

Ferrán Sánchez Reus

5.1. Fundamento

La infección micótica pulmonar se produce por la inhalación de las esporas fúngicas y su posterior desarrollo en el parénquima pulmonar. Sólo aquellas esporas que sean capaces de alcanzar los sacos alveolares pueden germinar y atravesar su pared para dar lugar a un proceso invasor, siempre y cuando sean capaces de resistir a los mecanismos de defensa del huésped.

El tracto respiratorio funciona como una compleja red para la distribución del aire inspirado, formada por tubos que se van ramificando y disminuyendo de diámetro progresivamente hasta alcanzar los alvéolos, por lo que todo el tracto respiratorio actúa a modo de trampa atrapa-esporas, filtrando y reteniendo la gran mayoría de las partículas que acompañan a los más de 8.000 litros de aire que diariamente movilizan los pulmones. La anatomía propia del tracto respiratorio desempeña un papel muy activo en este mecanismo de defensa inespecífico. En el tracto respiratorio superior se retienen las partículas de gran tamaño ($>10\text{-}20\ \mu\text{m}$), que impactan en la superficie mucosa nasofaríngea; a medida que el aire avanza por el tracto bronquial, disminuye su velocidad, lo que, junto a la reducción del diámetro de las vías aéreas y a las turbulencias que se producen en cada bifurcación bronquial, hace poco probable que las esporas puedan llegar a regiones muy distales sin mantener contacto con la pared bronquial y ser atrapadas en el sistema mucociliar. Existe una zona límite de penetración en función del diámetro de las esporas, de tal modo que sólo las esporas con un diámetro inferior a $3\text{-}4\ \mu\text{m}$ pueden alcanzar los sacos alveolares y depositarse por sedimentación (Figura 5.1).

Al igual que ocurre en otros procesos fúngicos, las micosis pulmonares invasoras pueden clasificarse en dos grandes grupos: las causadas por hongos patógenos primarios y las causadas por hongos oportunistas (Tabla 5.1).

Los hongos patógenos primarios tienen la capacidad de vencer los mecanismos de defensa del huésped, produciendo enfermedad en los individuos sanos y dando lugar a infecciones particularmente graves en los pacientes inmunodeprimidos. Estos hongos se encuentran restringidos a unas áreas geográficas concretas y tienen la capacidad genética de modificar su morfología, metabolismo, estructura y forma de reproducción para adaptarse al ambiente hostil de los tejidos del hospedador, pasando de

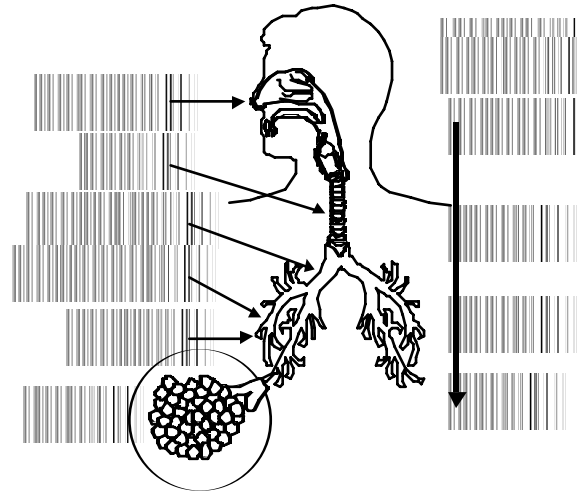


Figura 5.1. Límite de la penetración de las esporas según su diámetro.

hongos filamentosos, cuando crecen en su nicho ecológico natural, a levaduras o esférulas cuando sus esporas son inhaladas y penetran en el organismo; es lo que se ha definido como dimorfismo térmico. Puesto que su implicación como agentes de micosis invasoras pulmonares es indudable, siempre que se aisle cualquiera de estos hongos en un enfermo con manifestaciones clínicas compatibles, el diagnóstico de infección fúngica se considera proba-

Tabla 5.1. Principales agentes de micosis pulmonares invasoras.

Hongos patógenos primarios

Histoplasma capsulatum var. *capsulatum*
Blastomyces dermatitidis
Coccidioides immitis
Paracoccidioides brasiliensis
Penicillium marneffeii
Emmonsia parva
Sporothrix schenckii

Hongos oportunistas

Aspergillus fumigatus
Aspergillus flavus
Pneumocystis carinii
Absidia corymbifera
Rhizopus oryzae (arrhizus)
Scedosporium apiospermum
Cryptococcus neoformans
Fusarium solani
Candida albicans

do.

Por el contrario, los hongos oportunistas tienen un poder patógeno escaso y sólo producen enfermedad en pacientes con alguna enfermedad de base que condicione un defecto del sistema inmunitario o de los mecanismos de defensa inespecíficos. Son hongos ampliamente distribuidos por la naturaleza, siendo común el encontrar sus esporas en el aire o el suelo de cualquier latitud. La gran ubicui-

dad de estos hongos, dificulta el diagnóstico microbiológico de las micosis invasoras oportunistas del tracto respiratorio inferior, siendo difícil diferenciar entre un verdadero proceso invasor, una colonización o una simple contaminación. Los criterios microbiológicos sólo proporcionan un diagnóstico de probabilidad o posibilidad de infección fúngica invasora, requiriéndose para diagnóstico de seguridad la demostración histopatológica del hongo invadiendo el parénquima pulmonar (Tabla 5.2).

Tabla 5.2. Criterios diagnósticos de infección fúngica invasora del tracto respiratorio inferior (adaptada de <http://www.aspergillus.man.ac.uk>).

INFECCIÓN FÚNGICA PROBADA

- Histo/citopatología mostrando hifas, esférulas o levaduras y/o pseudohifas en muestra de parénquima pulmonar obtenida por aspiración con aguja o biopsia, con evidencia de lesión tisular microscópica o inequívocamente por imagen, o cultivo positivo con evidencia clínica o radiológica de infección.
- Cultivo de muestra respiratoria positivo para *Histoplasma*, *Blastomyces*, *Coccidioides* o *Paracoccidioides* en paciente sintomático u observación histopatológica de elementos morfológicamente compatibles con serología positiva.
- Observación histopatológica de elementos morfológicamente compatibles con *P. carinii* en lavado broncoalveolar de paciente con sida y clínica compatible.

