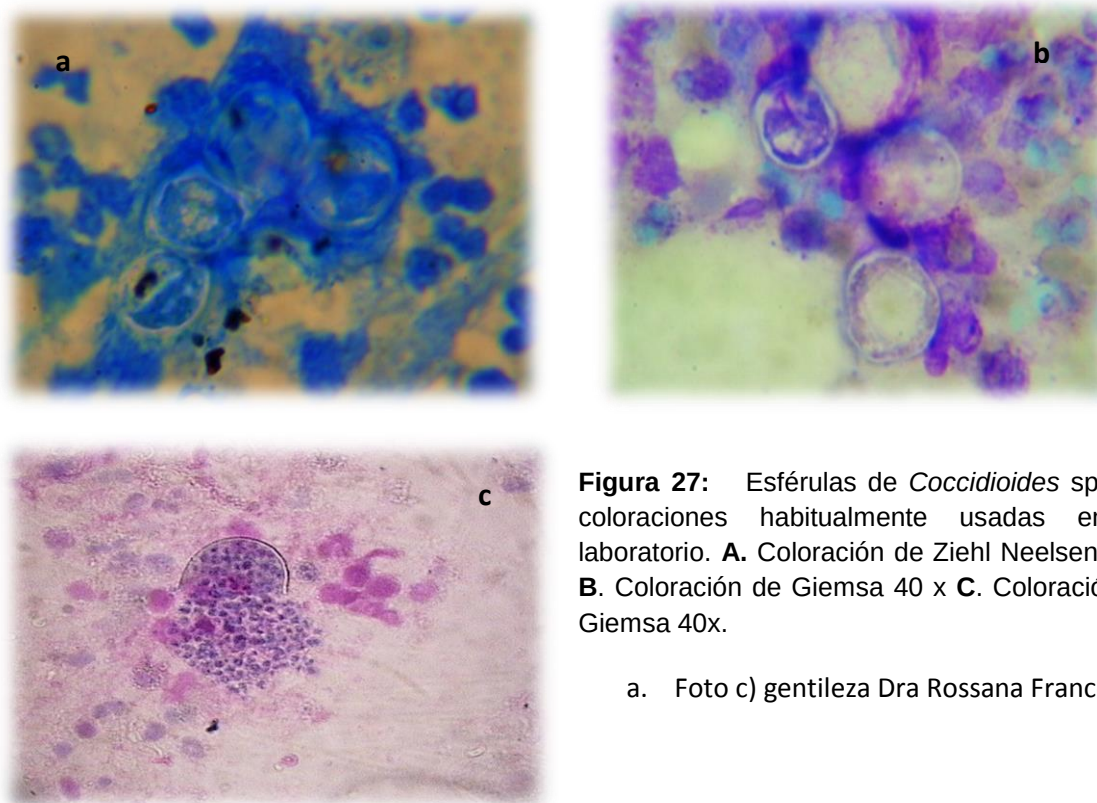


Figura 27: Esférulas de *Coccidioides* sp. con coloraciones habitualmente usadas en el laboratorio. **A.** Coloración de Ziehl Neelsen 40 x **B.** Coloración de Giemsa 40 x **C.** Coloración de Giemsa 40x.

a. Foto c) gentileza Dra Rossana Franco

3.7.3. Informe de laboratorio

Para informar el resultado del examen en fresco se recomienda usar la siguiente frase:

”Se observan esférulas con endosporos con morfología compatible con *Coccidioides* sp.”

Se recomienda realizar el análisis de por lo menos de tres muestras para aumentar la probabilidad del hallazgo del hongo.

En caso de microscopía negativa y con clínica compatible poner una observación en el informe laboratorial que exprese lo siguiente:

“Se sugiere serología p/ Coccidioidomicosis”

3.7.4. Cultivo

En agar Sabouraud el hongo crece en 2-10 días, en su forma filamentosa tanto a 37 °C como 25 °C evidenciándose la presencia de colonias algodonosas, de coloración blanca. Se debe destacar que la manipulación de los cultivos es peligrosa. Debe tenerse en cuenta que la forma filamentosa puede desarrollarse en medios de cultivos utilizados habitualmente en el laboratorio de Bacteriología como agar chocolate y agar sangre a las temperaturas habituales de incubación 35 - 37 °C.

Las formas de esférulas se obtiene cultivando en un medio especial llamado medio de Coverse

Macromorfología de las colonias

A 25-28°C° en general el desarrollo se presenta entre el tercero y cuarto día. Al comienzo las colonias en Agar Sabouraud glucosa son húmedas, no vellosas y grisáceas, pero rápidamente se recubren de vello, con micelio aéreo que pronto ocupa toda la superficie del tubo. En un principio el micelio es blanco pero con la edad se torna de color canela a pardo.

Micromorfología de las colonias

La conidiación se da del décimo al decimocuarto día. La identificación depende del hallazgo de los artroconidios con forma de barril, alternados con “células disyuntoras” vacías ambos característicos de la fase saprofítica de *Coccidioides* (ver figuras). No obstante para confirmar la identificación se requiere la producción de esféricas en animales o en cultivo líquido a 40°C.

Muchos hongos queratinofílicos del suelo que pueden ser aislados en esputo, en forma incidental, se parecen a *Coccidioides*. La demostración del dimorfismo es el único criterio absoluto

En el cultivo en la forma filamentosa, se observan estructuras artroconidiadas intercaladas por disyuntores.

