

Javier Pemán
Pilar Ramos
Isabel Iglesias

6.1 Fundamento

El diagnóstico de las infecciones fúngicas invasoras se basa, como el de cualquier otra enfermedad infecciosa grave, en dos pilares fundamentales: la presunción clínica y la confirmación microbiológica. Sin lugar a dudas, la base del diagnóstico micológico sigue siendo el cultivo de la muestra que permite el aislamiento e identificación del agente causal y la posterior realización de las pruebas de sensibilidad antifúngica. En el caso de las micosis invasoras es necesario, siempre que las condiciones clínicas del paciente lo permitan, el procesamiento de muestras profundas donde se presume la invasión fúngica: sangre, biopsias tisulares o líquidos orgánicos. Estas muestras, habitualmente estériles, son las más valiosas en un laboratorio de Micología, no sólo por su alta rentabilidad diagnóstica, sino también por la dificultad de obtención o imposibilidad de repetición, lo que obligará a extremar todas las medidas para obtener el mayor rendimiento de las mismas.

Actualmente, el hemocultivo sigue siendo la mejor técnica para el diagnóstico de una candidemia, a pesar de su escasa sensibilidad global ($\approx 50\%$). Para intentar el aislamiento del agente causal de otras infecciones fúngicas invasoras será preciso procesar diferentes tipos de muestras teniendo siempre presente que cuanto más profundas sean, mayor será su fiabilidad diagnóstica [1]. Los patógenos fúngicos habitualmente aislados en este tipo de muestras se detallan en la **Tabla 6.1**.

6.2 Hemocultivo

Hoy día, para la recuperación de levaduras de la sangre se recomienda el uso de los mismos sistemas automatizados de monitorización continua utilizados para bacterias, pero si se sospecha una infección sistémica por un hongo dimórfico, la técnica de lisis-centrifugación parece ofrecer mayores ventajas. Sin embargo, para la recuperación de la mayoría de hongos filamentosos, ninguno de estos dos sistemas de hemocultivo ha demostrado su eficacia [2,3].

Los sistemas automatizados integran el sistema de detección, el incubador y el mecanismo de agitación en una sola unidad; cada frasco de hemocultivo se procesa individualmente, obviando su manipulación después de su introducción en el incubador y eliminando la posibilidad de la contaminación cruzada entre los frascos. Actualmente hay cuatro sistemas automatizados comercializados en España que se diferencian en el tipo de metabolito detectado, en el sistema de detección o en el tipo de agitación: BacT/Alert® (Organon Teknika Corp.) y BACTEC 9240® (Becton Dickinson) detectan el crecimiento microbiano midiendo la producción de CO₂ por colorimetría o por fluorescencia, respectivamente; ESP® (Difco) detecta el crecimiento microbiano por las variaciones manométricas originadas por el consumo o la producción de gas y, por último, Vital® (bioMérieux-Vitek) detecta el crecimiento por las disminuciones de fluorescencia en el interior de los frascos que se agitan con movimiento sinusoidal. Cualquiera de ellos es útil para el aisla-

Tabla 6.1. Patógenos fúngicos aislados con cierta frecuencia (++) o más raramente (+) en sangre y otras muestras estériles.

	Sangre	LCR	L. pleural	L. peritoneal	L. sinovial	MO	Tejidos
<i>Aspergillus</i>		++	++	++	+		++
<i>Blastomyces</i>		+			++	++	++
<i>Blastoschizomyces</i>	++						
<i>Candida</i>	++	++	++	++	++		++
<i>Coccidioides</i>		++			++		++
<i>Cryptococcus</i>	++	++	+	++		++	++
<i>Fusarium</i>	+		+	++			++
<i>Histoplasma</i>	++	++	+			++	+
<i>Mucor</i>				+			++
<i>Rhizopus</i>				+			++
<i>Rhodotorula</i>	++	++					
<i>Scedosporium</i>	+	+				++	++
<i>Sporothrix</i>		+				++	++
<i>Trichosporon</i>	++	+		++			

LCR: líquido cefalorraquídeo, MO: médula ósea



Figura 6.1. Botellas de hemocultivo del sistema automatizado BacT/Alert® (Organon Teknika Corp.).



