

## NORMAS PARA EL DIAGNOSTICO DE LABORATORIO DE LAS MICOSIS

RICARDO NEGRONI \*

### MICOSES SISTEMICAS

Los estudios de laboratorio que contribuyen a certificar el diagnóstico y conocer el pronóstico de las micosis sistémicas pueden ser divididos en: métodos directos, que se basan en la identificación del agente etiológico y métodos indirectos que comprende el estudio de los anticuerpos específicos fijos y circulantes. Hay también ciertos métodos indirectos inespecíficos, que abarcan el estudio de las alteraciones anatómo-patológicas, del proteinograma, etc. producidas por estos parásitos.

Las micosis sistémicas existentes en la América del Sud son: la blastomicosis sudamericana o micosis de Lutz, la histoplasmosis, la coccidioidomicosis y la criptococosis (anteriormente llamada Torulosis).

El estudio de estas cuatro afecciones, desde el punto de vista de su diagnóstico de laboratorio, debe encararse en común, pues salvo en el caso de la criptococosis, los procedimientos empleados son los mismos.

### OBTENCION Y ENVIO DEL MATERIAL

Para la correcta utilización de los métodos directos de diagnóstico es indispensable el adecuado envío de las muestras. Estas pueden ser esputo, líquido de broncoaspiración; biopsias de piel, mucosas o ganglios linfáticos; pus de lesiones abcedadas y líquido cefalorraquídeo.

El esputo debe recogerse en horas de la mañana, con el paciente en ayunas y previa una cuidadosa higiene bucal. El recipiente empleado será un frasco de boca ancha, tapa esmerilada, esterilizado en autoclavo a 120°C durante 15 o 20 minutos.

Los restantes materiales se obtendrán con las máximas precauciones de asepsia y serán remitidos en recipientes esterilizados por el procedimiento ya mencionado. Cuando se trata de esputo, lavado bronquial, a biopsia de lesiones abiertas, es indispensable adicionarles 100 ug/ml de cloramfenicol, a fin de impedir el excesivo desarrollo bacteriano.

Las biopsias deben dividirse en

\* Do Centro de Micologia da Faculdade de Medicina da Universidade Nacional de Buenos Ayres. Prof convidado do I.P.T., da UFGO.



dos partes; una se coloca en formol al 10% y otra en solución fisiológica estéril con antibióticos, a fin de poder realizar con cada una de ellas el estudio histopatológico y micológico, respectivamente.

#### Estudios de Laboratorio

#### Métodos directos: 1 - Examen Microscópico

Con el material que no ha sido fijado en formol, deben efectuarse sistemáticamente cuatro preparaciones:

a) Examen al estado fresco entre porta y crubeobjeto con una gota de solución fisiológica o agua destilada estéril, debe colocarse una gota del material o hacer una impresión de las biopsias sobre el portaobjeto.

Este método permite observar los hongos de gran tamaño que poseen pared gruesa y refringente, como el *Paracoccidioides brasiliensis* y el *Coccidioides immitis*. Una variante de este procedimiento es el estudio al estado fresco con una gota de tinta china diluida al 1/2 con solución fisiológica. Este examen permite visualizar el *Cryptococcus neoformans*, que debido a su gruesa cápsula de mucopolisacáridos, nos ofrece en la preparación con tinta china su aspecto típico. Tan característica es su morfología, que deberá aconsejarse la sealización sistemática de este examen en los sedimentos de líquidos cefalorraquídeos procedentes de pacientes con cuadros de meningitis subaguda ó crónica con líquidos claros u opalescentes.

b) Coloración de Gram. Permite tener una idea cuantitativa

y, hasta cierto punto cualitativa, de la flora acompañante. Además es la coloración de elección para visualizar *Actinomyces*.

c) Coloración de Ziehl-Neelsen. Se utiliza para evidenciar la presencia de *Mycobacterium* y *No-cardias*.

d) Coloración de Giemsa. Es indispensable para observar el *Histoplasma capsulatum*.

El material fijado en Formol se examina microscópicamente mediante la técnica histológica de uso corriente. Es conveniente realizar en forma sistemática la coloración de hematoxilina-eosina y además algún método especial como P.A.S. Gridley, Gomorif Grockott, que son útiles para visualizar hongos parásitos.

Será considerado correcto sólo aquel examen micológico que incluya todas estas preparaciones.

#### 2) Cultivos

Todos los agentes etiológicos de micosis sistémicas son difásicos, salvo el *Cryptococcus neoformans*, es decir, poseen una estructura totalmente distinta en los medios de cultivo simples e incubados a 28°C, de la que exhiben en los tejidos parasitados o en los medios enriquecidos a 37°C.

Por lo tanto cada material debe ser sembrado en 4 a 6 tubos, 2-3 de agar-glucosado o agar-miel de Sabouraud, e incubarlos a 28°C y 2-3 de agar-sangre o agar infusión de cerebro y corazón e incubarlos a 37°C.

En los primeiros se obtendrá el desarrollo de la fase filamentosa e saprofítica y en los segundos el de la fase levaduriforme o parasitaria.

A todos los medios de cultivo se

le deben adicionar 100 ug/ml de cloramfenicol a fin de inhibir el desarrollo bacteriano. Este antibiótico debe agregarse al medio después que este há sido esterilizado y cuando está a una temperatura de 55°C.

La composición de los medios de cultivo antes mencionados, es la siguiente:

#### Medio de Sabouraud-glucosado:

Glucosa .....	40 gr.
Peptona. Con frecuencia se la reemplaza por hidrolizado de caseína	10 gr.
Extracto de levadura ....	5 gr.
Agar .....	20 gr.
Agua destilada .....	1.000 ml.

Antes de adicionar el agar, tomar el pH del medio y corregirlo a pH 7, agregar 5 gr. de carbonato de calcio que actúa como estabilizador del pH.

Esterilizar en autoclave a 115°C durante 15 ó 20 minutos.

Medio de Sabouraud-miel: igual fórmula y método de preparación que en el caso anterior, reemplazando los 40 gr. de glucosa por 80 gr. de miel.

#### Agar sangre:

1) Caldo de carne .....	1.000 ml.
Peptona .....	10 gr.
Cloruro de sodio .....	5 gr.
Extracto de levadura ..	5 gr.
Agar .....	20 gr.

Llevar al autoclave a 115°C durante 20 minutos, para disolver.

2) Se neutraliza a pH 7 con soda al 10% y se lleva al autoclave nuevamente a 115°C durante 20 minutos, lo que determina un precipitado.

3) Filtra por algodón, ajustar a pH 7,4 — 7,6 distribuir en tubos y esterilizar a 120°C durante 20 minutos.

Cada 100 ml de agar simple hervido y enfriado a 45°C, adicionar 5 ml de sangre de carnero, caballo o conejo. Nótese que al método original del agar-sangre, nosotros aconsejamos adicionarle 0,5% de extracto de levadura.

#### Agar infusión de cerebro y corazón:

Infusión de cerebro y corazón .....	25 gr.
Hidrolizado de caseína ..	4 gr.
Extracto de levadura ....	5 gr.
Glucosa .....	5 gr.
Agar .....	20 gr.
Agua destilada .....	1.000 gr.

Neutralizar a pH 7 y esterilizar en autoclave a 120°C 15 minutos.

En reemplazo de este medio puede emplearse agar-higado con glucosa y vitamina B1.

#### 1) Callo de hígado

Polvo de hígado .....	50 gr.
Agua destilada .....	1.000 ml.

#### 2) Caldo hígado .....

Peptona .....	20 gr.
Cloruro de sodio .....	5 gr.
Glucosa .....	10 gr.
Vitamina B1 .....	25 mg.
Agar .....	20 gr.

Llevar a pH 7, y esterilizar a 120°C 15 minutos.

Es indispensable tener en cuenta que la mayoría de estos hongos demoran de 12 a 20 días para alcanzar un desarrollo completo; por lo tanto no podrá esperarse un informe útil del resultado del cultivo antes de transcurrido este período.

#### Inoculación a animales de experimentación



En general es suficiente el empleo de ratones y cobayos.

Los primeros serán inoculados por la vía peritoneal, con 0,5 ml de una suspensión del material en solución fisiológica adicionada de antibióticos (100 ug/ml de cloramfenicol) y los cobayos por la vía intratesticular, con 0,2 a 0,4 ml y, por la intraperitoneal, con 1 ml.

Inoculará cada material en 4 ratones y 1 cobayo por lo menos.

Los animales serán sacrificados después de un mes y sus vísceras examinadas microscópicamente y sembradas en los medios de cultivo ya mencionados.

#### Métodos indirectos

##### Reacciones cutáneas

Los antígenos deben prepararse de acuerdo a las directivas de Smith, C.E. (1943) para la coccidioidina. Deben sembrarse varias cepas de *C. inmitis* o *H. capsulatum*, según los casos, en el siguiente medio de cultivo, utilizando anteriormente en la preparación del derivado proteico purificado del *M. tuberculosis*:

Cloruro de amonio 7 g; 1 - asperagina 7 g; fosfato dipotásico 1,31 gr; citrato de sodio 0,9 gr. sulfato de magnesio 1,5 gr; citrato de hierro en escamas 0,3 gr; glucosa pura 10 gr; glicerina 25 gr; agua destilada csp 1000 ml. — Disuélvase en un pequeño volumen de agua destilada cada uno de los ingredientes, por separado, calentado, si fuera necesario. Mezclarlos, completar el volumen, enfriar, corregir a pH 7, filtrar y esterilizar en el autoclave a 115°C durante 20 minutos.

Después de sembrar las cepas en botellas de Roux o frascos de

Erlenmeyer, formando una capa de 1 1/2 a 2 cm de altura, incubar a 28°C durante 3 a 6 meses. Se filtra para separar la masa miceliana, se le agrega mertiolato de sodio 1/10.000 y se esteriliza por filtración por filtro Seitz esterilizante o por bujía Berkefeld. Se hacen controles de esterilidad y se determina la potencia antigénica frente a una coccidioidina o histoplasmina patrón. Para ello aconsejamos las histoplasminas y coccidioidina L 48 del Centro de la Facultad de Medicina de Buenos Aires. La determinación de la potencia antigénica se efectúa en cobayos infectados experimentalmente así como en humanos cuya reactividad cutánea sea conocida, empleado diversas diluciones. Los antígenos puros conservan su actividad indefinidamente a temperatura ambiente. Las diluciones deben prepararse en solución fisiológica con 0,3% de fenol como conservador para evitar las contaminaciones accidentales.