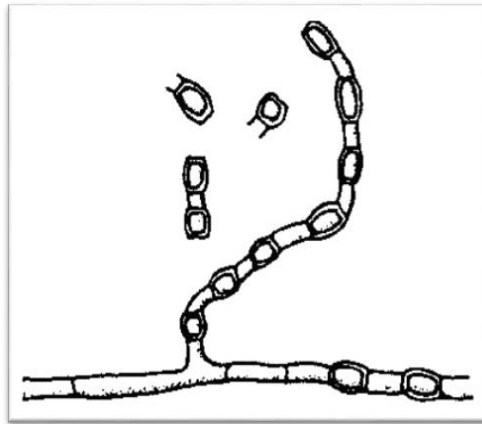


Figura 28. Hifas características de la forma filamentosa de *Coccidioides* sp que presentan forma de barril de manera intercalar

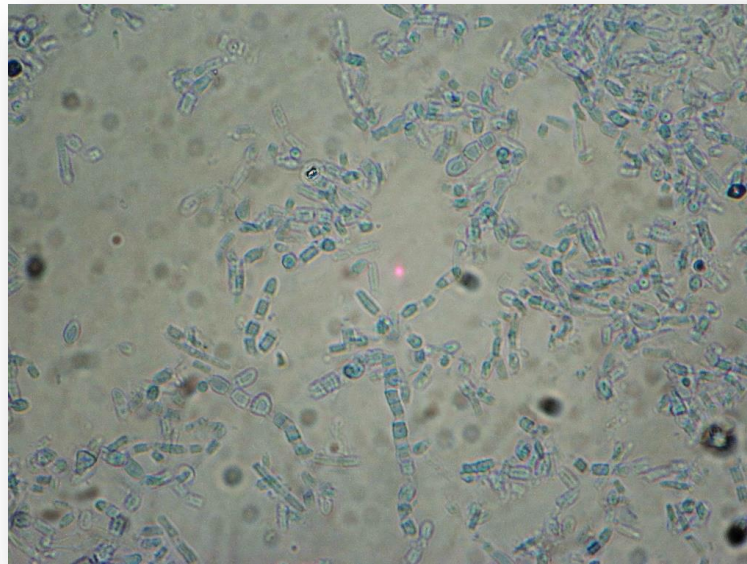


Figura 29. Microscopía de cultivo de *Coccidioides* sp. forma filamentosa. Se observan las artróconidias características. Gentileza Dr. José Pereira Brunelli.



Figura 30. Cultivo de *Coccidioides* sp. Medio de cultivo. Fuente: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/micologia/coccidomicosis.html>

Capítulo 4

Histoplasmosis

4.1. Definición

Micosis sistémica causada por un hongo dimorfo denominado *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* clasificado dentro de la división Ascomycetes, del orden Onygenales. La variedad *duboisii* de *Histoplasma capsulatum* está restringida al continente africano. La infección se adquiere por la inhalación de microconidias que se encuentran en el suelo.

Período de incubación Puede ser de 1 a 3 días, hasta 1 a 5 meses, teniendo como promedio 7 a 10 días.

Sinonimia

Enfermedad de Darling, enfermedad de los murciélagos, fiebre de las cavernas y minas, enfermedad de los mineros.

4.2. Descripción del agente patógeno

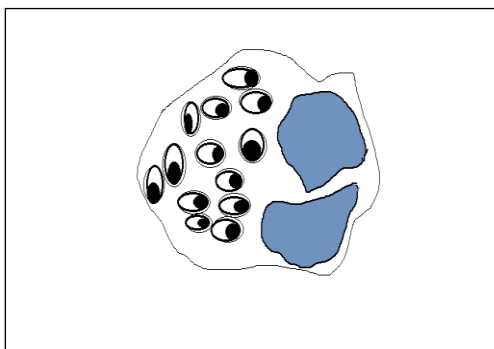


Figura 31. Dibujo esquemático de macrófago con esporos micóticos intracelulares en semiluna de *Histoplasma capsulatum*

4.3. Epidemiología

La histoplasmosis tiene una distribución cosmopolita, es endémica en regiones de clima tropical y templado del continente americano.

El *Histoplasma capsulatum* puede causar enfermedad en seres humanos y en diversas especies animales. Se considera la micosis pulmonar más frecuente en el mundo; es un padecimiento patógeno primario y en pacientes inmunosuprimidos el hongo puede actuar como oportunista.

El nicho ecológico con el cual el *H. capsulatum* es más frecuentemente asociado es el suelo con alto contenido de nitrógeno, con pH ligeramente ácido

resultante de depósitos de excrementos (guano) de gallinas, murciélagos y cuervos. Otros factores que favorecen su desarrollo son la humedad y ambientes con poca luminosidad, debido a esto esta micosis se puede adquirir con facilidad en minas, casas abandonadas, cavernas y cuevas.

Ocurrieron epidemias de histoplasmosis afectando a grupo de personas que fueron expuestas a alta concentración de conidios, luego de la limpieza de gallineros o de lugares invadidos por aves o murciélagos.

La histoplasmosis se presenta a cualquier edad, con mayor incidencia entre la tercer y cuarta década de la vida, probablemente por factores ocupacionales. Los niños son los más susceptibles, tienen alta tendencia a la diseminación, y por lo tanto mal pronóstico. Es más frecuente en hombres que en las mujeres en una relación 4:1.

La enfermedad tiene relación con la ocupación, la exposición a gran número de conidios, siendo los grupos de más riesgo agricultores, cuidadores de aves de corral, mineros, arqueólogos, obreros de construcción, etc.

La vía de entrada es la inhalatoria por la aspiración de los conidios del hongo. Esporádicamente penetra por vía cutánea, dando un complejo cutáneo chancriforme similar a la esporotricosis o coccidioidomicosis.

4.4. Manifestaciones clínicas

Histoplasmosis primaria: La mayoría de los casos (60-95%) son asintomáticos o subclínicos; sólo son detectables por la respuesta intradérmica al antígeno polisacarídico (histoplasmina), y radiológicamente, debido a que algunos pacientes presentan focos pulmonares de calcificación. El resto (5%) puede presentar sintomatología variable, que va de un estadio leve a moderado o grave.

Histoplasmosis leve: Simula a una gripe banal, por lo que el ataque al estado general es mínimo; la sintomatología está caracterizada por fiebre moderada e irregular, cefalea, mialgias, astenia y adinamia. A los rayos X en muy contadas ocasiones se observan lesiones micronodulares. La intradermoreacción a la histoplasmina es casi siempre positiva débil y la serología negativa. Esta fase dura en promedio 15 días y, por lo incipiente del cuadro, casi siempre pasa inadvertida.