Figura 6.2. Botellas de hemocultivo del sistema automatizado BACTEC 9240® (Becton Dickinson).



Figura 6.3. Botellas de hemocultivo del sistema automatizado Vital® (bioMérieux-Vitek).

miento de levaduras en los frascos de hemocultivo (Figuras 6.1-6.3).

Las aportaciones del sistema de lisis-centrifugación Isolator® (Oxoid) en el diagnóstico de las fungemias son muy interesantes. Su característica principal radica en su capacidad para lisar los leucocitos sanguíneos y la posterior liberación al medio de los posibles microorganismos fagocitados, por lo que es el método de elección para el aislamiento de *Histoplasma capsulatum*, cuya fase levaduriforme es esencialmente intracelular. Por otra parte, al permitir la siembra en cualquier medio sólido, también es muy útil para el aislamiento de levaduras con requerimientos especiales para su crecimiento, como las especies del género *Malassezia*, incapaces de crecer en los frascos de hemocultivos automatizados al no estar enriquecidos con ácidos grasos. Y, por último, al inocular en las placas un volumen conocido de inóculo, también permite la cuantificación (UFC/ml) de la infección. Entre los inconvenientes del sistema de lisis-centrifugación hay que destacar su mayor laboriosidad, sobre todo comparada con los sistemas automatizados, y la mayor posibilidad de contaminaciones en manos de personal no adiestrado (Figura 6.4).

6.2.1 Obtención de la muestra

Para evitar las frecuentes contaminaciones de los hemocultivos con flora bacteriana de la epidermis es muy importante realizar la extracción de sangre cuidando al máximo todas las medidas de asepsia. Los fabricantes de los sistemas automatizados recomiendan inocular dos frascos en cada extracción (aeróbico y anaeróbico) y, en el caso de niños, el frasco especialmente diseñado para ellos (un sólo frasco por extracción). El volumen de sangre inoculado en cada frasco es fundamental para aumentar la sensibilidad de la técnica (Tabla 6.2).

Tabla 6.2. Técnica de extracción e inoculación de sangre para los sistemas de hemocultivos automatizados.

1. Utilizar guantes estériles durante la extracción.
2. Desinfectar el tapón de goma del frasco con alcohol etílico (70%) y esperar 1 min antes de inocularlo.
3. Después de localizar el lugar de la venopunción, limpiar con un algodón impregnado con alcohol etílico (70%), realizando movimientos concéntricos de dentro hacia fuera.
4. Repetir la misma operación con otro algodón impregnado con povidona yodada (2%), dejándola actuar durante un minuto.
5. Una vez realizada la desinfección no debe volverse a palpar la vena; si fuera necesario, utilizar nuevos guantes estériles.
6. Extraer la sangre e inocular los frascos o viales de hemocultivo:
Adultos: 10 ml.
Niños: 1-5 ml (frasco pediátrico).
Neonatos y bajo peso: 0,5-1,5 ml (frasco pediátrico).
7. Limpiar los restos de povidona yodada con alcohol.

Algunos fabricantes han comercializado frascos de hemocultivo especialmente concebidos para la recuperación de patógenos fúngicos de la sangre como el Mycosis-IC/F® (Becton Dickinson) pero, hasta el momento, su utilidad sólo ha sido demostrada en los casos de septicemias mixtas por bacterias y hongos (Figura 6.5).

Los frascos de hemocultivo MYCO/F LYTIC® (Becton Dickinson) están diseñados para la recuperación de patógenos intracelulares. Incorporan al medio de cultivo un agente lítico (saponina) que induce la ruptura de los leucocitos y la posterior salida de microorganismos fagocitados que pueden ser detectados por el sistema automati-



Figura 6.4. Prensa Isostat® para la retirada del tapón de los tubos Isolator 10® del sistema lisis-centrifugación (Oxoid).



