

**MESA REDONDA SOBRE EL DIAGNOSTICO
PRACTICO DE LAS MICOSIS**

PROPOSITO: Exponer los métodos más expeditos y eficaces para el diagnóstico de las micosis en nuestro medio; diagnóstico de enfermedad, evolución y curación. SALON ARAGUA

Viernes 14

PRESIDENTES HONORARIOS: Dr. Raimundo Martins Castro
Dr. William Kaplan

COORDINADOR. Dr. Dante Borelli

MODERADOR: Dr. J. Homez Chacín

TIÑA

Dra. Carmen Marcano

TIÑA NEGRA

Dra. Carmen Marcano

PITRIASIS VERSICOLOR

Dr. Hernán Vargas

PILONODOSIS

Dr. Hernán Vargas

CANDIDIASIS

Dra. Mildred Feo

ESPOROTRICOSIS

Dra. Homagdy Rodríguez de Arévalo

CROMOMICOSIS

Dra. Homagdy Rodríguez de Arévalo

LOBOMICOSIS

Dr. Francisco Battistini

PARACOCCIDIOIDOSIS

Dr. Raimundo Martins Castro

COCCIDIOIDOSIS Dr.

Humberto Campins

HISTOPLASMOSIS Dra. María

Albornoz NOCARDIASIS Dr.

Tulio Briceño CRIPTOCOCOSIS

Dr. Edgar Belfort

ACTINOMICOSIS Dr. Olaf

Sandner MICETOMAS

Dres. Tulio Briceño; Ramón Zamora

DIAGNOSTICO DE ENDEMIAS Dra.

María Albornoz

INMUNOFLUORODIAGNOSTICO

William Kaplan, M. D.

MESA REDONDA SOBRE EL DIAGNOSTICO
PRACTICO DE LAS MICOSIS

PROPOSITO:

Exponer los métodos más expeditos y eficaces para el diagnóstico de las micosis en nuestro medio; diagnóstico de enfermedad, evolución y curación.

Viernes 14

PRESIDENTES HONORARIOS:

Dr. Raimundo Martins Castro

Dr. William Kaplan.

COORDINADOR: Dr. Dante Borelli.

MODERADOR: Dr. J. Homez Chacín.

PROLOGO

MODERADOR:

Es propósito de esta mesa redonda exponer los métodos mas expeditos y eficaces para el diagnóstico de las micosis en nuestro medio: diagnóstico de enfermedad, de evolución y de curación.

Confieso que me siento algo preocupado por el esfuerzo que estoy pidiendo a los expositores. Se debe a mi inexperiencia el haber escogido tema tan vasto, tema que ahora me parece más vasto que nunca, para ser tratado en el lapso de una mesa redonda.

Limitarse a los elementos esenciales del diagnostico práctico es empresa tan ardua, que sólo la pueden acometer nuestros expertos. Y aquí están ellos.

DIAGNOSTICO PRACTICO DE LA TIÑA

Dra. CARMEN MARCANO

El único medio eficaz para el diagnóstico de la tiña es el examen micológico.

En el examen micológico podemos distinguir las siguientes fases:

1. Orientación clínico-etiológica:

Cada una de las variantes topográficas de la tiña presenta un cuadro clínico más o menos bien definido que orienta al médico, y en especial al dermatólogo, sobre la posible etiología micótica de la afección y le induce a pedir o a efectuar, él mismo, el examen micológico según modalidades apropiadas.

2. Prueba de la fluorescencia:

La prueba de la fluorescencia con lámpara de rayos ultravioleta (luz de Wood) es de gran valor en el diagnóstico de la tinea capitis.

En la tiña ectothrix por *Microsporum canis* los muñones de pelo infectados fluorescen de color verde brillante; también fluorescen los vellos y los pequeños pelos de las cejas o pestañas cuando éstos están atacados.

La fluorescencia puede ser impedida por la aplicación de cremas o ungüentos y tinturas antisépticas o por la presencia de gruesas escamocostras piosanguinolentas en las lesiones inflamatorias.

En todos los casos, debe examinarse cuidadosamente todo el cuero cabelludo en busca de lesiones satélites que pueden pasar desapercibidas en el examen clínico.

Algunos casos de tiña por *Microsporum gypseum* pueden fluorescer con la luz de Wood pero en otros ésta puede faltar.