INFECCIÓN FÚNGICA PROBABLE

- Debe presentar al menos un factor predisponente, acompañado de un hallazgo microbiológico y un criterio clínico mayor (o dos menores).

INFECCIÓN FÚNGICA POSIBLE

- Debe presentar al menos un factor predisponente, acompañado de un hallazgo microbiológico o un criterio clínico mayor (o dos menores).

Factores predisponentes:

1. Neutropenia $<500/\text{mm}^3$ durante más de 10 días.
2. Fiebre persistente >96 h que no responde a antibióticos de amplio espectro.
3. Temperatura > 38 °C ó < 36 °C con alguna de las siguientes condiciones:
 - neutropenia > 10 días en los 30 días previos.
 - empleo de inmunosupresores en los últimos 30 días.
 - antecedentes de infección fúngica invasora.
4. Signos y síntomas de enfermedad de injerto contra huésped.
5. Uso de corticosteroides > 3 semanas.

Criterios microbiológicos:

1. Cultivo positivo para *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., mucorales, *Scedosporium* spp. o *C. neoformans* en esputo o LBA.
2. Examen microscópico directo positivo para hongos filamentosos o criptococo en esputo o LBA.
3. Antígeno de *Aspergillus* positivo en 2 muestras de LBA o suero.
4. Lesión pulmonar con cultivos bacteriológicos de cualquier tipo de muestra (sangre, esputo, LBA,...) negativos para los posibles agentes de infección del tracto respiratorio inferior.

Criterios clínicos mayores:

- Cualquier infiltrado nuevo con signo del halo, menisco aéreo o cavitación rodeada de un área de consolidación.

Criterios clínicos menores:

1. Síntomas del tracto respiratorio inferior (tos, hemoptisis, disnea,...).
2. Signos de derrame pleural.
3. Cualquier nuevo infiltrado que no cumpla el criterio mayor.

5.2. Recogida, transporte y conservación de muestras respiratorias

Como cualquier enfermedad infecciosa, el diagnóstico de las micosis se inicia con la sospecha clínica que permite indicar una serie de pruebas complementarias para llegar al diagnóstico final. El diagnóstico definitivo lo facilita el laboratorio de Microbiología aislando e identificando un posible agente causal en un producto patológico y el de Anatomía Patológica demostrando, si es preciso, la invasión tisular fúngica. 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.

5.2.1. Tipo de muestras clínicas y técnicas de recogida

Exudado y lavado nasofaríngeo

Mediante hisopo de algodón o catéter, aspirar el moco por vía per o retranasal (para facilitar la aspiración puede requerirse la instilación previa de solución salina). Hay que tener presente que la muestra obtenida pertenece al tracto respiratorio superior, por lo que en caso de ser positiva, tan sólo será indicadora de colonización de las vías aéreas superiores.

Espujo por expectoración espontánea

La muestra debe obtenerse tras una expectoración profunda preferentemente matinal, mediante tos o fisioterapia respiratoria (se recomienda el lavado previo de la boca con agua destilada estéril o solución salina y evitar que la expectoración se contamine con saliva o secreciones postnasales). Aunque el esputo es una de las muestras más fáciles de recoger y con menos riesgo para el paciente, su empleo indiscriminado en el diagnóstico de las infecciones pulmonares no suele ser útil, pues los microorganismos presentes en la muestra no necesariamente se correlacionan con los del tracto respiratorio inferior. 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 (CE) pre-

sentes en la muestra (> 25 PMN y < 10 CE / campo, $\times 100$). Sin embargo, el esputo tiene valor diagnóstico *per se* en las micosis sistémicas por hongos dimórficos patógenos primarios (*Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatitidis*, *Paracoccidioides brasiliensis* y *Penicillium marneffei*). Aunque recomendado en ocasiones, el cultivo cuantitativo del esputo no ha demostrado su utilidad para diferenciar entre infección y colonización en las micosis oportunistas.

Espujo inducido

El esputo inducido se obtiene tras hacer inhalar al paciente, durante unos 15-20 min, nebulizaciones de 20-30 ml de solución salina hipertónica estéril, obtenidas mediante un nebulizador ultrasónico. Su valor diagnóstico equivale a la expectoración espontánea, aunque con experiencia y una meticulosa técnica de recogida se puede minimizar la contaminación nasobucal. Se recomienda como alternativa al esputo en caso de que no sea posible una expectoración espontánea, habiendo sido muy preconizado su empleo en el diagnóstico de la neumonía por *Pneumocystis carinii*, aunque debe tenerse presente que su sensibilidad es inferior a la del lavado broncoalveolar (LBA).

Aspirado tráqueal (AT)

Se introduce una sonda de aspiración a través del tubo endotraqueal o de la traqueotomía y se succionan las secreciones respiratorias. La instilación de una pequeña cantidad de solución salina estéril (≈ 5 ml) puede facilitar la obtención de las muestras muy viscosas. Puede considerarse la alternativa al esputo en el paciente intubado y su valor diagnóstico es muy similar.

Lavado bronquial o broncoaspirado (BAS)

Mediante fibrobroncoscopia se realiza una aspiración de las secreciones del árbol bronquial, generalmente tras la instilación de 5-10 ml de suero fisiológico. No hay que olvidar que la muestra procede del árbol bronquial superior y no es representativa del territorio alveolar ni bronquiolar. En el enfermo intubado tiene el mismo valor que el AT y, en el no intubado, puede estar contaminada por secreciones del tracto respiratorio superior, siendo su valor diagnóstico similar al del esputo. Sólo está indicado cuando el volumen de líquido recuperado en el LBA es insuficiente y existe la sospecha de una infección fúngica pulmonar por patógenos primarios.