Figura 6.5. Botella de hemocultivo Mycosis-IC/F® (Becton Dickinson) diseñada especialmente para la recuperación de patógenos fúngicos.



Figura 6.6. Botella de hemocultivo MYCO/F LYTIC® (Becton Dickinson) diseñada para la recuperación de patógenos intracelulares (levaduras, hongos filamentosos, micobacterias).



Figura 6.7. Tubos Isolator 1,5® (pediátrico) e Isolator 10® del sistema lisis-centrifugación (Oxoid).

zado BACTEC 9240®. Hasta el momento, ha demostrado su utilidad en infecciones sistémicas por *H. capsulatum* (Figura 6.6).

La técnica de extracción e inoculación de la sangre en el sistema de lisis-centrifugación es similar, pero para su correcta realización hay que tener en cuenta las especificaciones del fabricante (Tabla 6.3). Para los niños, también existen comercializados tubos pediátricos (Isolator 1.5®) que, por su pequeño tamaño, no pueden procesarse de igual forma que los tubos de adultos: se inoculan con 0,5-1,5 ml de sangre, se voltean varias veces para activar la lisis celular y, sin necesidad de centrifugación, se siembra todo su contenido en el

Un consejo...

Los resultados obtenidos con el frasco Mycosis-IC/F (Becton Dickinson) son similares a los de los frascos convencionales en la mayoría de las candidemias. Pero en aquellos casos con firme sospecha clínica de candidemia y donde sólo se aíslan bacterias contaminantes en los frascos convencionales (*Staphylococcus coagulasa negativo*, *Corynebacterium*, etc), puede detectarse el crecimiento de levaduras subcultivando 10 ml del hemocultivo positivo para bacterias en un frasco de Mycosis-IC/F suplementado con 5 mg/l de vancomicina (Diluir 0,1 ml de Diatrácín® 500 en 10 ml de solución salina, introducir 0,5 ml de esta dilución en el frasco de Mycosis-IC/F ya inoculado con los 10 ml del hemocultivo positivo y procesar de forma habitual en el arcón incubador).

Tabla 6.3. Técnica de extracción e inoculación de sangre para el sistema de lisis-centrifugación.

1. Utilizar guantes estériles durante todo el proceso.
2. Desinfectar el tapón de goma del tubo Isolator 10 con alcohol yodado, sin inundar la cavidad. Dejar secar completamente.
3. Abrir el cartucho de Vacutainer y ensamblar la aguja al porta-tubos.
4. Insertar el tubo Isolator 10 en el porta-tubos Vacutainer hasta la línea marcada.
5. Después de localizar el lugar de la venopunción, limpiar con un algodón impregnado con alcohol etílico (70%), realizando movimientos concéntricos de dentro hacia fuera.
6. Repetir la misma operación con otro algodón impregnado con povidona yodada (2%), dejándola actuar durante 1 min.
7. Una vez realizada la desinfección no debe volverse a palpar la vena; si fuera necesario, utilizar nuevos guantes estériles.
8. Realizar la venopunción manteniendo siempre la aguja en posición más elevada que el fondo del tubo (para que el contenido del mismo no contacte con el tapón de goma).
9. Empujar el tubo hasta el fondo del porta-tubos o hasta que la sangre fluya en su interior.
10. Cuando el tubo esté lleno (10 ml), retirarlo conjuntamente con el porta-tubos.
11. Separar el tubo del porta-tubos.
12. Invertir cuidadosamente el tubo 4-5 veces para facilitar la lisis celular y evitar la coagulación de la sangre.
13. Retirar la aguja del porta-tubos y desecharla en un contenedor adecuado.

medio seleccionado según el microorganismo sospechado (Figura 6.7).