La tiña endothrix por *Trichophyton tonsurans* y endo-ectothrix por *Trichophyton mentagrophytes* var. *granulosa* no fluorescen con la luz de Wood.

Un resultado negativo tiene valor en los casos de tiña tonsurante; pero no tiene ningún valor cuando la tiña es inflamatoria.

3. Toma de la muestra:

La toma de la muestra es una de las fases más importantes del examen micológico, ya que, de la correcta y apropiada toma de la muestra depende el hallazgo o no de los micetos en el examen directo y cultivos.

Escogencia y preparación del sitio:

Debe recomendársele al paciente o sus familiares no aplicar tratamiento local durante los 4 días previos al momento del examen. Si el paciente recibe tratamiento y se presenta al examen con las lesiones parcial o totalmente cubiertas con pomadas o tinturas, se le aconseja suspender todo tratamiento local y lavarse normalmente durante 4 días. Resulta, así, más práctico y económico posponer el examen que tener que repetirlo después que se ha obtenido un resultado dudoso.

La muestra debe tomarse de los sitios más típicos y más activos de la lesión.

El sitio escogido debe limpiarse, siempre que sea posible, con alcohol al 70% para destruir algunos de los micro-organismos que con frecuencia contaminan la muestra. Para tal efecto, se recomienda el uso de gasa, en lugar de algodón, para no dejar hebras adheridas a la piel.

La muestra debe tomarse con instrumentos y técnicas apropiadas según el caso y debe ser, en cantidad, el doble de lo que se considere necesario.

a) Cinta adhesiva transparente:

En las lesiones escamosas, la muestra para el examen directo puede tomarse con la cinta adhesiva transparente: aplicando trozos de cinta adhesiva a la lesión, se hace presión con el dedo para que las escamas se adhieran a la cinta. La cinta se aplica por sus extremos a una lámina portaobjeto, retabiéndolos hacia atrás, para que no se despegue.

b) Raspado:

En las lesiones escamosas, se raspa con bisturí (u otro instrumento adecuado) cuya hoja se coloca perpendicularmente a la piel y las escamas que se desprenden se recogen en láminas portaobjeto previamente flameadas, para ser destinadas al examen directo y cultivo.

El techo de las lesiones vesiculosas puede ser removido con tijeras de punta fina o con el bisturí.

c) Depilación:

En la tiña del cabello u otras áreas pilosas, la toma de la muestra se hace mediante depilación. Se utilizan pinzas depilatorias, con las cuales, aplicadas perpendicularmente a la piel y siguiendo el sentido del pelo, se extraen los pelos infectados y las escamocostras.

Deben descartarse los pelos de apariencia normal o las áreas alopécicas.

El material así obtenido se coloca sobre láminas portaobjeto flameadas, para ser utilizado una parte para el examen directo y la otra para siembra en los tubos de cultivo.

d) Onicotomía:

La muestra de uñas debe tomarse con tenazas apropiadas para recoger trocitos de la uña enferma hasta dar con la parte sana.

El material puede guardarse entre dos láminas portaobjetos o en sobre nuevo, debidamente sellados, que se marcan con los datos pertinentes. En esta forma puede mantenerse el material en buenas condiciones, para su envío o para ulterior estudio, por meses.

4. Examen directo:

El examen microscópico directo permite demostrar la presencia *in situ* del hongo en los tejidos del huésped, en actitud parasitaria. Por lo tanto, es el método más rápido, económico y valedero para el diagnóstico de todas las micosis.

a) Examen directo en fresco:

No se utiliza en el diagnóstico de las tiñas, ya que, las estructuras córneas necesitan ser ablandadas y aclaradas para la observación microscópica.

b) Examen directo por aclaramiento:

El material que se destina a examen directo se coloca en el centro de una lámina portaobjeto limpia y se cubre con la laminilla, sobre la cual se ha colocado 1 ó 2 gotas de hidróxido al 10%. Se hace presión con la uña y se calienta suavemente sobre el mechero, varias veces, para aplastar y acelerar la acción del hidróxido.

Según nuestra experiencia tanto sirve el hidróxido de sodio como el hidróxido de potasio.

c) Examen directo por aclaramiento y tinción:

A la lámina ya aclarada previamente con hidróxido se le puede añadir el colorante: 1 gota de tinta Parker Super Quink azul-negra que se coloca al borde de la laminilla para que penetre por capilaridad.