Cepillado bronquial

A través del fibrobroncoscopio se introduce un cepillo relativamente rígido que permite obtener muestras con una elevada proporción de células descamadas de las paredes del árbol bronquial. Hay que tener presente que la muestra no está protegida y puede contaminarse al pasar por el canal del broncoscopio. Se emplea, sobre todo, para el diagnóstico citológico de enfermedades neoplásicas y puede ser de utilidad en el diagnóstico de procesos bronco-neumónicos víricos (al poderse evidenciar cambios citopáticos o cuerpos de inclusión) pero no es una muestra recomendable para el estudio de las infecciones fúngicas.

Lavado broncoalveolar (LBA) convencional

Para realizar la toma de la muestra el fibrobroncoscopio debe enclavarse en el árbol bronquial e instilar » 120 ml solución salina que posteriormente será recuperada (10-100 ml). La muestra representa las secreciones presentes en aproximadamente un millón de alveolos y sus correspondientes bronquiolos (» 1% de la superficie pulmonar), estimándose que en el líquido recuperado se encuentran diluidas 1 ml de secreciones. El fluido recuperado se considera la muestra más adecuada y sensible para el diagnóstico de las infecciones respiratorias causadas por hongos dimórficos patógenos primarios y para el diagnóstico de la neumonía por *P. carinii*. En enfermos inmunodeprimidos, es la técnica de elección para el diagnóstico de presunción de las micosis invasoras oportunistas del tracto respiratorio inferior, con valores predictivos positivos que pueden ser superiores al 80%, según el tipo de inmunosupresión y la micosis de la que se trate. Al igual que en el esputo, el cultivo cuantificado del LBA tampoco puede diferenciar entre infección fúngica y colonización, pero constituye una de las muestras más rentables para el diagnóstico de la aspergilosis pulmonar.

LBA protegido

Para la toma de muestra se procede de igual manera que en el LBA, pero la introducción del broncoscopio se hace a través de la luz de un catéter con un globo final, que previamente se ha introducido e inflado con el fin de proteger la muestra de una posible contaminación por flora de las vías altas. Es de gran valor diagnóstico en las neumonías bacterianas, especialmente en pacientes sometidos a ventilación mecánica, pero en el caso de las infecciones fúngicas tiene un valor equiparable al del LBA convencional.

Mini-LBA

Se introduce un catéter telescópico en el

árbol bronquial y se hace avanzar hasta encontrar resistencia, seguidamente se hace avanzar el catéter interno y se instilan con una jeringa unos 25 ml de suero fisiológico estéril. El líquido recuperado y la punta del catéter interno se emplean para los estudios microbiológicos. La técnica presenta la ventaja de no requerir el empleo de fibrobroncoscopio y se plantea como una alternativa a éste en el diagnóstico de la neumonía asociada a ventilación mecánica. En la actualidad, no existen experiencias que permitan recomendarla para el diagnóstico de la infecciones fúngicas pulmonares.

Cepillado protegido

La toma de muestra requiere dos catéteres telescopados, uno externo que lleva un tapón en la punta y otro interno a través del cual se introduce el cepillo. A través del canal del fibrobroncoscopio se introduce el catéter externo y, una vez se ha alcanzado la zona deseada, con el catéter interno se expulsa el tapón del catéter externo y se hace avanzar el cepillo hasta recoger la muestra. Mediante esta técnica, se recogen en el cepillo 0,001-0,01 ml de las secreciones presentes en un único bronquiolo, que, para su transporte, serán diluidas en 1 ml de solución salina. Su utilidad está limitada al diagnóstico de las neumonías bacterianas (empleando criterios cuantitativos) y no es una muestra útil para el diagnóstico de las infecciones fúngicas debido a su baja sensibilidad.

Biopsia transbronquial

A través del broncoscopio se introducen unas pinzas que, mediante visión fluoroscópica, permiten la obtención de parénquima pulmonar peribronquial o incluso alveolar. Está especialmente indicada para estudios histológicos. Aunque el pequeño tamaño de las biopsias obtenidas merman la sensibilidad de la muestra, debe tenerse presente su gran especificidad y valor en el diagnóstico de seguridad de las micosis invasoras. Es una muestra de gran rentabilidad para el diagnóstico de la neumonía por *P. carinii* en el paciente con sida, pero la elevada iatrogenia de la técnica (neumotórax o hemoptisis en un 20% de los casos) la relegan como última alternativa diagnóstica.

Punción-aspiración transtraqueal

A nivel de la membrana cricotiroidea se punciona la tráquea y a través de la aguja se introduce una pequeña sonda por la que se aspiran las secreciones. Este procedimiento evita, en gran parte, la contaminación por flora orofaríngea, aunque en la práctica tiene una sensibilidad y especificidad muy

similar a la del esputo. No es una exploración carente de complicaciones y debe limitarse su empleo a casos muy seleccionados. En la actualidad es una técnica poco empleada y ha sido sustituida por otras con mejor rendimiento diagnóstico y menos complicaciones.

Punción pulmonar percutánea o transtorácica

Empleando agujas ultrafinas y control radiológico o ecográfico, se punciona la cavidad torácica y se recoge el exudado de las lesiones pulmonares por aspiración. Aunque es una muestra con una especificidad muy alta, tiene una baja sensibilidad y la técnica para su obtención no está libre de complicaciones (neumotórax, hemorragia) y contraindicaciones, por lo que su empleo suele limitarse al estudio de infiltrados pulmonares densos de localización periférica, con gran componente de cavitación y/o consolidación, como puede ser el caso de algunas neumonías fúngicas.