6.2.2. Procesamiento del hemocultivo

Una vez inoculados, los frascos de hemocultivo deben ser introducidos en los arcones incubadores lo antes posible, de lo contrario se conservan a temperatura ambiente hasta su procesamiento. El crecimiento de la mayoría de las especies de levaduras es detectado por los sistemas automatizados en las primeras 72 h de incubación; no obstante, los frascos deben incubarse un mínimo de siete días y, al término de la incubación, se realiza un subcultivo del frasco en SDAC o un examen microscópico, con tinción de Gram o naranja de acridina, antes de informarlos como negativos.

Cuando el sistema automatizado detecte crecimiento microbiano en el interior de un frasco, debe realizarse un examen microscópico del mismo previa tinción (Gram) y, en el caso de observarse células levaduriformes, se realiza un subcultivo en SDAC y CHROMagar Candida® para, posteriormente, proceder a su identificación y al estudio de su sensibilidad (Capítulos 11, 15 y 16).

El procesamiento de los tubos de lisis-centrifugación es más complejo y no está exento de contaminaciones externas, por lo que deben extremarse al máximo todas las medidas indicadas por el fabricante (Tablas 6.4 y 6.5). Si durante la incubación se

Tabla 6.5. Procesamiento de los tubos Isolator 10® del sistema lisis-centrifugación (II). Extracción del sobrenadante, siembra del sedimento e incubación.

1. Realizar todo el procesamiento en campana de flujo laminar.
2. Comprimir completamente el bulbo de la "Pipeta de Sobrenadante" antes de introducirla en el tubo (para evitar el burbujeo y la resuspensión del sedimento).
3. Insertar cuidadosamente la punta de la pipeta en el tubo, a través de la membrana de la cápsula, manteniendo el bulbo comprimido.
4. Introducir la pipeta hasta que el bulbo contacte con la cápsula.
5. Aflojar la presión sobre el bulbo de la pipeta, permitiendo el flujo del sobrenadante en su interior (la entrada final de aire confirmará que el sobrenadante ha sido retirado completamente).
6. Desechar la pipeta en un contenedor adecuado.
7. Resuspender el sedimento del tubo en un Vortex.
8. Comprimir completamente el bulbo de la "Pipeta de Concentrado" antes de introducirla en el tubo.
9. Insertar cuidadosamente la punta de la pipeta en el tubo, a través de la membrana de la cápsula y manteniendo el bulbo comprimido.
10. Introducir la pipeta hasta tocar con la punta el botón del sedimento. Aflojar la presión sobre el bulbo de la pipeta, permitiendo el flujo del sedimento en su interior.
11. Distribuir equitativamente el sedimento en diferentes placas de SDAC y, utilizando la punta de la misma pipeta, realizar un zigzag perpendicular (15-20 estrías) sobre el inóculo dispensado.
12. Desechar la pipeta en un contenedor adecuado.
13. Las placas sembradas deben incubarse a 35 °C lo antes posible. Se colocan en la estufa hacia arriba durante las primeras 24 h de incubación. Posteriormente, se invierte su posición.
14. Las placas se examinan diariamente hasta cumplir el tiempo total de incubación (7 días).

Tabla 6.4. Procesamiento de los tubos Isolator 10 del sistema lisis-centrifugación (I). Retirada del tapón mediante la prensa Isostat®.

1. Los tubos Isolator 10 se deben procesar a su llegada al laboratorio. De lo contrario, se conservarán a temperatura ambiente (¡no refrigerar, ni congelar!).
2. Utilizar siempre una centrífuga con rotor de 35° de inclinación y adaptadores especiales para los tubos Isolator 10.
3. Centrifugar los tubos, con sus adaptadores, a 3.000 g durante 30 min. No utilizar el freno de la centrífuga para detenerla.
4. Retirar cuidadosamente los tubos de la centrífuga (para evitar la mezcla del sedimento con el sobrenadante).
5. Separar los tubos de sus adaptadores.
6. Introducir los tubos en la gradilla especial Isostat girando ligeramente en el sentido de las agujas del reloj.
7. Desinfectar el tapón de goma con alcohol yodado, sin inundar la cavidad. Dejar secar durante 1 min.
8. Colocar la gradilla en la prensa Isostat y cubrir cada tapón con una cápsula estéril Isostat.
9. Colocar cada tubo, con su cápsula, debajo de la prensa y empujar rápidamente el asa de la prensa hacia abajo.
10. Colocar el asa en su posición original y repetir la maniobra con cada tubo. Retirar la gradilla de la prensa.

observa crecimiento temprano de algún microorganismo, las placas deben reincubarse para comprobar el posible crecimiento de un segundo germen.