Histoplasmosis moderada: La sintomatología aumenta, simulando una neumonía atípica; el cuadro respiratorio es más evidente, con presencia de tos, estertores y discreta disnea; el ataque al estado general viene acompañado por fiebre moderada y constante, cefalea, dolores musculares y óseos. A los rayos X se observa aumento de volumen de los ganglios hiliares.

Histoplasmosis progresiva ó secundaria: Presenta dos estadios diseminados: agudo y crónico.

a) Histoplasmosis progresiva aguda: Es común en América del Norte y del Sur. Se presenta a cualquier edad, de preferencia en pacientes inmunosuprimidos por corticoterapia o por procesos linfoproliferativos.

Es también frecuente en niños menores de 10 años, en los cuales es importante porque el curso del padecimiento es casi siempre mortal a corto plazo. Dicha fase clínica está constituida por un cuadro respiratorio febril, con tos constante y poca expectoración. Se originan adenopatías múltiples, hepatomegalia, esplenomegalia y diarrea. El paciente sufre gran pérdida de peso, anemia y leucopenia. La diseminación a la piel es rara y, más aún, hacia el sistema nervioso central (SNC). Por lo regular los pacientes son negativos a la histoplasmina; en cambio, los títulos de fijación de complemento son altos; esta correlación nos indica mal pronóstico. En niños, las imágenes radiológicas pueden semejar una tuberculosis miliar.

b) Histoplasmosis progresiva crónica: Es un padecimiento frecuente en América del Sur (Argentina y Brasil); se presenta sobre todo en adultos de 40 a 60 años; la sintomatología y datos clínicos son vagos; hay astenia y pérdida de peso, acompañados de un cuadro respiratorio crónico con tos, escasa expectoración y sin hemoptisis, por lo que se confunde con facilidad con tuberculosis crónica.

La fibrosis y la cavitación son los hallazgos radiológicos más frecuentes.

En casos graves se generan adenopatías, hepatomegalia y esplenomegalia, y pueden presentarse granulomas solitarios, en particular involucrando piel, mucosas o ganglios linfáticos.

La topografía clínica más habitual de estos últimos es laringe, faringe, boca, tabique nasal y genitales (masculinos y femeninos). La morfología de las lesiones está constituida por úlceras únicas o poco numerosas, de bordes netos, eritematosas, en ocasiones cubiertas por exudado blanco amarillento.

En labios puede simular lesiones de paracoccidioidomicosis, es decir, nódulo-gomosas, erosionadas y con micropústulas. La sintomatología más común es prurito, dolor y ardor.

Histoplasmosis diseminada: Esta variedad clínica se observa cada vez con más frecuencia, sobre todo en pacientes inmunosuprimidos por SIDA, e incluso puede ser una de sus primeras manifestaciones; los pacientes comienzan con pérdida ponderal, hepatomegalia, esplenomegalia y pancitopenia, así como afección pulmonar. Es en esta fase donde se observa la mayor diseminación a la piel.

Es importante remarcar que no existen lesiones patognomónicas, las cuales por lo regular se presentan en cara y cuello, pero pueden presentarse en cualquier parte del cuerpo del paciente.

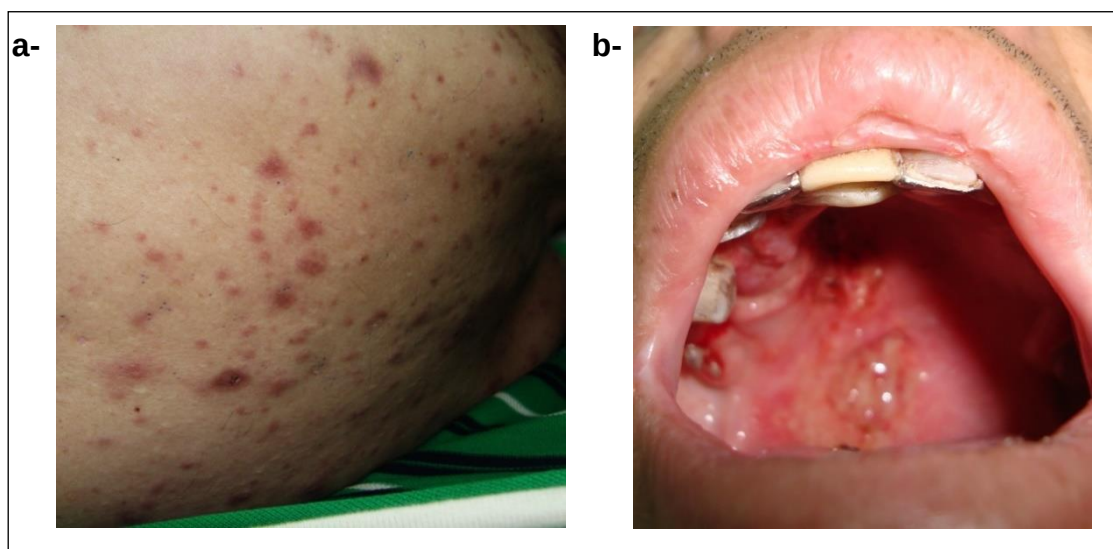


Figura 32. Lesiones en pacientes Histoplasmosis diseminada a) Lesiones papulomatosas en espalda b) Lesiones ulceradas en mucosa bucal.

4.5. Diagnóstico diferencial (clínica)

Las formas pulmonares pueden simular una tuberculosis pulmonar, coccidioidomicosis, paracoccidioidomicosis, criptococosis, neumonías virales y bacterianas, fibrosis pulmonar intersticial difusa, mononucleosis infecciosa.

Las formas cutáneas pueden confundir con neoplasias, sífilis tardía, esporotricosis, leishmaniosis cutánea.