Biopsia pulmonar percutánea

Mediante un trocar se punciona la cavidad torácica y se alcanza el pulmón, pudiendo obtenerse una pequeña porción de tejido de determinados focos pulmonares. El material que se obtiene es muy limitado y su rentabilidad en el diagnóstico microbiológico de las neumonías es relativamente baja. Además, es un material muy desestructurado y no es útil para estudios histopatológicos. En realidad, se trata de una técnica en desuso, pues sus complicaciones son muy similares a las de la biopsia pulmonar abierta y su utilidad mucho más pobre.

Biopsia pulmonar por toracotomía

La toma de muestra requiere anestesia general e intubación. Mediante toracotomía se aborda directamente el pulmón, pudiendo inspeccionarlo y tomar muestras biópsicas de las alteraciones observadas. Permite la obtención de un gran volumen de material que puede emplearse tanto para estudios microbiológicos como histopatológicos, siendo de gran utilidad en el diagnóstico de las micosis pulmonares invasoras por hongos oportunistas, pues permite el aislamiento y la demostración histológica de la invasión tisular. Su máxima rentabilidad se alcanza en el diagnóstico de lesiones localizadas (nodulares, tumorales o cavitadas). Pero se trata de una técnica muy agresiva que puede presentar complicaciones graves. Su indicación estaría limitada al diagnóstico de casos muy graves en pacientes con mala evolución clínica, que no hubie-

sen podido ser diagnosticados por otras técnicas menos invasoras.

Líquido pleural

A través de una punción transparietal, mediante una aguja de punción pleural, se extraen varios mililitros de líquido pleural. El empiema suele presentarse como complicación de una neumonía bacteriana o tuberculosa, pero no debe descartarse la implicación de un hongo que, en procesos neumónicos crónicos, puede invadir la cavidad pleural o introducirse en ella a través de un neumotórax o una fistula broncopleural. No hay que olvidar que la práctica de una toracocentesis puede presentar ciertas complicaciones, especialmente en forma de neumotórax o hemotórax

Biopsia pleural

A través de una pequeña incisión en la pared torácica se introduce un trocar hasta perforar la hoja parietal de la pleura de donde se toman varias muestras biópsicas. La muestra suele emplearse para estudio histológico o para el diagnóstico de una posible paquipleruitis tuberculosa, siendo habitualmente poco útil en Micología. La aparición de neumotórax o hemotórax iatrogénico puede complicar su obtención.

5.2.2. Transporte y conservación de muestras

Las muestras respiratorias deben trasladarse al laboratorio en contenedores estériles, perfectamente cerrados y en un plazo máximo de 2 h desde su recogida. Los esputos, BAS y LBA se recogen en un frasco de boca ancha con cierre hermético, preferiblemente de rosca. Los productos de aspiración se depositan en un tubo estéril con tapón de rosca. Las secreciones recogidas por cepillado se transportan, en tubos con tapón de rosca, diluidas en 1 ml de solución salina. Las piezas biópsicas deben dividirse en dos fragmentos: uno se introduce en un frasco con formol al 10% y se envía para estudio anatómico, y el otro, destinado al laboratorio de Micología, se introduce en un frasco o tubo con suero fisiológico para evitar su desecación.

Las muestras deben procesarse e inocularse lo más rápidamente posible, ya que el retraso en la

siembra reduce el número de células viables de *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatitidis*, *Aspergillus fumigatus* y algunas especies de mucorales. Si el procesamiento de la muestra va a demorarse durante varias horas, es preferible conservarla a 4 °C para reducir el sobrecrecimiento bacteriano, especialmente en muestras muy contaminadas como los esputos.

5.2.3. Recepción de las muestras en el laboratorio

Es conveniente anotar el aspecto de la muestra, la proporción de saliva que posee, su color, la presencia o ausencia de pus, sangre o moco, así como cualquier otra característica que se considere relevante. En las muestras recogidas por fibrobroncoscopio, debe anotarse el volumen de solución salina recuperado en el LBA así como el volumen en el que se encuentran diluidas las secreciones obtenidas mediante cepillado protegido.

torias no debe sustituir al cultivo, pero es una técnica rápida que puede proporcionar al clínico una información muy útil y, en ocasiones, puede incluso llegar a ser diagnóstica. Así, la observación de quistes o trofozoitos de *P. carinii* en una muestra de LBA, o la visualización de pequeñas levaduras en el interior de células histiocitarias, son hallazgos patognomónicos de neumocistosis e histoplasmosis, respectivamente. Pero también, la presencia de hifas no tabicadas en un paciente en cetoacidosis diabética, puede ser de gran valor para iniciar el tratamiento de una posible mucormicosis; así como la presencia de hifas tabicadas en una muestra respiratoria de un paciente neutropénico, puede ser suficiente para orientar una posible aspergilosis pulmonar invasora.

Por otro lado, la observación de elementos fúngicos característicos en el examen directo (grandes levaduras o levaduras intracelulares) puede alertar sobre la necesidad de emplear técnicas de cultivo específicas o tiempos de incubación más prolongados.

A continuación se hace referencia a una selección de técnicas de examen directo que pueden aplicarse a muestras procedentes del tracto respiratorio inferior, indicando su utilidad y principales características (Tablas 5.3 y 5.4) pero sin entrar en sus detalles metodológicos (Capítulo 14).

5.3. Examen directo de muestras respiratorias

El examen directo de las muestras respira-

5.3.1. Técnicas de examen directo sin colorantes

Tabla 5.3. Indicación de las principales técnicas de examen directo, en función del tipo de muestra del tracto respiratorio inferior.

	Esputo Aspirado traqueal Broncoaspirado	Lavado broncoalveolar	Biopsia bronquial Biopsia pulmonar
Digestión KOH +/- blanco calcoflúor	Búsqueda elementos fúngicos	Búsqueda elementos fúngicos	Búsqueda elementos fúngicos Reservar para histopatología
Tinta china		Sospecha criptococosis	
Tinción de Gram	Evaluar calidad de las muestras	Evaluar calidad de las muestras	
Diff-Quick/Giemsa	Sospecha histoplasmosis	Sospecha neumocistosis Sospecha histoplasmosis Sida (<200 CD4)	Sospecha histoplasmosis
Hematoxilina eosina			Evidenciar reacción tisular
Gomori-Grocott		Sospecha neumocistosis (Diff-Quick negativa)	Búsqueda elementos fúngicos
Tinción de PAS			Búsqueda elementos fúngicos
Anticuerpos marcados		Sospecha neumocistosis (Diff-Quick, Grocott negativas)	Identificación elementos fúngicos

Tabla 5.4. Características del examen directo de los principales agentes de micosis invasoras pulmonares.