6.2.3. Diagnóstico de fungemia por *Malassezia* spp.

Las especies del género *Malassezia* son levaduras lipófilas que forman parte de la flora cutánea. *M. furfur* y *M. globosa* son agentes causales de la pitiriasis versicolor, dermatitis seborreica y ciertas foliculitis, pero también pueden causar sepsis relacionada con el catéter en neonatos, prematuros y enfermos inmunodeprimidos alimentados con nutrición parenteral enriquecida con lípidos [4]. Los sistemas automatizados de hemocultivos no suelen detectar su crecimiento por lo que, cuando se sospeche una fungemia por especies de este género, es aconsejable el uso de los tubos de lisis-centrifugación Isolator 10 o Isolator 1.5, dependiendo de la edad del paciente, para la extracción de sangre (preferiblemente a través del catéter de la nutrición parenteral) y su posterior siembra en medios de cultivo suplementados con ácidos grasos: SDA más aceite de oliva, Dixon o Leeming-Notman (Capítulo 3). El cultivo del catéter, utilizando la técnica de Maki en alguno de estos medios, también es de gran ayuda para el diagnóstico etiológico las sepsis asociadas a catéter (Capítulo 10).

6.3. Líquido cefalorraquídeo

Durante la primera década de la pandemia del sida, las infecciones fúngicas más frecuentes del SNC eran debidas a *Cryptococcus neoformans*; pero en la actualidad, gracias a la instauración de la triple terapia antiretroviral, las meningitis por *C. neoformans* son muchos menos frecuentes. Además, diferentes especies de los géneros *Candida* o *Rhodotorula*, hongos dimórficos como *Histoplasma* o *Coccidioides* o, incluso patógenos oportunistas como *Aspergillus*, *Scedosporium* o *Acremonium* también pueden causar meningitis. Sin embargo, la invasión del espacio leptomeníngeo por hongos miceliares es infrecuente, por lo que la gran mayoría de los aislamientos fúngicos en el LCR van a estar constituidos por levaduras. En nuestro medio, las meningitis fúngicas suelen ser secundarias a neurocirugía, traumatismos, prematuridad o a los sistemas de derivación de LCR.

El diagnóstico etiológico de una meningitis precisa el procesamiento y cultivo del LCR. La dificultad de su obtención hace del LCR una de las muestras biológicas estériles más valiosas en un

Tabla 6.6. Técnica de obtención del LCR.

1. Realizar la punción en condiciones de máxima asepsia.
2. Desinfectar la zona con povidona yodada al 2%.
3. Realizar la punción en los espacios intervertebrales L3-L4, L4-L5 ó L5-S1.
4. Al llegar al espacio subaracnoideo, retirar el estilete y dejar salir libremente el LCR; recogerlo en tres tubos estériles con tapón de rosca (Bioquímica, Microbiología y Citología).
5. Extraer un volumen mínimo de 10 ml (3 ml / tubo).
6. Enviar inmediatamente al Laboratorio de Microbiología.
7. Extraer también sangre para hemocultivo.

Tabla 6.7. Técnica para el procesamiento del LCR.