4.6. Tratamiento

Forma clínica	Antifúngico / Dosis	Duración
Pulmonar ó diseminada no grave	Itraconazol 400 mg/ día, 6-18 meses en la diseminada y 12- 24 meses pulmonar	
Pulmonar ó diseminada grave	Anfotericina B 50 mg/día hasta mejora de síntoma luego itraconazol 400 mg/día 6-18 meses en la diseminada y 3 meses pulmonar	
Meningitis	Anfotericina B 50 mg/día hasta mejora de síntoma luego itraconazol 800 mg/día 9-12 meses	
SIDA	Anfotericina B 50 mg/día hasta mejora de síntoma luego itraconazol 200 ó 400mg/día de por vida	

4.7. Diagnóstico laboratorio de la histoplasmosis

El diagnóstico se realiza mediante la observación del *Histoplasma capsulatum* en muestras respiratorias: como esputo, secreción traqueal, lavados bronquiales, muestras de lesiones de piel, mucosas y biopsias.

4.7.1 Examen directo: es poco útil, debido a que las levaduras de *H. capsulatum*, son muy pequeñas e intracelulares y por lo general pasan inadvertidas.

4.7.2. Coloración de Giemsa: se observan levaduras intracelulares en general dentro de polimorfonucleares o macrófagos. La pared celular no se tiñe y aparece como un halo claro; el citoplasma adopta una forma semilunar que se concentra en un polo y se colorea de azul-lila oscuro y el resto toma un color celeste.

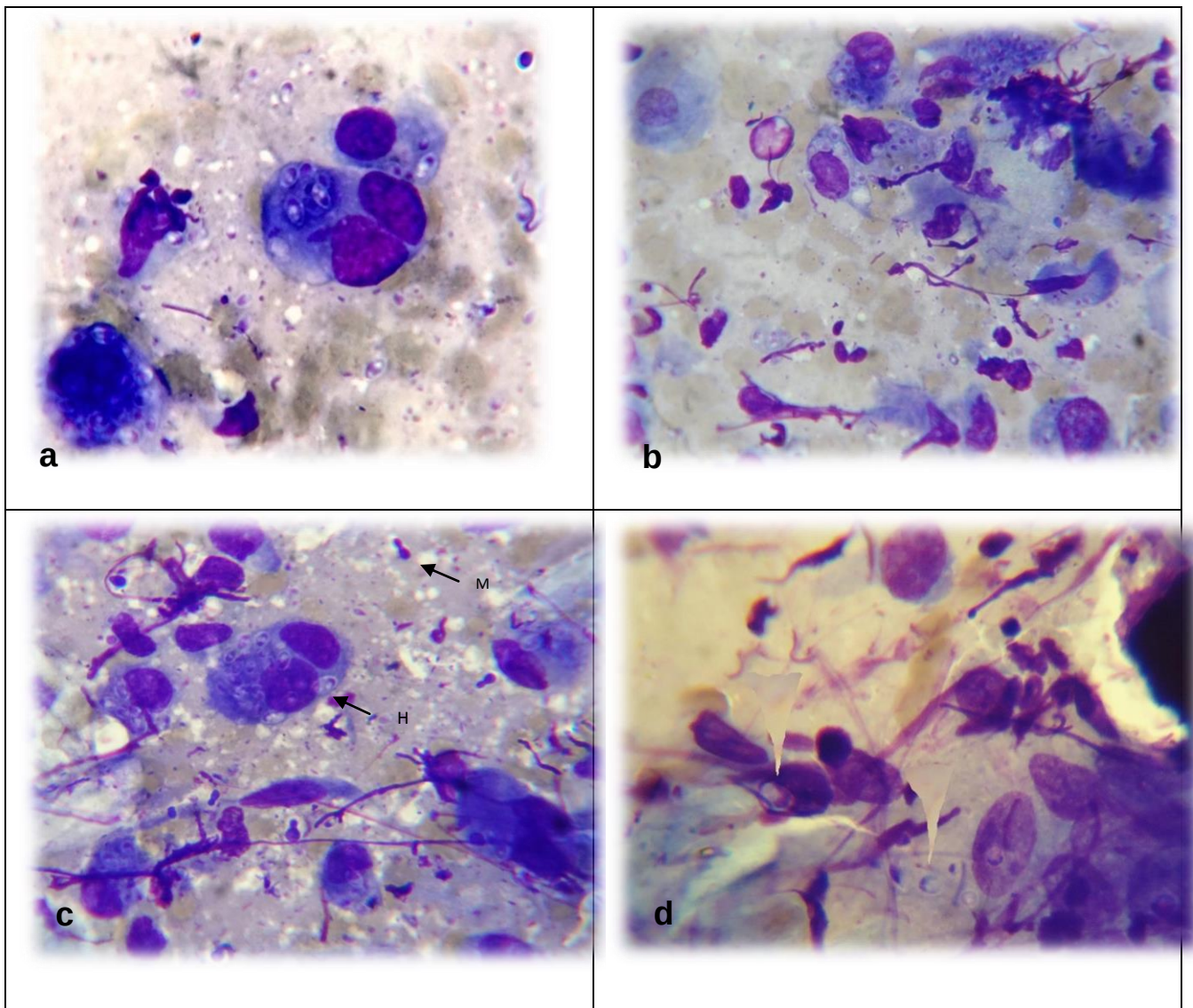


Figura 33. Microscopía de muestras de pacientes con histoplasmosis, extendidos coloreados con Giemsa 100x **a, b** y **c** muestras de lesiones de piel donde se observan formas intracelulares de *H. capsulatum* **d.** Lavado broncoalveolar (BAL) con formas extra e intracelulares de *H. capsulatum*. En la foto c se observan tb esporos de *Malassezia* sp. (ver flecha arriba a la derecha)

En el análisis microscópico del extendido coloreado con Giemsa se debe diferenciar el *Histoplasma capsulatum* de otros microorganismos con estructuras semejantes como: Leishmania (**Figura 34**) y Toxoplasma.