	Descripción
<i>Histoplasma capsulatum</i>	Tinción de Diff-Quick: pequeñas levaduras ovaladas (1-4 µm) de un intenso color púrpura, en el interior de células macrofágicas. Es característico observar las levaduras rodeadas de un halo claro o falsa cápsula.
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	Levaduras redondeadas u ovals, extremadamente polimorfas (5-60 µm), suelen presentar gemaciones múltiples de base estrecha, siendo característica la observación de células multigemantes en rueda de timón.
<i>Coccidioides immitis</i>	Grandes esférulas de 10 a 80 µm, de pared fina y con numerosas endosporas de 2-5 µm en su interior.
<i>Blastomyces dermatitidis</i>	Levaduras grandes (8-15 µm), redondeadas o ligeramente ovaladas, de pared lisa y gruesa y gemación característicamente única, de base ancha y tamaño muy similar al de la célula madre.
<i>Penicillium marneffei</i>	Pequeñas levaduras ovals o elípticas (3-8 µm) en el interior de histiocitos. Es característica la observación de un septo central.
<i>Pneumocystis carinii</i>	Diff-Quick: material amorfo, mal definido de color púrpura y apariencia espumosa, abundantes trofozoitos con el núcleo teñido de rojo y el citoplasma de azul. No tiñe los quistes. Gomori-Grocott: quistes oscuros, redondos u ovalados (4-7 µm), muchas veces colapsados en forma de doble paréntesis, generalmente agrupados y envueltos por material amorfo. No tiñe los trofozoitos.
<i>Aspergillus</i>	Hifas hialinas de un diámetro inferior a 5 µm, de bordes externos paralelos, separadas por tabiques y ramificaciones dicotómicas, característicamente en ángulo agudo (45°). Indistinguible de otros hongos hialinos.
Mucorales	Hifas muy irregulares, con bordes externos no paralelos y diámetro variable (entre 5 y 25 µm), no suelen presentar septos y las ramificaciones son generalmente en ángulo recto (no dicotómicas).
<i>Cryptococcus neoformans</i>	Levaduras esféricas (5-7 µm), no gemadas o con una única gemación de base estrecha. Tinta china: pone en evidencia la cápsula, que aparece como un halo claro y bien delimitado, de 2 a 10 µm, que rodea completamente la célula fúngica, la cual destaca por la refringencia de su pared.
<i>Candida</i>	Levaduras redondas u ovals (4-6 µm) de gemación multilateral con pseudofilamentos y cadenas de levaduras gemantes.

©2001 Revista Iberoamericana de Micología - ISBN: 84-607-3050-6

Examen en fresco / examen en fresco tras digestión con KOH

El examen directo de las muestras respiratorias sin tinción, suele tener una rentabilidad muy baja si no se procede a una concentración previa por centrifugación, pero en este caso también se concentran un gran número de células y otros artefactos que hacen muy difícil la observación microscópica, siendo prácticamente indispensable clarificar las muestras con la adición de unas gotas de KOH al 15-20% (Capítulo 14).

Las muestras de LBA son suficientemente líquidas y pueden centrifugarse directamente, mientras que los esputos, AT y BAS deben someterse a un tratamiento de fluidificación previo con un agente mucolítico (N-acetil-cisteína al 0,5% o Sputolysin, v/v a temperatura ambiente hasta la fluidificación de la muestra). Las muestras biópsicas deben fragmentarse en pequeños trozos para facilitar la acción del KOH.

La observación de levaduras de

Blastomyces dermatitidis en una muestra respiratoria es diagnóstica de blastomicosis pulmonar. Se trata de levaduras grandes (8-15 µm de diámetro), redondeadas o ligeramente ovaladas, de pared lisa y gruesa y gemación característicamente única, de base ancha y tamaño muy similar al de la célula madre (Figura 2.19). Las levaduras de *Paracoccidioides brasiliensis* son redondeadas u ovals, y extremadamente polimorfas en cuanto a tamaño, y suelen presentar gemaciones múltiples de base estrecha siendo característica la observación de células multigemantes en rueda de timón (Figura 2.19). La forma parasitaria de *Coccidioides immitis* puede ser fácilmente reconocible cuando en las muestras respiratorias se observan grandes esférulas de 10 a 80 µm, de pared fina y con numerosas endosporas de 2-5 µm en su interior (Figura 2.19 y Figura 14.4).

En la aspergilosis pulmonar, el examen directo de las muestras respiratorias puede evidenciar la presencia de hifas hialinas de un diámetro inferior a 5 µm, de bordes externos paralelos, sepa-

radas por tabiques y ramificaciones dicotómicas, característicamente en ángulo agudo. Debe tenerse en cuenta que las hifas de *Aspergillus* en una muestra clínica son indistinguibles de las de otros hongos filamentosos como *Scedosporium* o *Fusarium* que también pueden ser agentes de micosis pulmonar oportunista. Las hifas de los hongos filamentosos inferiores (mucorales) son muy irregulares, con bordes externos no paralelos y diámetro variable (5-25 μm), no suelen presentar septos, o son muy escasos, y las ramificaciones son en ángulo recto no dicotómicas.

Examen con tinta china

Está especialmente indicado en muestras de LBA en las que se plantea el diagnóstico diferencial de criptococosis pulmonar. Mediante el examen con tinta china se pone en evidencia la cápsula de *C. neoformans* como un halo claro y bien delimitado, de 2 a 10 μm , que rodea completamente la célula fúngica (Figura 2.20), la cual destaca por la refringencia de su pared (Capítulo 14).