La reacción debe efectuarse inyectando 0,1 ml de la dilución 1/100 en la cara anterior del antebrazo.

La reacción se leerá a las 24, 48 y 72 horas; se considera positiva (+) cuando la zona de infiltrado y eritema mide entre 5 y 10 mm; positiva (+ +) entre 10 y 15 mm; positiva (+ + +) entre 15 y 20 mm y (-|-|-|-|-|-|-|-), cuando presente necrosis central.

Una vez producida la infección, le persistencia de la hipersensibilidad es muy prolongada, manteniéndose a veces durante toda la vida.

La reacción cutánea positiva indica la existencia de una infección actual o pasada. Es de gran utilidad para el diagnóstico de micosis-infección, en la delimitación de áreas endémicas, pero su valor para el diagnóstico de micosis-enfermedad se limita a los siguientes casos: 1) Cuando se comprueba en lactantes. 2) Cuando se asiste al viraje de la reacción de negativa a positiva. 3) Cuando aparece en una persona que no haya habitado hasta ese momento en zona endémica y que no presente reacciones fuertemente positivas con otros antígenos fúngicos.

Pueden observarse falsas reacciones positivas, debido a la presencia de antígenos comunes que determinan reacciones cruzadas entre el *P. brasiliensis*, *H. capsulatum* y *C. inmitis*. Las reacciones son siempre más intensas con el antígeno homólogo. Es aconsejable, pues, la realización simultánea de pruebas cutáneas con histoplasmina, coccidioidina y paracoccidioidina, considerándose positivo sólo aquella que proporciona la reacción mayor. La frecuencia de las reacciones cruzadas disminuye cuando se emplean antígenos diluidos.

Las falsas reacciones negativas aparecen hasta en el 50% de las formas diseminadas graves de estas micosis, indicando gravedad de de las mismas.

Para la preparación de la paracoccidioidina debe seguirse la técnica propuesta por Fava Netto para la obtención del antígeno polisacárido del *P. brasiliensis*.

Este antígeno conserva durante varios años su potencia antigénica. Los controles y la realización de las reacciones deben efectuarse como en la histoplasminas y coccidioidina.

En el humano empleamos el antígeno sin diluir. El patrón utilizado es el reactivo preparado con la cepa 1130,34 del Centro de Micología de la Facultad de Medicina de Buenos Aires.

#### Preparación del polisacárido de Fava Netto

Se siembra la cepa 1130,34 en su fase levaduriforme, en botellas de Roux conteniendo 150 ml de agar caldo glucosado al 1%. Las colonias son recogidas después de 10 días de incubación a 37°C, vertiendo en el interior del frasco perlas de vidrio esterilizadas para suspender en solución fisiológica el material de la superficie del medio. Después de tres lavados con solución fisiológica, se trata el sedimento con acetona pura, removiéndolo con una varilla de vidrio, repitiendo esta operación previa centrifugación dos veces más. A continuación se trata con eter sulfúrico siguiendo la misma técnica. Se seca el sedimento durante 1 h a 37°C, suspendiéndolo en solución "Buffer" veronal, pH 7,2-7,4 en proporción del 15°C de su volumen y llevándolo el autoclave a 120°C durante 15 minutos. Se separa el antígeno por centrifugación, el sobrenadante se filtra por papel de filtro mojado con agua destilada estéril y se le adiciona 1/10.000 de mertiolato de sodio como conservador.



## Reacciones serológicas Preparación de antígenos

El medio de cultivo es preparado en la siguiente forma: se disuelven 60 gr de neopeptona (Difco) en 120 ml de agua destilada a 45°C, y se la dializa en tripas de celofán de 43 mm. de diámetro, durante 5 horas a 70°C y luego 1 noche en la holadora a 0°C, contra agua destilada.

El contenido de las tripas es llevado a 1800 ml. con agua destilada y se le adicione 2% de de glucosa y 1 ug/ml de tiamina. El pH final del medio debe ser 6,9 a 7. Se distribuye entonces en frascos de Erlenmeyer de 300 c.c. colocando 125 ml de medio de cultivo en cada uno. Los frascos son sembrados abundantemente con suspensión de micelio y esporos del hongo patógeno deseado. La incubación se efectúa a 28°C en agitador mecánico con desplazamiento rotatorio de 5 cm. de amplitud, a razón de 90 ciclos por minuto y durante 4 semanas.<sup>1</sup> Luego el micelio es separado por filtración a través de 2 capas de papel de filtro, el líquido restante es adicionado de mertiolatoborato de sodio 1/10.000 como conservador y esterilizado por filtración en filtro Seitz.

Las cepas empleadas son: **Histoplasma capsulatum** 922,4; 922,7; y 420. Centro de Micología. **Paracoccidioides brasiliensis** 1130,34.

Centro de Micología. **Coccidioides immitis**, cepa n° 696,17, C. Micología.

En el caso de la paracoccidioidina así obtenida debe concen-

trarse 10 veces en su volumen para su empleo en reacciones serológicas. Dicha concentración se consigue por evaporación en estufa de 37°C durante 48 horas.

Esta técnica de preparación de antígenos ha sido útil para obtener histoplasmina, coccidioidina y paracoccidioidina. Sus propiedades son las siguientes: 1) Fácil de preparar. 2) Conservación indefinida. 3) Util tanto para pruebas de fijación de complemento cuanto para reacciones de inmunodifusión en gel de agar. 4) Constancia de los resultados. 5) Baja proporción de reacciones cruzadas (inferior al 10% y reacciones siempre más positivas con el antígeno homólogo).

## Reacciones de precipitación:

Estas pruebas se tornan positivas en las primoinfecciones sintomáticas después de 4 a 7 días del contacto infectante. Alcanzan su máximo título a las 2 e 3 semanas y luego decrecen gradualmente hasta desaparecer, una vez superada la infección. Sin embargo, en los procesos crónicos suelen persistir positivas, aunque con títulos bajos.

La utilidad fundamental de estas reacciones es el diagnóstico de las neumotitis de primo infección en la histoplasmosis y coccidioidomicosis y las blastomycosis sudamericanas con menos de un año de evolución.

La extracción de la muestra de sangre debe hacerse con el paciente en ayunas, por punción venosa, con jeringa esterilizada

a seco. Se extraerán 15 a 20 ml el adulto y la mitad en los niños, lo sangre es colocada en tubo o frasco seco, se espera la retracción del coágulo y se separa el suero por centrifugación. Se inactiva el complemento en "baño maría" a 56° C durante media hora, adicionándose 0,05 ml de una solución el 1% de mertiolato de sodio como conservador. Si la reacción no va a ser realizada en forma inmediata puede guardarse el suero en el congelador de una heladera común. Para almacenamientos prolongados se aconsejan congeladoras de -20° ó -70°C.

## Prueba de precipitación en tubo

Debe emplearse tubos de 70 x 7 mm. perfectamente limpios. Para la limpieza del material de serología aconsejamos dejarlo una noche en solución de Detergex, luego hervirlos durante media hora, eliminar el detergente, dejarlo una noche en agua destilada y luego secar los elementos en horno Pasteur. Para cada suero se disponen 4 tubos conteniendo 0,2 ml de suero no diluido cada uno y se vierten por las paredes para formar anillo, 0,2 ml del antígeno puro, diluido al 1/10 y al 1/40. El último tubo es el testigo en el cual al antígenos es reemplazado por el medio de cultivo líquido. Se efectúa la lectura a los 10 minutos de incubación a 37°C, anotando como resultados positivos aquellos que formen un anillo en el límite de separación del suero y el antígeno. Después de la primera lectura se agitan

los tubos para mezclar su contenido, prosiguiendo la incubación a 37°C (en baño maría) durante 5 días, al cabo de los cuales se realiza la lectura. Debe anotarse como positivos aquellos tubos que presenten la formación de depósito.

## Pruebas de inmunodifusión en gel de agar:

Sus resultados son paralelos a los proporcionados por las reacciones de fijación de complemento, siendo mucho más económica y sencilla que este último, presenta como desventajas el ser algo menos sensible y más difícil de cuantificar.

Inicialmente sus alcances fueron los de una reacción cualitativa que revelaba o no la presencia de anticuerpos frente a los diferentes antígenos fúngicos. Empleada en esta forma, es particularmente útil como reacción tamizadora, que permite describir, dentro de una gran cantidad de sueros, aquel que reacciona positivamente. Es un método de elección en campañas sanitarias.

Sin embargo estas reacciones pueden cuantificarse utilizando, además del suero puro, diluciones del mismo en progresión geométrica desde 1/2 a 1/64 o más, anotando como positiva la última dilución que produce bandas de precipitación netamente visibles.

Otra técnica cuantitativa es la inhibición de la inmunodifusión de acuerdo al procedimiento anterior.

Para las pruebas de inmunodifusión se recomienda la técnica de Ouchterlony, el sustrato empleado debe ser agar "Bacto" o "No-



ble" (Difco) o algún otro agar en polvo suficientemente purificado, disuelto al 1% en solución fisiológica con 0,3% de fenol como conservador. Las reacciones pueden realizarse en placa de Petri o portaobjeto, empleando 0,15 ml de sueros y antígenos puros.

Para la técnica de inhibición de la inmunodifusión el medio básico empleado es: "Noble" (Difco) 10 gr. PO<sub>4</sub> H<sub>2</sub> K10 gr, C1 Na 9gr, H<sub>2</sub>O 1000 ml. Se ajusta a pH 7,3 con PO<sub>4</sub> HK<sub>2</sub>, adicionándose 1/10.000 de mercuriato de sodio como conservador y se filtra en caliente por papel Whatman nº 1. Los orificios pequeños serán hocos con sacabocados de 5 mm. y los grandes con sacabocados de 7mm.

Las lecturas de las reacciones de inmunodifusión, deben ser efectuadas a los 3 días de incubación a temperatura ambiente y luego de haber cubierto la placa durante 1 hora con una solución "buffer" de citrato de sodio pH 8,2 a fin de eliminar las falsas bandas producidas por la sustancia -C.

#### Pruebas de fijación de complemento

Aconsejamos emplear la técnica de fijación de complemento cuantitativo de 50% de hemólisis preconizada por Otto Bier, en su libro *Bacteriología e Inmunología*. (López Libreros y editores 1970) pag. 579-586.