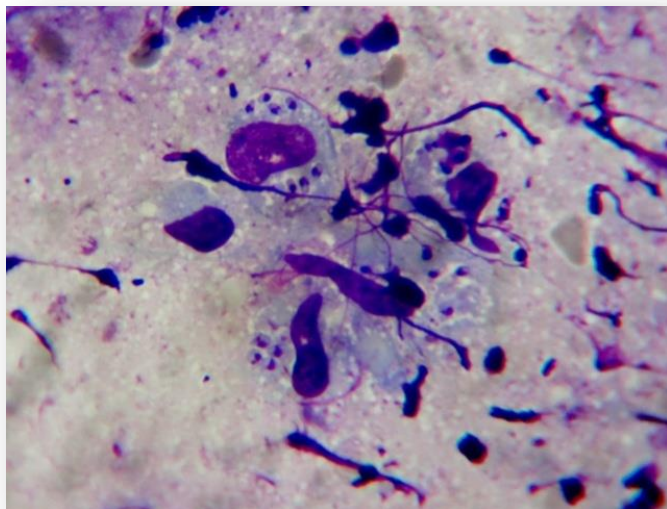


Figura 34. Coloración de Giemsa de muestra de lesión en mucosa. Aumento x40.
Se observan amastigotes compatibles con *Leishmania* sp.

4.7.3. Informe de laboratorio

Para informar el resultado de la coloración de Giemsa se recomienda usar la siguiente frase:

”Se observan esporos micóticos en semiluna con morfología compatible con *Histoplasma capsulatum*”

Se recomienda realizar el análisis de por lo menos de tres muestras para aumentar la probabilidad del hallazgo del hongo. En caso de microscopía negativa y con clínica compatible poner una observación en el informe laboratorial que diga:

“Se sugiere serología para *Histoplasma capsulatum*”

4.7.4. Cultivo

Macromorfología de las colonias: En medio de agar Sabouraud glucosa incubado a 25-28°C el *Histoplasma capsulatum* desarrolla colonias blancas algodonosas, a los 12-30 días de incubación. En los cultivos de más de un mes se torna algo parduzco. Se han descrito dos tipos morfológicos de colonia: el tipo A (albino) y el tipo B (marrón). A 37 °C se desarrolla la fase levaduriforme,

Micromorfología de las colonias: se observan micelio filamentoso, ramificado y tabicado, hialino, de 2 a 5 µm de diámetro. La ramificación puede ser lateral o raramente dicotómica. La fructificación está constituida por dos tipos de conidios. Los macroconidios, grandes, esféricos o piriformes, de 10 a 25µm de diámetro, con una pared celular gruesa y externamente está erizado en tubérculos

con aspecto de expansiones digitiformes de 1 o más micras de largo. Los macroconidios se encuentran en el micelio aéreo y asientan sobre una especie de conidióforo corto, simple, o con 2 o 3 ramificaciones. Los microconidios son tipo aleuria, piriformes con membrana fina, lisa o ligeramente rugosa y miden de 2 a 5 μm de diámetro. Estos microconidios son sésiles o se disponen sobre cortos conidióforos tanto en el micelio aéreo como en el sumergido. Los cultivos de la forma filamentosa deben manejarse con estrictas precauciones de bioseguridad.

Algunos cultivos presentan un tercer tipo de conidio, semejante a los macroconidios, pero de pared lisa, nacen en pedículos cortos.



Figura 35. Microscopía de la fase filamentosa de *Histoplasma capsulatum*. Cultivo en agar Sabouraud. Aumento x 40.



Figura 36. Colonia de *Histoplasma capsulatum* en agar Sabouraud.

Fuente: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/micologia/zoonosis.html>

En el análisis microscópico del cultivo de la forma filamentosa se debe realizar el diagnóstico diferencial con hongos con estructuras semejantes como *Scedosporium* y *Chrysosporium*.

Capítulo 5

Muestras para diagnóstico laboratorial de Micosis Sistémicas.

Como cualquier enfermedad infecciosa, el diagnóstico de las micosis se inicia con la sospecha clínica que permite indicar una serie de pruebas para llegar al diagnóstico final.

El diagnóstico definitivo lo facilita el laboratorio de Microbiología identificando y aislando un posible agente causal a partir de una muestra biológica. Por lo tanto, el tipo y la **calidad de la muestra** clínica o producto patológico que se remite al laboratorio para su análisis, es crucial en el diagnóstico etiológico de los procesos infecciosos y condiciona en gran manera la rentabilidad de cualquier estudio microbiológico.

5. 1. Muestras respiratorias

Antes de la toma de muestra es imprescindible convencer al paciente de la importancia de una buena higiene bucal previa, aclararle que debe quitarse las prótesis dentarias (sí las usa) antes de cepillarse los dientes con dentífrico; luego debe realizar buches y gárgaras con agua hervida y enfriada, recogiendo una buena expectoración profunda en un recipiente estéril descartable de boca ancha.

5.1.1. Esputo por expectoración espontánea:

La expectoración debe ser la primera de la mañana recogida en ayunas, y enviada rápidamente al laboratorio, refrigerada y acompañada de una muestra de sangre para estudios serológicos, y del formulario para el laboratorio de Micología con los datos requeridos del paciente (ver en anexo 1 página 62)

Para un adecuado estudio micológico es necesario procesar tres muestras seriadas, recogidas en días sucesivos, siguiendo las instrucciones dadas con anterioridad. **Por ningún motivo las tres muestras se recogerán en el mismo recipiente.**

Cada muestra se enviará inmediatamente después de su recolección. Es conveniente explicar al paciente que las muestras de saliva o de secreciones nasales no sirven para el estudio, y que se necesita una muestra de secreción proveniente de pulmón para poder hacer el diagnóstico de su enfermedad. Tampoco deberá abrir el recipiente hasta el momento de la expectoración.