5.3.2. Técnicas de examen directo mediante tinciones

Tinción de Gram

Es de utilidad para evaluar la calidad de las muestras respiratorias, lo que en el caso de las infecciones fúngicas oportunistas debería ser un paso limitante para continuar con el procesamiento. Para ello las preparaciones deben evaluarse a bajo aumento (x100), considerándose que una muestra rica en leucocitos polimorfonucleares, histiocitos y células del epitelio del árbol traqueobronquial es representativa de una infección respiratoria de vías bajas, mientras que la presencia de células epiteliales orofaríngeas es un claro índice de contaminación oral (Capítulo 14).

Tinción de Giemsa / Diff-Quick

El empleo de estas tinciones es obligado en muestras de LBA de enfermos con sida, pues permite el diagnóstico rápido de la neumocistosis con una muy aceptable sensibilidad (70-80%). Las preparaciones deben observarse inicialmente a bajos aumentos (x100), buscando un material amorfo, mal definido y de apariencia espumosa que se tiñe de color púrpura con la tinción de Diff-Quick y en donde se encuentran englobados los quistes y trofo-

zoitos de *P. carinii*. A grandes aumentos (x1.000) este material se observa formado por la superposición de múltiples círculos no teñidos, que corresponden a los quistes, y abundantes trofozoitos, que destacan por presentar el núcleo teñido de rojo y el citoplasma de azul (Capítulo 14).

Tinciones argénticas

La tinción de Gomori-Grocott es muy útil en el diagnóstico de la neumocistosis y se considera como método de referencia. Mediante la misma, los quistes de *P. carinii* (pero no los trofozoitos) se tiñen de oscuro, observándose como estructuras redondas u ovaladas, de unos 4-7 μm , muchas veces colapsadas en forma de doble paréntesis, generalmente agrupadas y envueltas por material amorfo (Capítulo 14).

Estas tinciones también son de elección cuando interesa descartar la presencia de hongos en nódulos pulmonares, especialmente si estos presentan amplias áreas de caseosis o están calcificados, pues la acción combinada del ácido crómico que actúa como disolvente y la impregnación argéntica permiten la visualización de elementos prácticamente imposibles de distinguir con otras tinciones.

5.3.3. Técnicas de examen directo con fluorocromos

Tinción con blanco de calcoflúor

Esta técnica es aplicable a cualquier tipo de muestra respiratoria y permite la identificación morfológica de las estructuras fúngicas con las mismas consideraciones que las ya mencionadas en el examen en fresco (Capítulo 14).

5.3.4. Técnicas inmunológicas de examen directo

En la neumocistosis, el empleo de anticuerpos monoclonales marcados con fluoresceína, parece haber demostrado una sensibilidad mucho más alta que cualquier otra técnica de examen directo, si bien es cierto que algunos de los casos diagnósticos por fluorescencia, y no por otras técnicas, mejo-

raron clínicamente sin tratamiento específico (Capítulo 14).

El empleo de anticuerpos marcados puede facilitar la identificación de elementos fúngicos, pudiendo ser especialmente útil en cortes histológicos. Pero el arsenal disponible de anticuerpos marcados es muy escaso y, salvo contadas excepciones, sólo están disponibles en algunos centros de referencia. En enero de 2001, la *Division of Bacterial and Mycotic Diseases* del CDC ofertaba la posibilidad de identificar por técnicas inmunohistológicas *C. immitis*, *C. neoformans*, *Candida* spp., *H. capsulatum*, *B. dermatitidis* y *Aspergillus* spp., pero alertaba que los reactivos para la identificación de los tres últimos estaban aún en fase de evaluación.

5.4. Cultivo de muestras respiratorias: siembra, incubación e interpretación

Al igual que en otros procesos infecciosos, el cultivo de las muestras respiratorias es un paso esencial y necesario en el diagnóstico de las infecciones fúngicas del tracto respiratorio inferior. Su sensibilidad, salvo excepciones y siempre que se disponga de la muestra adecuada y el procesamiento de la misma sea correcto, acostumbra a ser más alta que la de cualquier otra técnica diagnóstica y además permite el aislamiento del agente causal, lo que es indispensable para una correcta identificación de la especie implicada y, en caso de estar indicados, hace posible la práctica de estudios de sensibilidad o epidemiológicos.

El procesamiento y cultivo de las muestras respiratorias debe realizarse tan pronto como sea posible después de la recogida de la muestra; en caso contrario, las muestras deben conservarse en nevera a 4 °C. La tasa de recuperaciones de posibles hongos patógenos siempre es mayor en las muestras recién recogidas que en aquellas conservadas en nevera o congeladas durante periodos de tiempo más o menos prolongados. Así, el índice de viabilidad de *H. capsulatum* y otros hongos en muestras de esputo se reduce considerablemente después de mantener las muestras 24 h a temperatura ambiente, en nevera o congeladas.

Si bien es cierto que siempre que se manipula un cultivo micológico deben tomarse las medidas de protección personal adecuadas, éstas deben extremarse cuando se trabaja con cultivos procedentes de muestras del tracto respiratorio inferior, empleando, a ser posible, cabinas para nivel 3 de bioseguridad (Capítulo 17), pues la gran mayoría de hongos agentes de micosis invasoras del tracto respiratorio inferior se adquieren por inhalación, existiendo la posibilidad de que el proceso infeccioso esté causado por un hongo patógeno primario o que

estén implicados otros agentes infecciosos potencialmente patógenos, como las micobacterias.