Se emplean diluciones suero en progresión geométrica a partir de 1/5. Para reacciones cualitativas debe utilizarse suero diluido 1/5 y 1/10.

Los anticuerpos fijadores de complemento aparecen más tardíamente que las precipitinas, alrededor de 30 días después del contacto infectante.

Estas reacciones se tornan positivas en las infecciones moderadas o graves y su realización periódica es de particular interés en las formas diseminadas de estas micosis. En las primoinfecciones leves permanecen negativas y en las moderadas, luego de una ligera positividad, se vuelven negativas vez superada la infección.

En las formas diseminadas crónicas el título de esta prueba es proporcional a la duración al número de unidades infectantes y, por lo tanto, a la gravedad de la enfermedad. Si el estado general y lesional del paciente mejora con el tratamiento instituido, el título de anticuerpos gradualmente cae hasta hacerse negativa la reacción después de algunos meses o un par de años de producirse la curación clínica y biológica.

En los casos que no son controlados por el tratamiento, los anticuerpos aumentan gradualmente hasta alcanzar niveles muy elevados y finalmente descienden en forma brusca poco antes de la muerte.

Para confeccionar curvas serológicas deben repetirse estas reacciones cada 8 semanas.

El estudio de estas tres reacciones serológicas satisface perfectamente las necesidades del diagnóstico micológico. Las pruebas de hemaglutinación pasiva, inmunofluorescencia e inmunoelectroforesis, han sido empleadas para trabajos de investigación, pero habitualmente, no son indispensables

para el diagnóstico y el estudio evolutivo de estas afecciones.

El diagnóstico de la criptocosis se realiza por métodos directos exclusivamente ya que los indirectos proporcionan resultados negativos en la mayor parte de los casos.

El examen microscópico debe efectuarse al estado fresco entre porta y cubreobjeto con una gota de tinta china diluida. En el caso de las piezas fijadas en formol se utilizará, además de la hematoxilina-eosina, la tinción con mucicarmín de Best que permite visualizar la cápsula.

Los cultivos deben hacerse en los medios habituales adicionados de antibióticos e incubados a 37°C y 28°C.

El estudio de estos cultivos será completado con el examen de las siguientes propiedades fisiológicas: 1) capacidad de desarrollar a 37°C; 2) hidrólisis de la urea; 3) auxanograma de carbono; 4) auxanograma de nitrógeno y 5) zimograma.

La técnica de estudio debe ser la preconizada por Lodder y K Van Rij en su libro "The Yeast", 1969.

El *Cryptococcus neoformans* crece a 37°C, es ureasa positivo, no asimila la lactosa ni el nitrato de potasio y carece de propiedades fermentativas.

#### Inoculación a animales sensibles:

El *C. neoformans* es la única especie del género que es patógena para los animales de laboratorio. El más sensible es el ratón que puede ser inoculado por la vía intraperitoneal, intravenosa e

intracraneal, está última es la que proporciona el mayor índice de mortalidad, en un periodo de pocos días. Para la inoculación intracraneal deben preferirse ratones lactentes e inyectar 0,03 ml del material en cada uno. En la autopsia deben examinarse, cerebro, pulmones, hígado, bazo, líquido peritoneal y pared abdominal (en los casos de inoculación intraperitoneal).

#### Diagnóstico de las micosis profundas localizadas

1) **Rhinosporidiosis:** esta afección sólo puede ser diagnosticada mediante el estudio histopatológico, pues su agente causal, el *Rhinosporidium seeberi*, no es cultivable ni produce la enfermedad experimentalmente. Para el diagnóstico histológico basta la coloración de hematoxilina-eosina.

2) **Cromomicosis:** deben tomarse biopsias de las lesiones vegetantes y dividirlas en dos trozos: uno se lo remitirá en formol al 10% para histopatología y, el otro, en frasco estéril y con solución fisiológica estéril adicionada de 100 ug/ml de cloramfenicol.

Para el estudio histopatológico basta realizar la tinción de hematoxilina-eosina.

Con el material no fijado pueden hacerse preparaciones, colocando las escamocostras que cubren la lesión, entre porta y cubreobjeto con 1 gota de potasa al 40% en caliente. Igualmente se harán impresiones de la zona dérmica sobre un porta objeto, los que deben examinarse al estado fresco entre porta y cubreobjeto



con 1 gota de solución fisiológica estéril.

Los cultivos serán realizados en medios de Sabouraud y Czapek adicionados de antibióticos.

Las biopsias deben ser trituradas en mortero estéril antes de la siembra y las escamocostras fragmentadas con bisturí estéril en trozos tan pequeño como sea posible. La incubación se efectúa a 28°C. Para la correcta identificación morfológica de la especie deben examinarse cultivos en tubo y en lámina, sobre medios de Sabouraud, Czapek, agar-harina de maíz y agar-extracto de suelo con peptona.

#### Medio de Czapek-Dox

NO <sub>3</sub> Na .....	2 gr.
SO <sub>4</sub> Mg 7 H <sub>2</sub> O .....	1 gr.
Cl K .....	0,50 gr.
SO <sub>4</sub> Fe 7 H <sub>2</sub> O .....	0,01 gr.
Sacarosa .....	30 gr.
Agar-agar .....	20 gr.
Agua destilada ...c.s.p.	1.000 ml.

Disolver las sales sucesivamente en la mitad del volumen de agua destilada y la sacarosa en la otra mitad. Mezclar, llevar a pH 7, agregar el agar y esterilizar a 115°, durante 20 minutos.

#### Agar-harina de maíz:

Harina de maíz decortinado	20 gr.
Agua corriente .....	1.000 ml.
Agar .....	20 gr.

Hacer hervir suavemente durante 45 minutos en un balón los dos primeros componentes, filtrar por gasa, enfriar, agregar el agar y esterilizar a 120°C durante 15 minutos.

#### Agar extracto de suelo:

Hacer hervir durante 15 minutos 500 gr. de tierra de jardín, secada al aire, en 1200 ml de agua corriente. Se filtra por papel de filtro, llevar el volumen a 1000ml, agregar 0,5 gr de PO<sub>4</sub> H<sub>2</sub>K. Se ajusta a pH 7 y se le adiciona 2% de agar. Esterilizar a 120°C durante 15 minutos.

A veces es conveniente agregarle 1% de peptona.

#### Diagnóstico de las micosis gólicas.

La micosis gomosa más común es la esporotricosis y a su diagnóstico nos referiremos en forma exclusiva.

El examen microscópico de los materiales humanos, obtenidos por biopsia cutánea o por punción de un goma, no permite, casi nunca, ver al *Sporothrix schenckii*.

Los cultivos de estos materiales, tratados con antibióticos antibacterianos y sembrados en medios de agar de Sabouraud, agar-sangre o agar-higado con glucosa y vitaminas B1 son siempre exitosos.

Estos medios de cultivos deben contener 100 ug/ml de cloramfenicol y la incubación se efectúa a 28°C y 37°C. Es un microorganismo de desarrollo rápido y difásico. La inoculación experimental se obtiene muy fácilmente en la rata por vía intraperitoneal o intratesticular. Este es el procedimiento de elección para demostrar la fase levaduriforme del *Sporothrix schenckii*.

La histopatología muestra habitualmente una zona central puru-

lenta, una media tuberculoide con células epitelioides y gigantes y una externa sifiloide con infiltrados linfoplasmocitarios, pero al no verse el parásito la mayor parte de las veces es imposible hacer el diagnóstico por este métodos.

#### Reacción de esporotriquina Preparación del antígeno:

Sembrar 5 muestras de *Sp. schenckii* en agar de Sabouraud glucosado adicionado de 50 mg o/oo de cistina repartido en botellas de Roux. Incubar a 37°C, durante 10 días. Suspender el desarrollo en solución fisiológica con perlas de vidrio, agitando frecuentemente.

Retirar la suspensión, hacer frotis y adicionarle 1/10.00 o de Mertiolato de sodio. Calentar a 60°C durante 60 minutos, en 3 días consecutivos.

Equiparar su concentración con la opacidad del tubo n° 5 de la escala de Mac Farland y distribuir en frascos semejantes a los de penicilina.

Las pruebas deben efectuarse inyectando 0,1 ml del antígeno antes referido, en la cara anterior del antebrazo, por vía intradérmica, realizando la lectura a las 48 horas.

Debe tomarse en cuenta el eritema y la infiltración. Su positividad indica infección por el *Sp. schenckii*, sin prejuzgar sobre si esta es activa ó ha ocurrido en el pasado.

Las reacciones serológicas no han sido aún adecuadamente estudiadas en esta enfermedad y resultados no brindan informacio-

nes útiles para el diagnóstico o el pronóstico de la misma.

Kaplan e Ives (1960) presentaron un método que hace posible la visualización directa del *Sp. schenckii* en las lesiones humanas, empleado la técnica de inmunofluorescencia directa, con una antiglobulina específica de conejo marcada con isotiocianato de fluoresceína. Sin embargo no ha sido un método difundido en la rutina del diagnóstico.

#### Diagnóstico de los micetomas

##### a) Obtención y envío del material

Cuando pueda obtenerse abundante pus de las lesiones, este debe ser recogido en tubo estéril y enviado al laboratorio de micología sin el agregado de ninguna sustancia.

En este caso no se aconseja adicionar solución fisiológica con antibióticos porque es muy difícil por la clínica establecer si el micetoma es maduromicótico o actinomicético y los *Actinomyetales* son sensibles a los antibióticos antibacterianos. Cuando la secreción es escasa se aconseja realizar una biopsia, esta debe ser amplia y realizada en ambiente quirúrgico. El material obtenido será dividido en tres trozos, uno se fija en formol al 10%, otro se coloca en solución fisiológica estéril y el tercero en solución fisiológica estéril más antibióticos (cloramfenicol 100 ug/ml). Esta última parte será útil para el examen micológico en el caso que se trate de un micetoma maduromicótico y



la anterior se empleará para el estudio de **Actinomyceetales**.

Una vez llegado el material al laboratorio deben extraerse de los fragmentos de tejido no fijados, la mayor cantidad de granos posible. Son particularmente útiles los de la profundidad pues no está contaminados con bacterias y poseen mayor viabilidad, ya que es frecuente que los granos de las zonas periféricas de las fístulas estén muertos.

Los granos, una vez separados, serán examinados al estado fresco entre porta y cubreobjeto con una gota de azul lactofenol o hidróxido de potasio al 20% o, simplemente, agua destilada.