1. Procesar en el laboratorio inmediatamente, de lo contrario, almacenarlo a temperatura ambiente (máximo 24 h).
2. Centrifugar todas las muestras >1 ml (1500 g / 15 min) y realizar los siguientes pasos en cabina de flujo laminar.
3. Dejar 1 ml de LCR junto con el sedimento y depositar el resto de sobrenadante en otro tubo estéril (para una posterior detección de antígenos).
4. Resuspender cuidadosamente el sedimento con la ayuda de un vórtex.
5. Dispensar una gota del sedimento sobre un portaobjetos para su examen microscópico directo: Tinta china y/o fresco (Capítulo 14).
6. Inocular el resto del sedimento en 2 tubos de SDA.
7. Incubar un tubo a 35 °C y otro a temperatura ambiente (30 días).
8. Si se sospecha meningitis por *C. neoformans*, realizar la detección de Ag criptocócico en el sobrenadante (Capítulo 14).
9. Vigilar los cultivos cada 48 h.
10. Si se detectase crecimiento fúngico, proceder a la identificación del microorganismo (Capítulos 11 y 13) y al estudio de su sensibilidad (Capítulos 15 y 16).

laboratorio de Microbiología; por lo tanto, la técnica de extracción y el posterior procesamiento del LCR deben ser lo más cuidadosa posible para aprovechar al máximo las posibilidades diagnósticas de la muestra (Tablas 6.6 y 6.7).

6.4. Otros líquidos orgánicos (pleural, peritoneal, pericárdico, sinovial)

Como respuesta a una infección, cualquier cavidad del organismo puede albergar líquido originado mediante un proceso exudativo. Estos líquidos, junto con los denominados estériles, son unas muestras microbiológicas de primer orden al reflejar el patrón infeccioso de los tejidos colindantes, por lo que deben ser manejados con extremo cuidado, recomendándose que su manipulación y siembra sea realizada en cabina de flujo laminar.

Los líquidos orgánicos que con mayor frecuencia se estudian en el laboratorio de Microbiología, después de la sangre y el LCR, son el pleural, peritoneal, pericárdico y sinovial.

Las técnicas para su obtención y procesa-

Tabla 6.8. Técnica de obtención de los líquidos orgánicos estériles.

1. Realizar la punción en condiciones de máxima asepsia.
2. Desinfectar la piel con povidona yodada al 2%.
3. Obtener la muestra por aspiración con aguja percutánea o por cirugía.
4. Extraer un volumen mínimo de 5 ml y depositarlo en un tubo estéril con tapón de rosca (o inocular un frasco de hemocultivo).
5. Enviar inmediatamente al Laboratorio de Microbiología.

Tabla 6.9. Técnica para el procesamiento de los líquidos orgánicos estériles.

1. Procesar en el laboratorio inmediatamente, de lo contrario, almacenarlo a temperatura ambiente (máximo 24 h).
2. Centrifugar todas las muestras >1 ml (1.500 g / 15 min) y realizar los siguientes pasos en cabina de flujo laminar.
3. Dejar 1 ml de líquido junto con el sedimento y depositar el resto del sobrenadante en otro tubo estéril.
4. Resuspender cuidadosamente el sedimento (aspirándolo y expulsándolo con una pipeta o con la ayuda de un vórtex).
5. Dispensar una gota del sedimento resuspendido sobre un portaobjetos para su examen microscópico directo: KOH, blanco de calcoflúor (Capítulo 14).
6. Inocular el resto del sedimento en 2 tubos de SDA.
7. Incubar un tubo a 35 °C y otro a temperatura ambiente (30 días).
8. Vigilar los cultivos cada 48 h.
9. Si se detectase crecimiento fúngico, proceder a la identificación del microorganismo (Capítulos 11 y 13) y al estudio de su sensibilidad (Capítulos 15 y 16).

miento son similares, por lo que se recomienda seguir las indicaciones detalladas en las Tablas 6.8 y 6.9, teniendo siempre en cuenta que cuanto mayor sea el volumen extraído, mayor será la probabilidad de aislamiento de un patógeno fúngico.

En la actualidad, la causa más frecuente de peritonitis fúngica es la diálisis peritoneal ambulatoria siendo *Candida*, *Aspergillus* y *Fusarium* los agentes causales más habituales.

La patogenia de la artritis fúngica también está relacionada con la inoculación directa del ger-

Un consejo...