5.4.1. Medios de aislamiento

Para la siembra de las muestras respiratorias se recomienda emplear medios vertidos en tubos de 25 x 150 mm y solidificados en forma de agar inclinado, en lugar de medios en placas de Petri, que si bien facilitan el agotamiento de la muestra se deshidratan con mayor rapidez y pueden contaminarse fácilmente durante la incubación. El empleo de medios en tubo tiene el inconveniente de dificultar la siembra y el agotamiento de la muestra, pero consigue mantener las condiciones de humedad del medio durante más tiempo y minimiza la posibilidad de propagación de las esporas. Además, su boca estrecha hace más difícil, aunque no imposible, la salida de las esporas, reduciendo la posibilidad de accidentes por inhalación de esporas y evitando la contaminación ambiental (Capítulo 17).

Medio de Sabouraud + cloranfenicol/gentamicina

Este medio (SDA) se recomienda como medio estándar para la siembra de todas las muestras respiratorias, aunque siempre debe ser suplementado con alguna solución antibiótica: cloranfenicol (0,5 g/l), gentamicina (0,05 g/l) o ambos, simultáneamente (Capítulo 3).

Medio de Sabouraud + cloranfenicol + cicloheximida

La adición de cicloheximida (0,5 g/l) al medio base de Sabouraud con antibióticos, es útil para evitar el crecimiento bacteriano y prevenir el sobrecrecimiento de hongos contaminantes, pero inhibe un gran número de hongos oportunistas del tracto respiratorio inferior, como la mayoría de especies de *Aspergillus*, mucorales, *Fusarium*, *Scedosporium*, *C. neoformans* y algunas especies de *Candida*, por lo que debe reservarse para cuando se necesite recuperar algún hongo patógeno primario que, por su crecimiento más lento, podría ser inhibido por el sobrecrecimiento de otros hongos filamentosos. No es recomendable para la siembra sistemática de todas las muestras respiratorias (Capítulo 3).

Agar *Guizotia abyssinica* + cloranfenicol/gentamicina

El empleo de un medio a partir de alpiste

(*Guizotia abyssinica*), suplementado con antibióticos, puede ser de gran utilidad para el aislamiento de *C. neoformans* en muestras respiratorias. En este medio, gracias a la acción de una fenoloxidasas que hidroliza la cafeína y produce melanina, las colonias de *C. neoformans* adquieren una coloración marrón que las hace fácilmente reconocibles y que, empleando medios de cultivo convencionales, podrían pasar desapercibidas entre otras levaduras, por lo que su empleo es muy recomendable si existe una sospecha clínica de criptococosis pulmonar (Capítulo 3).

Agar cerebro-corazón + cloranfenicol / gentamicina

Los medios basados en caldos de cerebro y corazón son medios ricos que pueden suplementarse con un 10% de sangre de carnero y soluciones antibióticas, siendo de gran utilidad para el aislamiento de hongos patógenos primarios en muestras respiratorias (Capítulo 3).

5.4.2. Siembra de las muestras

La calidad de la muestra clínica condiciona el diagnóstico de cualquier proceso infeccioso y, en el caso de las infecciones fúngicas pulmonares oportunistas, debería condicionar el posterior procesamiento de la misma. Todas las muestras biópsicas deben cultivarse, pues los cultivos de estas reflejan la presencia o ausencia de hongos en el parénquima pulmonar. Las secreciones respiratorias son, en un principio, un producto estéril procedente de los bronquios; por lo tanto, la presencia en estas de elementos fúngicos traduce una infección o colonización del tracto respiratorio inferior. Sin embargo, la contaminación de la muestra con secreciones procedentes del tracto respiratorio superior condiciona la especificidad de los resultados por lo que, en lo posible y antes de proceder al cultivo, debería evaluarse la calidad de una muestra en toda secreción respiratoria, solicitando una nueva siempre que esta no fuese suficientemente aceptable.

Como norma general, se recomienda sembrar unos 0,5 ml de muestra por tubo de cultivo y emplear varios tubos de SDAC para cada muestra (y uno de Sabouraud con cicloheximida y antibióticos si existe la sospecha de una micosis pulmonar por hongos dimórficos). Las muestras deben inocularse en toda la superficie del medio de cultivo, y, para evitar que se acumulen en el fondo del tubo, es conveniente que estos se incuben las primeras

24 h en posición horizontal.

Espuito, AT y BAS

Las porciones del esputo o aspirados claramente purulentas, hemáticas o caseificadas pueden inocularse directamente sobre el medio de cultivo. Las muestras fluidas deben concentrarse por centrifugación (1.500 g durante 10 min) desechando el sobrenadante (o reservándolo para otros estudios) y sembrando el sedimento resuspendido en un volumen conocido de solución salina. Las muestras muy viscosas deben fluidificarse antes de la siembra empleando algún agente mucolítico (N-acetil-cisteína, mezclada con un mismo volumen de muestra y dejándola actuar a temperatura ambiente hasta que se consiga la fluidificación). Posteriormente la muestra se concentra por centrifugación.

LBA

Las muestras de LBA se tratan de igual modo que los esputos, sembrando directamente las porciones purulentas o hemáticas y concentrando el resto por centrifugación; aunque en este caso es recomendable registrar el volumen inicial de la muestra y el volumen en el que se resuspende, para que, sembrando una cantidad conocida de muestra, los resultados se puedan expresar cuantitativamente (UFC/ml), que, si bien no permiten confirmar una infección fúngica, sí dan una idea bastante aproximada de la cantidad de elementos fúngicos presentes en la muestra.

Biopsias

Antes de su siembra, las biopsias deben fragmentarse en pequeños pedazos de 0,5-1 mm con pinzas y bistrú o triturarse con arena estéril en un mortero, pero sin olvidar que la manipulación excesiva de la muestra puede reducir la viabilidad de los elementos fúngicos, especialmente de los mucorales, en los que la rotura de su estructura coenocítica comporta la pérdida de la viabilidad del hongo.