Si en este examen preliminar se observaran filamentos gruesos de un hongo verdadero con clamidosporos, se trata de un micetoma maduromicótico y debe ser estudiado como tal. Si, por el contrario, se observaran filamentos finos de 1 u, ramificados, debe efectuarse tres frotis con los granos aplastados y realizar coloraciones de Gram, Ziehl — Neelsen común y la modificación de Kinyoun.

Este procedimiento permite confirmar que se trata de un **Actinomyces** y de acuerdo a su acido-resistencia puede tonarse una idea si el agente en cuestión es una **Nocardia** (acido-resistente) o un **Streptomyces** (no acido-resistente).

b) **Técnica de estudio de los micetomas maduromicóticos**

El estudio de los granos tiene gran valor y debe comprender: a) examen macroscópico: forma, color, dimensiones y consistencia; b) examen macroscópico al estado

fresco: forma y diámetro de los filamento, forma, tamaño, frecuencia y distribución de los clamidosporos y presencia o no de cemento intercelular; c) examen microscópico de los cortes histopatológicos, se tendrán en cuenta los elementos ya enunciados, en coloraciones de hematoxilina-eosina, P.A.S. y otras técnicas especiales.

Para los cultivos se separan los granos, levándolos luego 5 ó 6 veces en solución fisiológica estéril adicionada de antibióticos antibacterianos. Terminado el último lavado se los deja en solución fisiológica con antibiótico durante una noche en la heladera.

Al día siguiente se procede a sembrar un total de 50 granos o más, depositando 6 en cada tubo con medio de cultivo adicionado de antibióticos.

Los medios empleados para el aislamiento de los hongos productores de micetomas maduromicóticos son: Sabouraud glucosado o miel, Czapek, agar-papa-zanahoria y agar-extracto de suelo.

La incubación se efectúa a 28° y 37°C.

Una vez obtenido del desarrollo en colonias puras deben examinarse los siguientes caracteres para su correcta clasificación:

1) **Caracteres macromorfológicos:** colonias gigantes en medios de Sabouraud glucosado y Czapek, caracteres del crecimiento en medios de Sabouraud líquido.

2) **Estudios micromorfológicos:** exámenes de preparaciones realizadas por disociación y en micro-

cultivos a partir del desarrollo en los cuatro medios de cultivo mencionado en la parte de aislamiento.

3) **Determinación de la temperatura** óptima de desarrollo.

4) **Estudio de la acción proteolítica:** siembras en medio de Sabouraud gelatino, medio de suero coagulado de Loeffler (semejante al utilizados para **Corynebacterium**) y leche.

5) **Auxanograma de nitrógeno:** se empleará como medio básico el aconsejado por Lodder para el estudio de los hongos levaduriformes, las diferentes fuentes de nitrógeno son adicionadas en soluciones al 2%. El desarrollo será controlado a los 5, 15 y 30 días.

6) **Auxanograma de carbono:** también en este caso se utiliza el medio aconsejado para tal fin en los hongos levaduriformes, las fuentes carbonadas son adicionadas en soluciones el 20%.

7) **Hiarólisis de almidón:** sembrar la cepa aislada en medio de auxanograma de carbono con 20/00 de almidón soluble, la hidrólisis se verifica por el agregado de la solución de lugol empleada en coloración de Gram.

La determinación de la acción patógena en animales de experimentación no es necesaria para la clasificación de estos hongos.

c) **Técnica de estudio de los micetomas por Nocardias y Streptomyces.**

Estudio macromorfológico de los granos, forma, tamaño color y consistencia.

Estudio micromorfológico en frotis realizados a partir de los granos aplastados mediante coloraciones de Gram y Ziehl-Neelsen modificada por Kinyoun.

Fórmula de la carbol-fucsina de Kinyoun:

Fucsina básica 4 gr; cristales de fenol 8 gr; alcohol de 95% 20 ml y agua destilada 100 ml.

La coloración se efectúa con la carbol-fucsina sin calentar dejándola 3 minutos, la decoloración se obtiene con una solución al 1% de ácido sulfúrico y la coloración de contraste con azul de metileno al 1% durante medio minuto.

Tanto las **Nocardias** como los **Streptomyces** son gram-positivos y solamente las primeras son parcialmente acido-resistente.

Los exámenes micromorfológicos de los granos deben ser completados mediante su observación en preparaciones histopatológicas teñidas con hematoxilina-cosina y alguna de las técnicas de Gram y Ziehl-Neelsen para tejidos.

Para la obtención de cultivos se separan los granos, lavados 5 a 6 veces en solución fisiológica o agua destilada estéril sin el agregado de antibióticos.

Luego se procede a sembrar 6 a 8 granos por tubo, procurando que su número total no sea inferior a 50 granos.

Los medios más aconsejados para el aislamiento de estos microorganismos son Lowenstein-Jensen, agar caldo con 5% de glicerina y agar-glucosado de Sabouraud sin antibióticos. Debido al lento desarrollo de algunos **Streptomyces** se aconseja cerrar



los tubos con tapón de goma y parafinarlos. La incubación se efectúa tanto a 28° como a 37°C; los cultivos deben permanecer bajo observación por lo menos 2 meses antes de descartarlos como negativos.

Una vez que se han obtenido cultivos puros, se aconseja realizar los siguientes estudios para la clasificación final de la cepa aislada.

a) Cultivos en gota pendiente, utilizando para ello porta-objetos escavados y cubreobjetos esterilizados, el medio de cultivo será caldo-glicerinado al 5%.

Tiene por objeto demostrar la presencia de micelio ramificado.

b) Comprobación de la acido-resistencia, se efectúa por la técnica de Kinyoun ya descripta.

c) Hidrolisis de la caseína: deben sembrar la cepa aislada en agar-leche por estría y comprobar si se forma o no un halo claro de hidrólisis de la caseína alrededor de la colonia.

El agar-leche se prepara mezclando en caliente partes iguales de agar-agua al 3% esterilizado y leche descremada estéril. La esterilización de ambos se efectúa en autoclave a 120°C 20 minutos.

d) Desarrollo en agua gelatinada al 4 o/oo.

e) Disolución de los cristales de tirosina, xantina e hipoxantina. Se emplea agar-caldo al que se le adiciona una suspensión densa de los cristales de tirosina, xantina e hipoxantina; distribuyéndolos en cajas de Petri por separado.

f) Prueba de ureasa. Empleando el siguiente medio:

Urea .....	5 gr.
Rojo fenol .....	0,0012 gr.
Agua destilada . . . c. s. p.	100 ml.

Esterilizar por filtración. Lectura a las 2 ó 3 horas. El viraje hacia el color violeta indica reacción positiva.

g) Actividad proteolítica. Sembrar la cepa aislada en medio de Sabouraud o caldo-gelatinado al 12%.

h) Actividad amilolítica. Sembrar en agar-caldo adicionado de almidón soluble al 2 0/00. Luego de obtenido el desarrollo se comprueba la hidrolisis del almidón volcando lugol sobre la superficie del medio de cultivo.

i) Acción patógena para el cobayo. Inocular 2 cobayos por cada cepa, con una suspensión densa de microorganismos en agua destilada adicionada de igual volumen de mucins gástrica al 5%. La inoculación se realiza por vía peritoneal y los animales son sacrificados a las 2 y a las 4 semanas.

### Diagnóstico de la Actinomicosis

#### Obtención del material:

De preferencia debe hacerse por punción, con jeringa y aguja estériles, de un absceso cerrado a fin de reducir al mínimo la contaminación bacteriana. En caso contrario se aspirará el material purulento de las fístulas.

En el caso de la actinomicosis torácica no fistulizada, se realizará lavado bronquial o broncoaspiración a fin de evitar errores de diagnóstico por los *Actinomyces* que existen habitualmente en la boca.

Las piezas quirúrgicas serán remitidas en recipientes estériles y sin el agregado de antibióticos.

Nunca debe enviarse un material para el diagnóstico de actinomicosis en solución fisiológica con antibióticos antibacterianos porque los *Actinomyces* son sensibles a ellos.

### Examen de los granos

El material recibido debe volcarse en una caja de Petri estéril colocada sobre un azulejo negro, de esta forma se visualizan y aíslan los pequeños granos blanco-amarillentos.

Estos son aplastados entre los protaobjetos, se realizan dos extendidos, fijándolos y colorándolos por los métodos de Gram y Ziehl-Neelsen (Kinyoun).

Los *Actinomyces* son gram-positivos y no acido-resistentes.

Para la obtención de cultivos puros se lavan los granos 5 a 6 veces en agua destilada estéril a fin de reducir la contaminación bacteriana. Después del último lavado se los aplasta con una pipeta Pasteur contra la pared del tubo, sembrándolos luego por dilución de agar blando:

Agua de carne .....	100 ml.
Hidrolizado de caseína ....	1 gr.
Cloruro de sodio .....	0,5 gr.
Extracto de levadura .....	0,5 gr.
Glucosa .....	1 gr.
Agar .....	0,5 gr.

Debe corregirse a pH 7. Se esteriliza a 115°C 20 minutos, distribuyendo en columna a razón de 10 a 12 ml. por cada tubo de ensayo.

Antes de sembrar el material se lleva los tubos a baño maría hirviendo durante 15 minutos a fin de expulsar el oxígeno.

La incubación se realiza a 37°C.

El estudio de la cepa aislada para su diagnóstico final requiere los siguientes pasos:

a) Examen de los caracteres macro y micromorfológicos de los cultivos en medios sólidos, sobre caja de Petri, después de 48 horas y 10 días de incubación a 37°C.

Para tal fin se colocan las cajas de Petri dentro de cámara de anaerobiosis. El medio empleado es el siguiente:

Infusión de cerebro y co-razón .....	4 gr.
Hidrolizado de caseína ..	4 gr.
Extracto de levadura ...	5 gr.
Dextrosa .....	5 gr.
Agar .....	18 gr.
Agua destilada .....	1.000 ml.

Disolver los componentes, corregir a pH 7. Repartir en tubos a razón de 15 ml cada uno. Esterilizar a 115°C durante 20 minutos en autoclave.

### b) Requerimiento de oxígeno.

Deben sembrar en los medios ya mencionados y se los incuban a 37°C en aerobiosis, en cámaras de anaerobiosis con carbógeno (Nitrógeno 95% + 5% de CO<sub>2</sub>) y en aerobiosis con 10% de CO<sub>2</sub> producido por el método de la vela.