Recomendaciones para la toma de muestra de esputo por expectoración espontánea:

1. En caso que el enfermo use prótesis dentaria, se debe proceder a retirarla antes de efectuar la higiene bucal utilizando un cepillo de dientes y dentífrico (cepillar la mucosa bucal, lengua y encías) y luego efectuar gárgaras con agua, previo a la recolección de la muestra.
2. Instruir al paciente que no debe expectorar saliva o moco dentro del recipiente. Recoger la muestra resultante de una expectoración profunda en un recipiente estéril.

Nota: La muestra debe obtenerse tras una expectoración profunda preferentemente matinal, mediante tos o fisioterapia respiratoria (se recomienda el lavado previo de la boca con solución salina y evitar que la expectoración se contamine con secreciones nasales o saliva).

5.1.2. Esputo inducido

1. Cepillar la mucosa bucal, lengua y encías, previamente a la recolección de la muestra.
2. Enjuagar la boca del paciente con agua.
3. Usando un nebulizador, hacer que el paciente inhale aproximadamente de 20 a 30 ml de una solución fisiológica de NaCl 0.85%.
4. Recoger el esputo inducido en recipiente estéril.

Nota: Se recomienda como alternativa el esputo inducido en el caso que no sea posible una expectoración espontánea Su valor diagnóstico equivale al esputo por expectoración espontánea.

5.1.3. Calidad de la muestra de esputo

Su utilidad diagnóstica vendrá condicionada en gran parte por su "calidad", que se valora en función del número de leucocitos polimorfonucleares (PMN) y células epiteliales planas (CEP) presentes en la muestra (> 25 PMN y < 10 CE / campo, $\times 100$).

Si el examen microscópico no puede realizarse en el día de la obtención de la muestra, esta debe ser conservada en heladera a 4°C .

5.1.4. Secreción Traqueal

1. Introducir una sonda de aspiración a través del tubo endotraqueal o de la traqueotomía.
2. Instilar de una pequeña cantidad de solución salina estéril (± 5 ml) si la muestra es muy viscosa.

3. Succionar las secreciones respiratorias.

Nota: Se puede considerar la alternativa al esputo en el paciente intubado y su valor diagnóstico es muy similar.

5.1.5. Lavado bronquial (LB) y lavado broncoalveolar (BAL)

Pasar el broncoscopio a través de la nariz o la boca en pacientes no intubados ó a través de la vía del tubo endotraqueal en pacientes ventilados. Enclavar la punta del broncoscopio en un segmento bronquial (para el lavado bronquial) ó en un subsegmento bronquial (para lavado broncoalveolar).

1. Inyectar solución fisiológica 0.85% NaCl estéril, generalmente en volúmenes de 5 a 20 ml con jeringa, a través del canal del broncoscopio.
2. Succionar suavemente la solución fisiológica y colocar dentro de un recipiente estéril, antes de administrar la siguiente alícuota, (50 al 75% de la solución instilada es recuperada en el efluente del lavado).
3. Mantener separadas las alícuotas obtenidas de sitios diferentes y combinar sólo aquellas procedentes del mismo sitio para cultivo y examen directo.

Nota: En el LB la muestra procede del árbol bronquial superior y no es representativa del territorio alveolar ni bronquiolar y puede estar contaminada por secreciones del tracto respiratorio superior en el paciente no intubado, siendo su valor diagnóstico similar al del esputo. Sólo está indicado cuando el volumen del BAL es insuficiente y existe la sospecha de una infección fúngica pulmonar por patógenos primarios. En el enfermo intubado tiene el mismo valor diagnóstico que el aspirado traqueal.

5.2. Otros líquidos de punción líquido pleural, ascítico (peritoneal), pericárdico y sinovial.

Se recogen asépticamente en un recipiente estéril que se envía rápidamente al laboratorio, refrigerado.

1. Limpiar el lugar donde se va a realizar la punción con alcohol y desinfectar con una solución de yodo-povidona al 10%.
2. El médico realiza asépticamente la aspiración percutánea con jeringa para obtener 5 ml de la muestra. Expulsar el aire de la jeringa e inocular la muestra dentro de un envase estéril, hermético con tapa a rosca.

5.3. Muestras de lesiones en mucosas

En lo posible se practica una biopsia, caso contrario se raspa la zona afectada con bisturí, ansa o lanceta estéril. Se recoge el material en un recipiente estéril, agregándole unas gotas de SF estéril y se envía de inmediato al laboratorio, refrigerada.

Procedimiento:

1. Limpiar con agua estéril.
2. Raspar con bisturí la zona hasta un leve sangrado.
3. Colocar el material en una lamina limpia y cubrir con laminilla. Preparar tres o cuatro de esta manera para observación en fresco. Además hacer extendido del material en láminas (tres o cuatro) para tinciones.
4. Para cultivo pasar directamente del material obtenido con bisturí al medio de cultivo.

5.4. Muestras de lesiones en piel (No mucosas)

Muestra superficial

El aspirado con jeringa es el método aconsejado en lugar del hisopado.

1. Herida abierta: Lavar con solución fisiológica secar con gasa sin friccionar y tomar muestra
2. Herida cerrada: desinfección de piel con alcohol al 70% o con ó solución de yodo povidona al 10%.
3. Dejar secar el antiséptico antes de tomar la muestra.
4. Usando jeringa, aspirar de la parte más profunda de la lesión. Si hay vesículas, tomar líquido y material de la base de la herida.
5. Si la aspiración inicial falla, inyectar solución fisiológica estéril, en forma subcutánea.
6. Repetir el aspirado.



Figura 37. Toma de muestra en mucosa y superficial en piel.

Muestra profunda

1. Desinfectar la piel con alcohol al 70% o con solución de yodo povidona al 10%.
2. Se recomienda debridar la herida dejando al descubierto el lecho de la misma.
3. Aspirar con jeringas la porción más profunda de la lesión, evitando la contaminación de la parte superficial de la herida. Si la muestra es tomada durante una cirugía, en la que se realiza el drenado del absceso, una parte de la pared del absceso también debe ser enviada para cultivo.