5.4.3. Condiciones de incubación

Transcurridas las primeras 24 h después de la siembra, los tubos se incubarán en posición vertical, en atmósfera aerobia y húmeda (40-50%) y a temperatura constante (28-30 °C). Si los tubos tienen tapón de rosca, debe aflojarse para asegurar el aporte necesario de oxígeno a la muestra. El empleo

de diferentes temperaturas de incubación (30 y 37 °C) es útil para diferenciar entre hongos contaminantes y patógenos, pero carece de valor en el primario aislamiento de hongos dimórficos, pues la forma filamentosa crece más lentamente y la forma levaduriforme es indistinguible macroscópicamente de la de otras levaduras. A 30 °C crecen todos los hongos de la muestra y a 37 °C sólo aquellos capaces de dar lugar a un proceso invasor.

Las muestras deben incubarse un mínimo de 4 semanas, que podrían alargarse hasta 12 en caso de que existiese una sospecha clínica de histoplasmosis y los cultivos fuesen negativos. Nunca debe darse por finalizado un estudio ni desecharse un cultivo antes de las 4 semanas, ni tan siquiera cuando ya se ha aislado un posible agente patógeno, pues podría ser que se tratase de un contaminante o una simple colonización, y que las colonias del verdadero agente causal todavía no fuesen evidentes.

5.4.4. Lectura e interpretación

de los cultivos

Durante la primera semana de incubación se recomienda realizar una lectura diaria de los medios de cultivo, especialmente si el examen directo ha sido positivo. Transcurrido este periodo de tiempo, la lectura puede realizarse 1 ó 2 veces por semana (según la disponibilidad), hasta completar el tiempo de incubación establecido.

Una vez detectado el crecimiento macroscópico de un hongo debe procederse a su identificación (Capítulos 11 y 13), teniendo siempre en cuenta que los criterios microbiológicos, por sí solos, no suelen ser suficientes para establecer el diagnóstico de infección fúngica invasora (Tabla 5.2), por lo que es necesario asociarlos a un contexto clínico determinado. De igual modo, la interpretación de los cultivos debe hacerse en función del hongo aislado y del tipo de muestra respiratoria evaluada, en el contexto de un paciente concreto con una clínica y unos factores predisponentes determinados.

Informar al clínico del aislamiento de hon-

Consejos prácticos para evaluar un cultivo de muestras respiratorias y emitir un informe:

- No todos los hongos tienen capacidad para producir una micosis invasora del tracto respiratorio inferior, por lo que hay que evaluar especialmente los aislamientos de aquellos hongos que con mayor frecuencia se han visto implicados en procesos clínicos (Tabla 5.1).
- El aislamiento de *A. fumigatus* o *A. flavus* en una muestra respiratoria de un paciente leucémico y/o neutropénico tiene un alto valor predictivo positivo de infección fúngica invasora.
- La gravedad y agresividad de una mucormicosis pulmonar justifica siempre informar de la presencia de un mucoral en una muestra respiratoria correctamente procesada.
- La corticoterapia prolongada es por sí sola un importante factor de riesgo para desarrollar una aspergilosis invasora.
- El aislamiento de *C. neoformans* en una muestra respiratoria es indicativo de criptococosis pulmonar o de infección sistémica.
- *S. apiospermum* y *S. prolificans* pueden dar lugar a micosis pulmonares invasoras clínicamente indistinguibles de la aspergilosis.
- La fusariosis pulmonar suele deberse a diseminación hematogena en un cuadro sistémico y, en más del 50% de los casos, cursa con hemocultivos positivos.
- La especie del género *Candida* rara vez dan lugar a micosis pulmonares invasoras, si no es en pacientes terminales, estando presentes en las secreciones respiratorias del 20% de la población sana y en más del 50% de los pacientes que han recibido antibioterapia.

gos considerados por el micólogo como contaminantes carece de sentido, al igual que informar de posibles oportunistas en pacientes inmunocompetentes sin factores de riesgo conocidos. Se recomienda informar personalmente los resultados,

Referencias

estableciendo una estrecha rela-

1. Baselski VS, Wunderink RG. Bronchoscopic diagnosis of pneumonia. *Clin Microbiol Rev* 1994; 7: 533-558.
2. Brown MS, Wu TC. The gram stain morphology of fungi, mycobacteria, and *Pneumocystis carinii*. *J Med Technol* 1986; 3: 495-499.
3. Latge JP. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12: 310-350.
4. Powers CN. Diagnosis of infectious diseases: a cytopathologist's perspective. *Clin Microbiol Rev* 1998; 11: 341-365.
5. Ribes JA, Vanover-Sams CL, Baker DJ. Zygomycetes in human disease. *Clin Microbiol Rev* 2000; 13: 236-301.
6. El-Ebiary M, Torres A, Fàbregas N, *et al*. Significance of the isolation of *Candida* species from respiratory samples in critically ill, non-neutropenic patients. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156: 583-590.
7. Glazer M, Nusair S, Breuer R, Lafair J, Sherman Y, Berkman N. The role of BAL in the diagnosis of pulmonary mucormycosis. *Chest* 2000; 117: 279-282.
8. Horvath JA, Dummer S. The use of respiratory-tract cultures in the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis. *Am J Med* 1996; 100: 171-178.
9. Larone DH. Medically important fungi: a guide to identification. 3rd ed. Washington D.C., American Society for Microbiology Press, 1995.
10. Land GA (Ed. section). Mycology. p. 6.1.1-6.8.4. In: Isenberg HD (Ed.) *Clinical microbiology procedures handbook*. Vol. 1. Washington D.C., American Society for Microbiology Press, 1992.

ción entre el micólogo y el clínico para evaluar conjuntamente la implicación clínica de los aislamientos. Por el contrario, el aislamiento de un hongo patógeno primario en cualquier muestra respiratoria tiene siempre un valor inequívoco y no debería plantear problemas de interpretación. Los cultivos de las biopsias pulmonares tampoco suelen presentar problemas de interpretación ya que, al tratarse de una muestra estéril, el aislamiento de cualquier hongo debe considerarse significativo, pero la posibilidad de una contaminación accidental hace que sea muy recomendable disponer también de estudios anatomopatológicos que confirmen la invasión tisular por elementos fúngicos.