### c) Reducción de nitratos a nitritos.

Se siembra en un medio básico semejante al que se prepara para



caja de Petri pero sin agar y con el agregado de 1 % de NO<sub>3</sub>. Una vez obtenido el desarrollo la presencia de nitritos se determina en la forma habitual mediante el agregado de solución de ácido sulfamílico y dimetil — 2 — nafilamina.

La anaerobiosis se crea colocando arriba del tapón de algodón de cada tubo 5 gotas de solución de pirogalol (ácido pirogálico 100 gr + agua destilada 150 ml) e igual cantidad CO<sub>2</sub> Na<sub>2</sub> al 10%, cerrando el tubo con un tapón de goma.

#### d) Hidrólisis de la gelatina.

El medio empleado es semejante al propuesto para cajas de Petri reemplazando el agar por 100 gr de gelatina. El medio se distribuye en tubos a razón de 8 ml cada uno y la anaerobiosis se obtiene en la misma forma que

#### e) Prueba de leche tornasolada.

Se realiza en la forma habitual en bacteriología, creando la anaerobiosis mediante tapones de algodón embebidos con pirogalol-carbonato de sodio.

#### f) Hidrolisis del almidón.

El medio empleado es semejante al propuesto para cajas de Petri reemplazando la dextrosa por 5 gr. de almidón soluble. Se distribuye a razón de 8 ml cada tubo obteniendo la anaerobiosis mediante la mezcla de pirogalol y carbonato de sodio. La siembra se hace en estría y la lectura se realiza agregando a la superficie

del medio solución de lugol. En caso positivo aparece un halo claro alrededor de la colonia.

#### g) Prueba de catalase.

Tomar un trozo del desarrollo en medio sólido, colocar sobre un portaobjeto y agregar unas gotas de agua oxigenada fresca. Examinando bajo el microscopio con óptica seca de pequeño aumento.

La aparición de burbujas indica resultado positivo.

#### h) Fermentación de azúcares.

El medio básico empleado es el siguiente:

Infusión de cerebro y corazón .....	25 gr.
Hidrolizado de caseína ..	4 gr.
Extrato de levadura .....	5 gr.
Bromocresol púrpura .....	15 ml
..... al 0,04%	
Agua destilada .....	1.000 ml.

Disolver los componentes, corregir a pH 7. Distribuir a razón de 5 ml por cada tubo, colocar dentro un tubo de Durham invertido. Cerrar con tapón de algodón. Esterilizar en autoclave a 120°C 15 minutos. Adicionar soluciones de azúcares esterilizados por filtración para obtener una concentración final del 0,5%. Los azúcares empleados son: glucosa, xilosa, manitol, rafinosa, almidón y glicerol. La anaerobiosis se obtiene por tapones con la mezcla pirogalol carbonato de sodio.

#### i) Acción patógena en el hamster.

Inoculando animales de 4 semanas de edad por vía intraperi-

toneal con una suspensión densa del cultivo en solución fisiológica estéril.

La comprobación de esta propiedad no es indispensable para su clasificación.

#### Diagnóstico de las micosis oportunistas

Estas son afecciones producidas por hongos que habitualmente se comportan como saprófitos o comensales del hombre, formando parte de su flora normal en el intestino, boca o árbol traqueobronquial o hallándose como saprófitos en el suelo o el aire. Estos microorganismos aprovechan las oportunidades que les ofrece el huésped, por disminución de sus defensas locales o generales, para invadir sus tejidos, produciendo alteraciones patológicas que pueden incluso causarle la muerte.

Estas micosis son de distribución geográfica universal y las causas predisponentes más frecuentemente implicadas son: 1) diabetes sacarina; 2) linfomas malignos; 3) leucemias; 4) neoplasias; 5) discrasias sanguíneas graves; 6) tratamientos con antibióticos, corticoides, citostáticos y radiaciones.

Las micosis oportunistas ofrecen serias dificultades de diagnóstico, pues, a diferencia de los hongos patógenos primitivos, el aislamiento de estos hongos en la mayoría de los materiales humanos no tiene de por sí valor diagnóstico. La única evidencia incontrovertible es su hallazgo, por exámenes histopatológicos y cultivos, en las piezas de autopsia. Debemos recordar por lo tanto

que estas deben ser divididas para fijar una parte en formol y dejar el resto en recipientes estériles, a fin de efectuar los estudios micológico y bacteriológico.

Sin embargo durante el curso de la enfermedad podemos tener una orientación diagnóstica basada en los siguientes elementos clínicos y de laboratorios:

1) El hallazgo repetido del hongo en exámenes microscópicos directos de los materiales obtenidos de las lesiones con la máxima asepsia y, si es posible, el estudio histopatológico para documentar la invasión de los tejidos por dicho hongo.

2) La confirmación repetida de su presencia en cultivos, así como su exacta clasificación mediante el estudio de sus propiedades morfológicas y bioquímicas.

3) Demostración de anticuerpos específicos frente a los antígenos preparados con el hongo aislado, mediante pruebas cutáneas y serológicas.

4) Reconocimiento de uno de los factores predisponentes antes mencionados que facilita la invasión del hongo.

5) La respuesta favorable al tratamiento antifúngico. La reproducción de la enfermedad en animales de experimentación está desprovista de todo valor práctico, pues no es el aumento de la patogenicidad del germen, sino la caída de las defensas del huésped lo que determina la aparición de estos procesos.



## Diagnóstico de las Candidiasis diseminadas y viscerales.

### Septicemias por Candida:

El diagnóstico se efectuó por la comprobación en dos o más hemocultivos positivos para la misma especie del género *Candida* y la demostración de anticuerpos específicos mediante pruebas serológicas.

Los hemocultivos deben ser obtenidos durante el pico febril con las condiciones máximas de asepsia. Se empleará jeringa esterilizada a seco con unas gotas de heparina, la desinfección de la piel debe ser efectuada con alcohol yodado. Debe extraerse 15 a 20 ml. de sangre los que serán sembrados en caldo nutritivo, de la misma forma que se procede para efectuar un hemocultivo para bacterias.

El medio recomendado es el siguiente:

Caldo para hemocultivo:

Caldo de carne .....	1.000 ml.
Hidrolizado de caseína ..	10 gr.
Cloruro de sodio .....	5 gr.
Glucosa .....	10 gr.
Agar .....	1 gr.

Distribuir en balones a razón de 100 ml cada uno, ajustar a pH 7 y esterilizar a 120°C 20 minutos.

Sembrar los 20 ml de sangre heparinizada en un balón, incubar a 37°C y examinar diariamente.

Las colonias de *Candida* aparecen habitualmente en el fondo del recipiente, pegadas a los glóbulos rojos, en forma de copos blanquecinos.

Debe extraerse una de esas colonias con pipeta Pasteur, examinarla microscópicamente entre porta y cubreobjeto, anotando la presencia de elementos levaduriformes y pseudomicelio en caso positivo.

Se procede luego a sembrar por diseminación una placa de Petri con medio de agar-miel o agar-glucosado de Sabouraud, a fin de obtener colonias separadas. Después de 48 horas de incubación a 37°C se toma con ansa una de las colonias aisladas, sembrando dos tubos de agar-miel de Sabouraud y a partir de ellos se efectuará todo el estudio correspondiente para clasificar a un hongo levaduriforme.

### Estudio de los hongos levaduriformes.

#### Caracteres morfológicos:

#### a) Formación de pseudomicelio y clamidosporos.

Sembrar haciendo una incisión en medios de Czapeck y agar-papa-zanahoria más 15% de bilis estéril.

Medio de papa-zanahoria-bilis: pulpa de zanahoria 20 gr, pulpa de papa 20 gr, agua 1.000 ml. Hacer macerar durante 1 hora, hervir 5 minutos, filtrar, agregarle 20 gr de agar, fundir, repartir y esterilizar 120°C 15 minutos.

Agregar a este medio 15% de bilis estéril.

Incubar a 37°C y examinar a las 48 horas y a la semana.

#### b) Formación de endosporos.

Sembrar en medio de Gorodkova. Peptona 10 gr; extracto de

carne 10 gr; glucosa 2,50 gr; cloruro de sodio 5 gr, agar 20 gr; agua destilada 1.000 ml. Ajustar a pH 7. Esterilizar a 120°C durante 20 minutos.

Incubar a 28°C durante 1 mes.

#### c) Formación de tubos germinativos.

**Sembrar abundantemente 1 tubo de hemólisis esterilizado que contenga 1 cm<sup>3</sup> de plasma estéril e incubar a 37°C durante 2 horas**

#### d) Desarrollo en medio líquido.

Sembrar en medio de Sabouraud glucosado sin agar o en mosto, incubar a 37°C y anotar a la semana la formación de depósito, anillo ó película.

#### e) Dimensiones.

Tomar un ansa del desarrollo en medio líquido después de 3 días de incubación y, mezclar, sobre un portaobjeto desengrasado, con 1 gota de tinta china diluida y proceder luego como para hacer un frotis de sangre. Dejar secar, fijar a la llama de un mechero y examinar con óptica de inmersión. Las dimensiones se toman con ocular micrometrado debidamente calibrado.

#### f) Colonia gigante en agar-glucosado de Sabouraud.

Sembrar en el centro de una placa de Petri, incubar durante 15 a 20 días a 28°C.

#### Caracteres bioquímicos:

a) **Zimograma.** Es el estudio de las propiedades fermentativas sobre hidratos de carbono.

El medio básico empleado es el agua de levaduras con albúmina, adicionado de indicador de Andrade para detectar la formación de ácidos.

Para preparar el agua de levaduras se suspenden 200 gr. de levadura prensada en 1 litro de agua destilada, se bate bien con una varilla, agregándole luego 1 gr. de albúmina de huevo desecada. Llevar al autoclave a 120°C durante 10 minutos. Filtrar por algodón, corregir a pH 7 y adicionarle el indicador de Andrade (2 ml por cada 100 ml de medio). Repartir en tubos finos a razón de 1,8 ml cada uno y esterilizar a 115°C durante 15 minutos.

Para realizar el zimograma se necesitan soluciones al 20% de seis azúcares (glucosa, galactosa, lactosa, maltosa, sacarosa y rafinosa) esterilizadas por filtración en filtros Seitz o por bujía.