Como en toda peritonitis, el gran volumen de líquido ascítico presente en la cavidad abdominal aumenta la dilución del inóculo microbiano, por lo que la rentabilidad del cultivo convencional para el diagnóstico de la peritonitis fúngica es muy baja. Para aumentar la sensibilidad de la técnica se recomienda centrifugar 50 ml de líquido peritoneal, inocular el sedimento en dos frascos de hemocultivo y procesarlos como tales.

men (traumatismos previos, implantación de material protésico); *Candida*, *Sporothrix* y otros hongos dimórficos suelen ser los patógenos más frecuentemente aislados en el líquido articular.

gación para el procesado de esta muestra facilita la liberación de las levaduras fagocitadas, aumentando su recuperación en el medio de cultivo (Tabla 6.10).

6.5. Médula ósea

El aspirado de médula ósea, generalmente obtenido por punción esternal o de cresta ilíaca, es una de las mejores muestras para el diagnóstico de la histoplasmosis diseminada. El estadió levaduriforme

6.6. Tejidos

Cuando exista sospecha de infección localizada en uno o varios órganos, debe plantearse la idoneidad de realizar una biopsia de ese tejido afectado para su diagnóstico microbiológico. Sin embargo, en la mayoría de las micosis profundas, la situación clínica y hemostásica del paciente contraindican este procedimiento; no obstante, siempre que sea posible, debe plantearse su obtención como una de las mejores vías de para intentar el aislamiento, identificación y posterior estudio de la sensibilidad del agente causal.

Las muestras de tejidos se obtienen mediante

Tabla 6.10. Obtención y procesamiento de médula ósea.

1. Realizar la punción medular aplicando las máximas medidas de asepsia posibles.
2. Introducir el aspirado en un tubo Isolator 1.5 y enviar inmediatamente al laboratorio de Microbiología.
3. Dispensar una gota del contenido sobre un portaobjetos para su examen microscópico directo mediante tinción Giemsa (Capítulo 14).
4. Inocular el contenido del tubo Isolator 1.5 en un dos tubos de agar BHI.
5. Incubar un tubo a 35 °C y otro a temperatura ambiente (30 días).
6. Vigilar los cultivos cada 48 h.
7. Si se detectase crecimiento fúngico, proceder a la identificación del microorganismo (Capítulos 11 y 13) y al estudio de su sensibilidad (Capítulos 15 y 16).

Tabla 6.11. Obtención y procesamiento de muestras tisulares.

1. Realizar la biopsia aplicando las máximas medidas de asepsia.
2. Introducir el tejido biopsiado en un recipiente estéril con tapón de rosca y enviar inmediatamente al laboratorio de Microbiología.
3. Si la muestra es pequeña, añadir varias gotas de solución salina estéril para mantener la humedad.
4. Trocear la muestra en pequeños pedazos con la ayuda de un bisturí estéril.
5. Realizar varias improntas de la muestra sobre un portaobjetos para su examen microscópico directo: blanco de calcoflúor, KOH, tinción de plata metenamina (Capítulo 14).
6. Inocular la muestra troceada en dos tubos de SDA, sumergiendo ligeramente la misma en la superficie del agar.
7. Incubar un tubo a 35 °C y otro a temperatura ambiente (30 días).
8. Vigilar los cultivos cada 48 h.
9. Si se detectase crecimiento fúngico, proceder a la identificación del microorganismo (Capítulos 11 y 13) y al estudio de su sensibilidad (Capítulos 15 y 16).

me de *H. capsulatum* es eminentemente intracelular, por lo que la utilización del sistema de lisis-centrifugación

Unos consejos...

- La homogenización o trituración de las muestras tisulares es perjudicial para las hifas de los zigomicetos y dificulta su crecimiento. Por lo tanto, si el presunto agente fúngico es desconocido o se sospecha la presencia de un zigomiceto, se debe cortar la muestra con bisturí estéril en piezas de 1 mm.
- Por el contrario, si se sospecha la presencia de *H. capsulatum*, la trituración previa de la muestra es el procedimiento aconsejado.