5.5. Muestra de sangre para serología de micosis sistémicas

Se extraen 10 ml de sangre del paciente en ayunas, se trasvasa a un tubo seco tapa a rosca estéril, evitando la hemólisis, deje por lo menos por una hora a temperatura ambiente para que coagule, luego separe el suero por centrifugación, envase el suero en un vial plástico estéril para transporte y envíe al laboratorio refrigerado. Si su envío se demora más de una semana se conserva a -20°C .

5.6. Conservación y transporte de la muestra

La muestra deberá ser procesada lo antes posible después de la recolección, mayor será la recuperación en cultivo u observación microscópica cuanto antes sea analizada. Las muestras deben ser remitidas al laboratorio el mismo día de su obtención, si esto no fuera posible, mantenerlas en el

refrigerador, o de lo contrario mantenerlas en un lugar fresco y alejadas de los rayos solares.

Para envío de frascos con esputo y suero para pruebas de serología seguir las siguientes normas de embalaje **(Figura 35)**:

1. Colocar la muestra en un recipiente primario (esputo en frasco tapa rosca boca ancha, el suero previamente separado del paquete globular, en frasco con tapa hermética), debidamente identificado .
2. Se debe comprobar que los frascos estén cerrados herméticamente, luego introducir cada frasco en una bolsa de polietileno (recipiente secundario) y anudar la bolsa por encima de la tapa del frasco, de manera que sujete firmemente cada frasco.
Acondicionar los frascos así envueltos encajándolos en la base de la caja de transporte que puede tener una plancha de cartón para sujetar el o los frasco/s ó bien rellenar con papel absorbente el espacio que queda entre los envases.
3. El material deberá ser remitido, refrigerado con conservadora con hielo seco ó hielo. No colocar la muestra directamente en hielo, éste deberá ser contenido dentro de una bolsa de plástico para proteger el frasco que contiene el esputo (u otra muestra) de las influencias exteriores (deterioro físico y agua). Por fuera del recipiente secundario es importante colocar los datos relativos a la muestra, los cuales vendrán escritos en la solicitud del pedido. El recipiente de transporte debe poseer: resistencia, impermeabilidad y aislamiento.
4. Cada envío debe ser acompañado por las hojas de solicitud de examen correspondiente:
 - Datos del paciente: Nombre y apellido, número de cédula, edad, procedencia, síntomas durante la consulta.
 - Datos de la Persona que envía: Nombre y apellido, institución donde consultó, fecha, tipo de estudio solicitado (Examen en fresco, cultivo o serología).

Estos formularios deben estar separados de los frascos con muestras.

No deben ser colocados dentro de las cajas utilizadas para el transporte.

5. Verificar que la dirección del laboratorio al cual se envía la caja sea la correcta, que el número de frascos corresponda con el listado, que el listado conste claramente el nombre del centro de salud que lo envía.
6. El personal que transporta las muestras deberá ser instruido para mantener las cajas en posición vertical permanentemente y protegida del calor.

Deberá saber que si por accidente se produjera derrame masivo de los frascos; ese material debe ser autoclavado o incinerado.

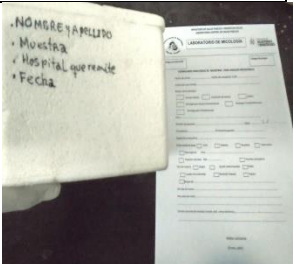
			
1. Envases para envío de muestras	2. Cartón para sostener el frasco	3. Realizar aberturas en el cartón	4. Insertar en el envase
			
5. Colocar el hielo en una bolsa	6. Colocar el hielo en el envase	7. Tapar y asegurar con cinta adhesiva	8. Rotular el envase y completar la ficha

Figura 38: Procedimientos de envío de muestra.

Capítulo 6

Soluciones, colorantes y medios de cultivo.

Soluciones y Colorantes

1. Hidróxido de potasio o sodio al 20%

KOH o NaOH	20 gr
Agua destilada	100 ml

2. Coloración de Giemsa p/ lámina

Concentrado de Giemsa	4 gotas
Agua destilada	2 ml

3. Solución de N- acetil cisteína 1%

N- acetil cisteína	1 gr
Agua destilada	100 ml

4. Reactivos para la coloración de laminas de la prueba de inmunodifusión radial

Agarosa al 1%
Citrato de sodio al 5 %
Coomasie Blue: 0,15 g del colorante en 100 mL de solución decolorante
Solución decolorante: 20 mL de ácido acético glacial, 40 mL de etanol, 40 mL de agua destilada

Medios de cultivo

1. Agar Sabouraud simple

Glucosa	20 gr
Peptona	10 gr
Agar agar	15 gr
Cloranfenicol	500 mg
Agua destilada	1000 ml

2. Agar Sabouraud simple con cicloheximida

Glucosa	20 gr
Peptona	10 gr
Agar agar	15 gr
Cloranfenicol	500 mg
Cicloheximida	400 mg
Agua destilada	1000 mL

3. Medio de cultivo Fava Netto

Proteosa peptona	3 gr
Peptona	10 gr
Extracto de carne	5 gr
Cloruro de sodio	5 gr
Extracto de levadura	5 gr
Dextrosa	40 gr
Agar agar	18 gr
Agua destilada	1000 ml

Fundir el medio en baño-maría hirviente. Ajustar el pH entre 7,2-7,4.
Distribuir en tubos ensayos . Autoclavar a 120°C durante 20 minutos.