Agregar 0,2 ml de dichas soluciones a cada tubo de agua de levaduras y llevarlos a baño-maría hirviendo durante 10 minutos a fin de expulsar el oxígeno.

Dejar enfriar, sembrar con el hongo a estudiar y luego cubrir con una mezcla fundida de 1 parte de vaselina líquida y 5 de parafina fusible a 55°C. De esta manera se forma un tapón que será desplazado hacia arriba por la formación de gases en casos de fermentación positiva.

La incubación se efectúa a 37°C y resultado es anotado a la semana o a los 10 días.

b) **Auxanograma de los hidratos de carbono.** Este procedimiento permite demostrar las propiedades de asimilación de las



diferentes fuentes carbonadas que posee una determinada levadura.

El medio básico empleado es el siguiente: Sulfato de amonio 0,5 gr, fosfato monopotásico 0,1 gr, sulfato de magnesio 0,05 gr, agar lavado 2 gr. y agua destilada c.s.p. 100 ml. Mezclar, fundir y distribuir en tubos a razón de 15 ml de medio en cada uno. Esterilizar en autoclave a 120°C durante 15 minutos. Para realizar el estudio auxanográfico se funde un tubo en baño-maría, se lo deja enfriar a 48°C sembrándolo densamente con la levadura a estudiar y se lo vierte en una placa de Petri. Una vez solidificado se lo pone a secar en una estufa de 37°C durante 10 minutos y luego se realizan seis orificios con un sabocado flameado. Estas cavidades son llenadas con la mismas soluciones de azúcares empleadas en el zimograma.

La incubación se hace a 28°C durante 4 días, al cabo de los cuales se anota como positivo aquél azúcar que presente un halo opaco, de intenso desarrollo a su alrededor.

**c) Utilización del alcohol etílico:** Para esta determinación, debe emplearse el mismo medio que para auxanograma de carbono pero sin agar, se distribuye en tubos con 5 ml cada uno, agregándole en el momento de realizar el estudio, alcohol etílico absoluto hasta la concentración final del 3%.

Se lo siembra con el hongo en estudio, observándose a la semana de incubación a 28°C si presenta desarrollo o no.

**d) Auxanograma de fuentes nitrogenadas:** Se preparan soluciones al 2% de peptona, urea, sulfato de amonio y nitrato de potasio y nitrato de potasio y se las esteriliza por filtración.

El medio básico empleado es: glucosa pura 2 gr, fosfato monopotásico 0,1 gr, sulfato de magnesio 0,05 gr, agar lavado 2 gr. y agua destilada c.s.p. 100 ml.

La forma de siembra y lectura es semejante a la ya descripta para el auxanograma de carbono.

El nitrato de potasio es la fuente de mayor interés taxonómico, pudiendo realizarse este estudio sólo con ella y sulfato de amonio como control.

**e) Acción sobre la leche tornasolada:** Se emplea la leche tornasolada usual en los exámenes bacteriológicos, anotando a la semana si ha habido cambios o no (modificaciones de color, coagulación, digestión del coagulo etc.).

**f) Prueba de ureasa:** su procedimiento ya fué descripto anteriormente.

**g) Hidrolisis de la arbutina:** El medio básico es agua de levaduras con 2% de agar y 0,5% de arbutina. Se adiciona una gota de solución de cloruro de hierro al 3% para cada 15 ml de agar fundido y se vuelca en una caja de Petri.

Sembrar en estría. La hidrólisis se demuestra por la aparición de una coloración parda alrededor de la colonia.

La clasificación completa demanda pues, 1 mes, plazo que no puede ser esperado para tomar

una decisión respecto al tratamiento del paciente.

Adoptamos como regla considerar que el enfermo padece una septicemia por *Candida* cuando presente cuadro séptico, dos o más hemocultivos positivos (obtenidos con la técnica indicada) y reacciones de fijación de complemento e inmunodifusión en gel de agar positivas con antígenos endocelulares de *Candida*. Independientemente se inicia el estudio completo de los hongos aislados de los diferentes hemocultivos a fin de determinar si es el mismo.

#### Preparación de antígeno de *Candida* para reacciones serológicas:

Sembrar dos cepas de *Candida albicans* en medio de agar caldo glucosado al 1%, distribuido en botellas de Roux. Incubar a 37°C durante 48 horas y suspender el desarrollo en solución fisiológica estéril con parla de vidrio. Los elementos levaduriformes son lavados 3 veces en solución fisiológica estéril y suspendidos finalmente en la misma solución a razón de 250 mg. de peso húmedo por mililitro.

La raptura de las células se efectúa en un aparato Solvall Ribi Cell fractionator a 20.000 libras de presión o en aparatos de ultrasonidos. Se separa el sobrenadante por centrifugación a 5000 r.p.m. durante media hora, filtrándolo luego por papel de filtro mojado en agua destilada y adicionándole mertiolato borato de sodio al 1/10.000 como conservador.

Este antígeno es empleado puro para las pruebas de inmunodifusión y diluido 1/20 para las de fijación de complemento.

El diagnóstico de las endocarditis por *Candida* es realizado en la misma forma que para las septicemias. En el diagnóstico de las candidiasis pulmonares deben tenerse en cuenta los siguientes elementos: 1) presencia reiterada del hongo en los exámenes directos, en especial si se lo observa al estado de pseudomicelios y en el material obtenido por broncoaspiración; 2) desarrollo de abundantes colonias en los cultivos y comprobar que el hongo aislado es siempre del mismo género y especie (tiene particular importancia la especie *Candida albicans*, que puede ser identificada por procedimientos morfológicos, formación de tubos germinativos y clamidosporos, en 48 a 72 horas); 3) comprobación de reacciones serológicas positivas; 4) ausencia de toda otra etiología que pueda explicar el cuadro clínico del paciente y 5) mejoría con el tratamiento específico.

**Técnica del recuento de colonias en el material de esputo y lavado bronquial:** Digerir dichos materiales con una solución con una solución estéril de tripsina al 0,25%, durante 1 hora a 37°C.

Centrifugar 2.000 r.p.m. durante 10 minutos y examinar microscópicamente el sedimento entre porta y cubreobjeto con óptica seca fuerte. Si se observa la presencia de elementos levaduriformes o pseudomicelio, se procede a diluir el sedimento al 1/10 ó 1/100 en agua destilada,



en caso contrario se procede a sembrar el material puro.

Sembrar un asa calibrada de 10 mg de peso húmedo en una placa de Petri de agar-miel con 100 ug/ml de cloranfenicol y diseminar con espátula. El recuento de colonias se efectúa después de 3 a 6 días de incubación a 28°C.

De la misma forma puede procederse para otros exudados y para recuento de colonias en orina, sólo que en este último caso la homogenización no se efectúa.

#### Técnica de recuento de colonias de *Candida* en materias fecales:

Recoger materia fecal, separada de orina, con una cuchara previamente flameada en alcohol y colocar el volúmen de una cuchara previamente flameada en alcohol y colocar el volúmen de una cucharada en un frasco estéril de boca ancha y tapa esmerilada. Remitirlo lo antes posible al laboratorio y si va a tardar más de 2 horas, refrigerarlo. En el laboratorio, se le adicionan dos volúmenes de ácido cítrico al 10%, para eliminar la flora bacteriana, dejando la muestra así tratada durante 24 horas en la heladera, seguidamente se procede a homogenizarla con una varilla estéril y a filtrarla por doble gasa. El filtrado se recoge en un tubo de centrifuga y se lo centrifuga a 2.000 r.p.m. durante 10 minutos, eliminando, luego, los más completamente posible, el líquido sobrenadante.

El sedimento es examinado microscópicamente entre porta y cubreobjeto con una gota de agua destilada o de Lugol. Si acusa la

presencia de elementos levaduriformes o pseudomicelios, es un índice de aumento anormal de la flora micológica y debe diluirse para la siembra.

Para el recuento se procede a sembrar una caja de Petri de agar-miel de Sabouraud en la misma forma ya referida para el esputo y demás secreciones.

Se considera normal hasta 5.000 colonias de *Candida* por gramo de materia fecal. El aumento de colonias tiene importancia para el diagnóstico de las gastroenteritis moniliaicas y como señal de alarma para prever la posibilidad de una micosis oportunista.

**Diagnóstico de las aspergilosis broncopulmonares:** Debe quedar bien establecido que el aislamiento de una especie del género *Aspergillus* en cultivos de esputo o lavado bronquial, no tiene, por sí sola, valor diagnóstico de enfermedad micótica. Pero la obtención de cultivos positivos a partir de piezas quirúrgicas, de punciones pulmonares transparietales o de contenido pleural, tiene valor diagnóstico absoluto, pues en estos materiales no se los encuentra como contaminantes.

Cuando existe un verdadero aspergilloma, no siempre el agente causal está presente en las secreciones bronquiales o en el esputo, sea porque la cavidad que lo contiene no posee comunicación con bronquio o está se presenta obturada por secreciones o el aspergilloma no libera hifas ni esporos y otras veces estos elementos carecen de vitalidad. Por lo dicho anteriormente noso-

tros preferimos el examen de muestras seriadas de esputo, obtenidas cada 2 ó 3 días en lugar del lavado bronquial que difícilmente puede ser repetido.

El material de expectoración debe recogerse en ayunas luego de una cuidadosa higiene bucal y será examinado dentro de las 2 ó 3 horas de obtenido.

En el examen de las preparaciones al estado fresco, entre porta y cubreobjeto con una gota de solución fisiológica estéril, pueden observarse, en los casos positivos fragmentos de bifas tabicadas, a veces con ramificaciones, de paredes gruesas y refringentes, con algunas inclusiones de grasa en su citoplasma. Sólo en raras oportunidades se ve el esporóforo completo que permite la indentificación total de hongo por el simple examen directo. Es aconsejable realizar la observación en fresco, montando otras preparaciones con lacto-fenol o potasa al 20% para observar mejor los filamentos.

Los cultivos deben efectuarse en diversos medios, se recomiendan, el de Sabouraud glucosado o con miel, el agar caldo de hígado con glucosa y vitamina B1 y el medio de Czapeck. Se siembran 4 a 6 tubos por cada material los que serán incubados a 28°C y 37°C, recordando que esta última es la temperatura óptima de crecimiento del *A. fumigatus*, pudiendo observarse colonias ya al 2º ó 3º día de incubación.

La obtención de cultivos puros de *A. fumigatus* u otras especies del género, con colonias muy abundantes, en reiteradas muestras de esputo, especialmente si

una o más de ella han presentado fragmentos de hifas en el examen microscópico al estado fresco, tiene un valor diagnóstico de importancia.

Las piezas de resección quirúrgica deben ser partidas, una porción será enviada en solución fisiológica estéril para el examen micológico y la otra, en formol, para el histopatológico.

La parte enviada para el examen micológico debe ser grande, luego será fragmentada en trozos muy pequeños y sembrada en 6 a 10 tubos de los medios ya mencionados.

Se han comprobado aspergillomas muertos.

#### Reacciones serológicas.

#### Antígenos micelial:

Sembrar una suspensión densa de esporos en medio de Czapeck Dox líquido, envasado en frascos de Erlenmeyer de 300 ml. conteniendo 150 ml de medio cada uno. Los frascos sembrados son incubados en agitador rotatorio a razón de 90 ciclos por minuto, a 37°C. de temperatura y durante 4 días. Luego el micelio es separado por filtración a través de dos capas de papel de filtro y se lo suspende en agua destilada a razón de 200 mg de peso húmedo por ml. La suspensión es homogeneizada en un aparato tissue Grinder nº 4288 E. y luego tratada con ultrasonidos mediante dos "Shocks" de 15 minutos cada uno.

El líquido sobrenadante es separado por centrifugación a 5.000 r.p.m. durante 15 minutos y adl-



cionado do mertiolato — borato de sodio como conservador.

Este antígeno es útil para pruebas de inmunodifusión e inmunoelectroforesis, pero resulta anticomplementario para la reacción de fijación de complemento.

#### Antígeno metabólico:

Se prepara de la misma forma que los antígenos de micosis sistémicas para serología.

Para la prueba de fijación de complemento es utilizado en la dilución 1/4 y para las reacciones de inmunodifusión e inmunoelectroforesis se lo concentra 10 veces por evaporación.

Debido a que poseen pocos antígenos comunes, para el diagnóstico serológico, deben utilizarse antígenos preparados con *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. nidulans* y *A. flavus*.

Las pruebas de fijación de complemento e inmunodifusión en gel de agar son realizadas con la misma técnica que fué descrita para micosis sistémicas.

#### Reacción de inmunoelectroforesis:

Como sustrato se utiliza agar Noble (Difco) al 3% en agua destilada, al cual se le adiciona, en el momento de ser usado, igual volumen de una solución "buffer" de veronal pH 8,6 fuerza iónica 0,05 M, de manera que la concentración final del agar es del 1,5%.

Las corridas se efectúa sobre porta objetos de 7,5 x 2,5 cm los que son cubiertos por 4 ml. de agar cada uno. Debe prepararse

un esquema con una canaleta central y dos orificios periféricos. En los últimos se siembran 25 (u) de antígeno (partes iguales de antígeno (partes iguales de antígeno metabólico y miceliar) y en la canaleta central 100 (u) del suero a estudiar. El suero debe adicionarse después de haber realizado la corrida electroforética del antígeno en una solución "buffer" de veronal pH 8,6 fuerza iónica 0,05 M, con corriente continua a razón de 5 miliamperios por cada portaobjeto, durante 2 horas.

Las placas se dejan en cámara húmeda durante 24 horas, luego, se las lava en solución fisiológica durante 3 días, se secan en estufa de 37°C y son coloreadas con Amido Schwartz.

#### Identificación de la especie de *Aspergillus*.

Deben tenerse en cuenta los siguientes caracteres:

Examen macromorfológico de colonias gigantes en medio de Czapeck-Dox; estudio micromorfológico con descripción del micelio vegetativo (forma y dimensiones), morfología y dimensiones del micelio vegetativo (forma y dimensiones), morfología y dimensiones del esporóforo, vesícula aspergillar, esterigmas y esporos y examen de la fructificación sexual si la presenta.

El estudio de la acción patógena experimental para palomas y conejos no es indispensable para la clasificación.

#### Diagnóstico de aspergilosis broncopulmonar:

Debe considerarse que un enfermo padece esta afección cuando

do se comprueba la presencia de filamentos en el examen microscópico al estado fresco en una o más muestras de esputo, cuando se aísla por cultivos en forma reiterada la misma especie de *Aspergillus*, presentando pruebas serológicas positivas con la formación de 2 ó más bandas de precipitado en las reacciones de inmunodifusión e inmunoelectroforesis.

El diagnóstico de absoluta certeza se obtiene por los exámenes micológico e histopatológico de las piezas de resección quirúrgica o las punciones biopsias.

#### Diagnóstico de las micosis superficiales:

Las micosis superficiales son aquellas que atacan la capa cornea de la piel y sus faneras y la superficie de las membranas mucosas.

#### 1) Micosis que atacan la capa cornea de la porción extrafolicular de los pelos.

1) **Obtención del material:** cortar los pelos con tejera, colocarlos entre dos portaobjetos, previamente flameados sobre un mechero Bunsen, luego envolverlos en un papel y rotularlos adecuadamente.

2) **Examen microscópico:** fragmentar, con bisturí flameado, la porción parasitada del pelo en trozos de 3 a 4 mm.

**Preparación con hidróxido de potasio:** colocar los fragmentos de pelo sobre un portaobjeto, cubrirlo luego con un cubreobjeto que contenga una gota de hidró-

xido de potasio al 40%, calentar luego la preparación sobre la llama veladora de un mechero de Bunsen hasta desprendimiento de burbujas, dejar enfriar y hacer una ligera presión sobre el cubreobjeto. Examinar con óptica seca fuerte.

Esta preparación permite ver los agentes etiológicos de las Piedras (*Trichosporon beigelli* y *Gl-giganteum* y *Piedraia hortai*).

**Preparación coloreada:** aplastar los fragmentos del pelo parasitado entre dos portaobjetos con una gota de suero, para adherirlos. Se los fija al calor y tiñen con una solución de azul de metileno al 1% durante 5 minutos.

Se leva la preparación con precaución, para no desprender el material, sumergiendo el portaobjeto suavemente en un vaso con agua, repetir esta operación 2 ó 3 veces, secar en estufa de 37° y observar con objeto de inmersión.

Esta preparación es útil para visualizar a la *Nocardia tenuis* agente de la Tricomocosis axilar.

3) **Cultivos:** Para sembrar el material corneo se emplea un hilo de "nicrom", acodado en ángulo recto, que recibe el nombre de gancho. El material se fragmenta en trozos tan pequeños como sea posible, con un bisturí flameado.

Flamear el gancho en un mechero y enfriarlo sobre la superficie del medio de cultivo (quedando así barnizado con el mismo, lo que facilita la tarea de tomar las partículas de material que luego son depositadas en una serie lineal sobre la superficie del medio, separando una siembra de



la otra por una distancia de 1 cm aproximadamente.

El medio de cultivo empleado es el agar miel o agar glucosado de Sabouraud y Lactrimel<sup>1</sup> adicionados de 100 ug/ml de cloramfenicol. La incubación se efectúa a 28° y 27°C durante 15 días ó más.

Para la clasificación exacta de la *Piedraia hortai* es suficiente con el examen macro y micromorfológico de los cultivos; por el contrario para clasificar especies del género *Trichosporon* es necesario recurrir a un plan similar al enunciado para el estudio del género *Candida*. La *N. tenuis* no es cultivable.

## II) Micosis que atacan la capa cornea de la piel lampiña exclusivamente.

**Obtención del material:** recoger escamas sobre un portaobjetos colocado de canto sobre el límite inferior de la lesión, raspando la misma con un bisturí sumergido en alcohol y flameado previamente. Colocar luego otro portaobjetos flameado sobre el que contiene el material corneo, envolver en papel y rotular adecuadamente.

**Examen microscópico:** fragmentar las escamas con un bisturí flameado y proceder a efectuar los dos tipos de preparaciones ya descriptas en el tópico anterior.

El examen con hidróxido de potasio al 40% en caliente es útil para observar los filamentos del *Epidermophyton floccosum* agente del eczema marginado de Hebra. Los preparados teñidos

con azul de metileno al 1% permiten visualizar a la *Nocardia minutissima* agente del eritrasma y a la *Malassezia furfur* que produce la pitiriasis versicolor.

**Cultivos:** cortar las escamas en trozos tan pequeños como sea posible con bisturí flameado y proceder a sembrarlos en la misma forma expresada en el tópico anterior.

El medio de cultivo empleado es el de Sabouraud glucosado o Lactrimel adicionados de cloramfenicol. Habitualmente el examen macro y micromorfológico de los cultivos permite la identificación del *Epidermophyton floccosum*.

Miel .....	20 ml.
Harina de trigo .....	10 gr.
Leche .....	200 ml.
Agar .....	15 gr.
Agua destilada .. c.s.p.	1.000 ml.

Esterilizar a 115°C durante 20 minutos.

La *Nocardia minutissima* y la *Malassezia furfur* son microorganismos incultivables en medios habituales, el primero de ellos ha sido cultivado en circunstancias especiales en un medio con suero feto bovino.

## III) Hongos que atacan la capa cornea de la piel y sus faneras.

a) **Microsporias:** estas dermatomycosis atacan el cuero cabelludo del niño en preparaciones con hidróxido de potasio al 40% en caliente.

En las escamas se observan filamentos con un aspecto que es común a todos los dermatofitos,

en los pelos se ven esporos con una distribución en forma de vaina alrededor del tallo del pelo, que permite identificarlo como pelo microspórico.

**Cultivos:** tanto el procedimiento de sistema como el medio de cultivo son los mismo que para el caso del *E. floccosum*. La incubación se efectúa a 28°C durante 15 días al cabo de los cuales se describe la macromorfología de la colonia (tamaño, forma, color, tipo de micelio aéreo y color por el reverso). Luego se obtiene un trozo de la misma con el gancho y se la disocia sobre un portaobjetos con agujas de disección, efectuando una preparación montada entre porta y cubreobjeto una gota de azul lactofenol.

Por lo general los datos macro y micromorfológicos así obtenidos permiten la clasificación por género y especie todos los miembros del género *Microsporum*.

**Fórmula del azul lactofenol:** fenol en cristales 20 gr; ácido láctico 20 gr; glicerina 40 gr; azul "cotton" Poirrer 0,05 gr y agua destilada s.s.p. 100 ml.

b) **Tricofitias:** estas dermatomycosis atacan el cuero cabelludo, la barba y el bigote, las uñas y la piel lampiña.