4. Medio Inhibidor de Mohos

Triptona	3 gr
Extracto de carne	2 gr
Extracto de levaduras	5 gr
Dextrosa	5 gr
Almidón soluble	2 gr
Dextrina	0,125 gr
Cloranfenicol	250 mg
Sal A	10 ml
Sal B	20 ml
Agar agar	18 gr
Agua destilada	1000 ml

Solución madre Sal A	
NaH ₂ PO ₄	25 gr
Na ₂ HPO ₄	25 gr
Agua destilada	1000 ml
Solución madre Sal B	
MgSO ₄ 7H ₂ O	10 gr
FeSO ₄ 7H ₂ O	0,5 gr
MnSO ₄ 7H ₂ O	2 gr
NaCl	0,5 gr
Agua destilada	1000 ml

Preparación

- Disolver los ingredientes calentando hasta ebullición.
- Mezclar y distribuir en tubos de ensayo.
- Autoclavar a 121 °C, 15 minutos.
- Enfriar los tubos en posición inclinada.

5. BHI sangre agar

BHI agar	37 g
Agua destilada	1000mL
Sangre de carnero	100 mL

Mezclar el polvo de BHI con el agua destilada. Autoclavar a 121 °C durante 15 minutos. Enfriar a 50 °C. Distribuir em tubos com tapa rosca

6. Agar chocolate

Agar base sangre comercial	53 gr
Agua destilada	1000 ml

Autoclavar a 121°C por 15 minutos.

Enfriar, a 80°C agregar 50 ml de sangre de carnero a 950 ml de medio agar base comercial.

Referencias bibliográficas

1. ARENAS R. Micología Médica Ilustrada. Mc Graw Hill. Quinta edición, 2014.
2. BONIFAZ A. Micología Médica Básica. Mc Graw Hill, Cuarta edición, 2012.
3. CANESE A. Nociones de Micología Médica. ISBN 99925-3-3-036-7 Edición del autor, 1998.
4. CASTAÑON OLIVARES LR, Monografía de las Micosis Sistémicas. Laboratorio de Micología Médica. Facultad de Medicina, UNAM.
5. COSTA SIDRIM J, BEZERRA MOREIRA J. Fundamentos Clínicos e laboratoriais da Micología Médica. Editora Guanabara, 1999.
6. DE MELO TEIXEIRA, CORDEIRO THEODORO R, FREIRE MENDEZ DE OLIVEIRA F, CAPELLA MACHADO G, HAHN RC, BAGAGLI E, SAN BLAS G, SOARES FELIPE MS. *Paracoccidioides lutzii* sp, nov.: biological and clinical implications. Medical Mycology Early online, 1-10, 2013.
7. FISCHER F, COOK N. Micología Fundamentos e Diagnóstico. Editora Revinter, 2001.
8. GEGEMBAUER G, MENDES ARAUJO L, PEREIRA EF, MESSIAS RODRIGUES A, MIRANDA PANIAGO AM, HAHN RC, PIRES DE CAMARGO Z. Serology of Paracoccidioidomycosis due *Paracoccidioides lutzii*. PLOS Neglected Tropical Disease, v.8, p. 1-12, 2014.
9. LACAZ C. Tratado de Micología Médica. 9. ed. São Paulo, Sarvier, 2002.
10. LOPEZ CE. Análisis Micológico. UNR Editora, 2014.
11. LOTH EA, CASTRO SV, SILVA JR, GANDRA RF. Occurrence of 102 cases of paracoccidioidomycosis in 18 months in the Itaipu Lake region, Western Paraná. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical v.44 n.5 636-7, 2011.
12. MARTINEZ R. Paracoccidioidomycosis: the dimension of the problema of a neglected disease. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 2010.

13. MINAMI P. Micología. Métodos laboratoriais de Diagnóstico das Micoses. Editora Manole, 2003.
14. MORON C, IVANOV L, VEEA MA, PECOTCHE D. Paracoccidioidomycosis Presentación de la casuística de diez años y revisión de la literatura. Arch. Argent. Dermatol v. 62. p. 92-97, 2012.
15. PEREZ D, OVIEDO J, GILL S. Paracoccidioidomycosis: características clínicas y evolutivas de 94 casos. VII Congreso Paraguayo de Medicina Interna, 2004.
16. PIRES DE CAMARGO Z. Serology of Paracoccidioidomycosis. Mycopathologia, v. 165, p. 289- 302, 2008.
17. RAPPLEYE CA, GOLDMAN WE. Defining virulence genes in the dimorphic fungi. Annual Reviews of Microbiology v. 60, 2006.
18. SANCHEZ L, GALARZA C, CORTEZ F. Infecciones micóticas sistémicas o profundas. Dermatología Perú, 2010.
19. THEODORO RC, TEIXEIRA MM, FELIPE MSS, PADUAN KS, RIBOLLA PM, SAN BLAS G, PAGAGLI E. Genus *Paracoccidioides*: Species recognition and Biogeographic Aspects. PLoS ONE, v.7 n5, 2012.
20. TEIXEIRA MM, THEODORO RC, NINO-VEGA, G. BAGAGLI E, FELIPE MSS. *Paracoccidioides* Species Complex: Ecology, Phylogeny, Sexual Reproduction and Virulence. PLOS Pathogens, 2014.
21. Recomendaciones para la obtención de muestras y cultivos fúngicos. Instructivo. Código IT-MI-27, versión 00. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas. A.N.L.I.S.Dr. Carlos G. Malbrán, Argentina. Elaborado por Nadia Bueno. Revisado por Susana Carnevali, Graciela Davel, 2015.
22. SHIKANAI-YASUDA MA, QUEIROZ TELLES F, PONCIO MENDS R, LOPES COLOMBO A, MORETTI ML y grupo de Consultores de Consenso en Paracoccidioidomycose.
23. VARGAS J, VARGAS R. Paracoccidioidomycosis. Revista de Enfermedades infecciosas y tropicales, v.1 p.49-56, 2009.
24. VERLI FD, MARINHO SA, CORREA DE SOUZA S, ZANCANARO MA, SOARES L. Perfil clínico-epidemiológico dos pacientes portadores de paracoccidioidomicoses no Serviço de Estomatologia do Hospital Sao Lucas da Pontificia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Formulario para remisión de muestras

02

Material impreso con apoyo de



ISBN: 978-99967-36-36-0