**Obtención del material:** para el caso de escamas y pelo se realiza en la misma forma que para las microsporias. El material de uñas debe obtenerse por raspado, con bisturí flameado, de la tabla interna de las uñas, en la zona de hiperqueratosis que se forma

entre dicha tabla y el lecho subungueal. Como en los casos anteriores, las uñas son recogidas entre dos portaobjetos flameados.

**Exámenes microscópicos:** debe efectuarse en preparaciones con hidróxido de potasio al 40% en caliente, tanto en las uñas como en las escamas se observan filamentos con los mismos caracteres morfológicos que los restantes Dermatofitos. El examen de los pelos permite reconocer que son tricofíticos por presentar esporos rectangulares agrupados en cadenas y comprobar si son endothrix (invaden el interior del tallo del pelo), ectothrix microides o megasporado (atacan por fuera del tallo del pelo) o necendothrix (que atacan tanto por fuera como por dentro del tallo del pelo).

El caso de la tiña fávica también su pelo ofrece un aspecto microscópico peculiar que permite identificarlo.

**Cultivos:** la técnica de siembra, el medio de cultivo, la incubación, los exámenes macro y micromorfológicos de los cultivos son realizados en la misma forma que para los *Microsporum*.

Para la identificación de las especies del género *Trichophyton* debe recorrirse con frecuencia a estudios especiales que a continuación enumeramos y describimos.

1) **Prueba del ataque de los pelos humanos "in vitro"**, permite demostrar la formación de órganos perforadores.

Colocar en una caja de Petri 25 ml. de solución fisiológica es-



téril, dos gotas de extracto de levadura al 10% y una buena cantidad de pelos humanos cortados en una longitud de 1 cm. y esterilizados en autoclave. Se los siembra con una suspensión de esporos de cultivo puro y se efectúa la observación después de 15 días de incubación a 28°C montando los pelos entre porta y cubreobjeto con una gota de azul lactofenol.

2) **Inoculación experimental al cobayo:** reducir a una pasta el material del cultivo moliéndolo en un mortero, depositar esta pasta en la superficie de un papel de. lija 00 montado en una tablita y se lo frota en la superficie de la piel depilada del flanco.

Al cabo de 8 a 10 días aparecen lesiones escamocostrosas que deben ser examinadas microscópicamente, a fin de comprobar si el dermatofito aislado es capaz de producir tiña en el cobayo y el tipo de invasión pilosa que determina.

3) **Estudio de la fructificación sexuada:** preparar una caja de Petri conteniendo tierra de jardín estéril y pelos de caballo igualmente esterilizados en autoclave, humedecer con solución fisiológica estéril y sembrar abundantemente con una suspensión de esporos de cultivo puro. La incubación se efectúa a 28°C durante dos o tres meses.

Los dermatofitos son con frecuencia heterotallicos y no se logra la producción de la fase sexuada cuando se lo siembra solo, en este caso repetir las siembras en cajas separadas conteniendo

cepas patrones de la misma especie con signo sexual diferente.

#### 4) Estudio de los requerimientos nutritivos especiales.

##### Estudio de los requerimientos vitamínicos y de amino ácidos.

Medio básico (agar-caseína):

Caseína hidrolizada hidrólisis ácida libre de vitaminas	25 gr.
Glucosa	40 gr.
SO <sub>4</sub> Mg 7 H <sub>2</sub> O	0,10 gr.
PO <sub>4</sub> H K	1,8 gr.
Agar-agar	20 gr.
Agua destilada	1.000 ml.

Disolver por calentamiento. Ajustar a pH 6,8. Distribuir en frasco conteniendo 100 ml. de medio cada uno, esterilizar en autoclave a 120°C. durante 15 minutos.

##### Soluciones madres de vitaminas:

A) Clorhidrato de tiamina	10 mg.
Agua destilada pH 4 a 5	1.000 ml.

Esterilizar en autoclave a 120°C 10 minutos y conservar a 5°C.

B) 1-Inositol	250 mg.
Agua destilada	100 ml.

Esterilizar igual al caso anterior.

C) Acido nicotínico	10 mg.
Agua destilada	100 ml.

Esterilizar y conservar igual que la tiamina.

Los medios de prueba para requerimientos vitamínicos se preparan agregando 2 ml. de las

soluciones madres de vitaminas a 100 ml. de agar-caseína.

**Agar nitrato de amonio:** se prepara igual que el agar-caseína reemplazando la caseína por 1,5 gr. de nitrato de amonio.

##### Solución madre de histidina:

D) 1-histidina	150 mg.
agua destilada	100 ml.

Esterilizar en autoclave a 120°C 10 minutos y conservar a 5°C.

El medio de prueba con histidina se prepara agregando 2 ml. de la solución madre a 100 ml. del medio de agar-nitrato de amonio.

##### Técnica de preparación de la Tricofitina:

En general se prepara sembrando cepas de un **Trichophyton**, un **Microsporium** y un **Epidermophyton**, en medio de Sabouraud glucosado líquido, dispuesto en frascos de Erlenmayer o botellas Roux con 1 a 2 cm. de altura de capa líquida. La incubación se efectúa a 28°C durante 3 meses, luego se separa la capa miceliana por filtración con papel de filtro. El líquido restante se esteriliza por filtración por filtro Seitz y se le adiciona Meritolato-borato de sodio al 1/10.000 como conservador.

Inicialmente debe emplearse en distintas diluciones para comprobar su potencia antigénica.

Se inyecta 0,1 ml. de la dilución adecuada, sobre la anterior del antebrazo por vía intradérmica. La lectura se efectúa a las

24 y 48 horas igual que una reacción Mantoux.

##### IV) Hongos que parasitan la piel, mucosas y uñas.

**Candidiasis superficiales:** son como su nombre lo indica micosis superficiales producidas por hongos del género **Candida**, principalmente cuatro especies, **C. albicans**, **C. tropicalis**, **C. stellatoidea** y **C. parapsilosis**.

**Recolección del material:** se realiza en la forma usual para el examen de escamas. El material de uñas debe obtenerse, en el caso de las onixis con perionixis, por raspado de los bordes laterales de las uñas y cuando se trate de onicolisis por raspado de la tabla interna de la uña en la zona que se encuentra despegada del lecho subungueal.

La recolección del material de las lesiones mucosas se efectúa con hisopo estéril.

**Examen microscópico:** cuando se trate de escamas o uñas se examinará con hidróxido de potasio al 40% en caliente. Para las secreciones obtenidas de lesiones mucosas, no es necesario efectuar preparaciones con hidróxido de potasio, examinándolas al estado fresco entre porta y cubreobjeto con una gota de solución fisiológica estéril. En este último caso pueden hacerse frotis y teñirlos por la técnica de Gram.

**Cultivos:** los hongos del género **Candida** desarrollan bien en medios de Lactimel o agar-glucosado de Sabouraud y su crecimiento se torna visible a las 48 horas de



incubación a 37°C; de todas maneras no conviene eliminar los tubos sembrados antes de los 10 días.

Las siembras del material de escamas y uñas se efectúa con la misma técnica descrita para los Dermatofitos.

El medio de cultivo debe contener 100 ug/ml de cloramfenicol para eliminar la contaminación bacteriana.

El material obtenido de las lesiones mucosas es sembrado pasano el hisopo por la superficie del medio de cultivo, en este caso la contaminación bacteriana puede ser evitada sumergiendo el hisopo en una solución estéril de ácido cítrico al 10%.

La identificación del género y especie que determina la lesión debe realizarse de acuerdo a la técnica expuesta al referirnos a las micosis oportunistas.

**Preparación de la Candidina para pruebas cutáneas:** se efectúa en la misma forma que la tricoftina.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AJOLLO, L. et al. — 1962. Laboratory Manual for Medical Mycology. Communicable Dis. Center. Atlanta, Georgia.
2. BIER, OTTO. — 1969. Bacteriología e Inmunología. López Libreros Ed.
3. EMMONS, C. W., Binford, Ch.H. & Utz, J. P. — 1963. Medical Mycology. Lea & Febiger. Philadelphia.
4. FAVA NETTO, C. — 1961. Contribuição para o estudo imunológico da blastomicose de Lutz. Rev. Inst. A. Lutz, 21, 99-194
5. LACAZ, C. DA SILVA. — 1967. Manual do Micología Médica. Edicoes Sarvier. Universidad de São Paulo. Brasil.
6. LODDER, J. AND KREGER — Van Rij, N. é. W. — 1967. The Yeasts. A taxonomic study. North Holland Publ. Co. Amsterdam.
7. NEGRONI, P. — 1969. Micosis cutáneas y viscerales. López Libreros. Bs. As.
8. NEGRONI, P. — 1942. ermatomicosis. Diagnóstico y tratamiento. A. López.
9. NEGRONI, P. — 1954. Micosis profundas. Vol. I Los micetomas. El ateneo.
10. NEGRONI, P. — 1960. Micosis profundas. Vol. II. Histoplasmosis. Comisión Invest. Cientif. Pcia. Buenos Aires.
11. NEGRONI, P. 1967. Micosis profundas. Vol. III. Las blastomicosis y coccidioidomicosis. Comisión Invest. Cientif. Pcia. Buenos Aires.
12. NEGRONI, R., NEGRONI, P. Y BACHMANN, A. E. — 1967. Algunos aspectos inmunológicos de la histoplasmosis en la Argentina. Rev. Derm. Ibero-latino-americana, (1), 41-48.
13. NEGRONI, R. Y NEGRONI, P. — 1968. Antígenos del *Paracoccidioides brasiliensis* para reacciones serológicas. Mycopath. et Myc. appl., 34 (3-4) 285-288.
14. NEGRONI, R. — 1968. Observaciones personales sobre la micosis de Lutz. Tesis de doctorado. Buenos Aires.
15. RAY, J. & KADULL, P. Y. — 1964. Agar-gel precipitation technique in anthrax antibody determinations. Appl. Microb., 12, (4), 349-354
16. SEGRETAIN, G., DROUHET, E. et MARIANT, F. — 1958. Diagnostic de laboratoire en Mycologic Médicale. Ed. de la Tourelle. St. Mandé (Seine).
17. REBELL, G., TAPLIN, D. & BLANK, H. — 1964. Dermatophytes. Their recognition and identification. Dermatology Found. of Miami. 1020 NW 16th Street. Miami. Florida. U.S.A.