También se puede mezclar sobre la laminilla 1 , gota de hidróxido, con 1 gota de tinta Parker y cubrir así el material colocado sobre la lámina portaobjeto. Se calienta suavemente sobre el mechero y se oprime varias veces, hasta obtener el aclaramiento deseado.

Si la muestra ha sido tomada con la cinta adhesiva transparente, al lado de uno de sus bordes se coloca 1 gota de hidróxido y después 1 gota de tinta Parker, que entran por capilaridad.

El material así preparado se examina inmediatamente al microscopio y se guarda para ulteriores observaciones.

Una vez obtenido el aclaramiento deseado, éste debe interrumpirse añadiendo 1 gota de una mezcla de glicerina y agua a partes iguales, que se repone, si es necesario.

Finalmente, la preparación puede ser sellada por sus bordes con parafina, laca de uñas, u otro material.

Cuando el material de uñas es muy grueso y duro se puede colocar en un pequeño frasco con tapa, se añaden 1 - 5 gotas de hidróxido y se deja a temperatura ambiente hasta el día siguiente (24 - 48 horas) ; se recoge el material en una lámina portaobjeto y se cubre con la laminilla y la tinta Parker.

En esta forma, se obtienen preparaciones para examen directo que en la mayoría de los casos permiten demostrar la presencia de hongos, si los hay.

Por la apariencia del hongo en el pelo infectado puede "sospecharse" el agente etiológico en la mayoría de los casos, pero la identificación de la especie causal sólo puede ser hecha después que el hongo ha sido cultivado.

El ataque al cabello por *M. canis* es de tipo endo-ectothrix, presentándose en forma de hifas ramificadas que recorren el interior del tallo del pelo, desde la raíz, y alrededor de éste un manguito de pequeños artrosporos que se disponen en mosaico pluriestratificado (ectothrix microsporino).

El ataque endothrix por *Tr. tonsurans* muestra artrosporos gruesos en cadenas paralelas en el interior del pelo, sin romper la cutícula (endothrix megasporino).

El ataque al cabello por *Tr. mentagrophytes* y *M. gypseum* es de tipo endo-ectothrix mostrando hifas continuas o artrosporadas en el interior y en la superficie semidestruida del pelo, perforando la cutícula y artrosporos formando filas que cubren irregularmente la superficie. Se distinguen fácilmente las 2 especies por el tamaño de los artrosporos: *Tr. mentagrophytes* produce artrosporos pequeños (2-5 u), mientras que *M. gypseum* produce artrosporos grandes (5-8 u).

En las escamas de piel y en las uñas se observan filamentos o hifas hialinas, ramificadas, tabicadas, regulares, continuas o artrosporadas. En las lesiones muy húmedas, las hifas pueden estar casi completamente transformadas en cadenas de artrosporos redondos. Por el aspecto de las hifas en el examen directo no puede reconocerse el agente etiológico.

Deben reconocerse ciertos artefactos que pueden ser confundidos por los inexpertos, como por ejemplo, el llamado "mosaic fungi" y pequeños fragmentos de gasa o algodón que con frecuencia están presentes en las preparaciones.

Las otras modalidades del examen directo se utilizan muy poco para el diagnóstico de las tiñas.

Con la histología y mediante coloraciones para hongos (Schiff, Gomori) pueden demostrarse los elementos fúngidos en la capa córnea de la piel o en los folículos pilosos, pero su interés práctico es ocasional. Excepcionalmente el diagnóstico se hace por el hallazgo histológico.

5. Cultivo:

El cultivo es un método indirecto de demostrar la etiología fúngida de una afección. Cuando se utilizan medios de cultivo apropiados, al final de la primera semana se pueden identificar la mayoría de los dermatofitos, agentes de tiña en nuestro medio.

La siembra en los medios de cultivo puede hacerse directamente desde el paciente, descargando el material recogido sobre la hoja del bisturí en los tubos de cultivo, o recogiendo el material que ha sido recolectado en láminas portaobjeto flameadas o en sobres nuevos.

En la práctica, casi siempre, se procede primero a sembrar el material en los tubos de cultivo y posteriormente a la realización del examen directo.

Desde cada uno de los sitios "sospechosos" deben sembrarse al menos 4-5 tubos. El número de tubos sembrados debe ser aún mayor si se sospecha que los micetos se encuentran escasos en la muestra: controles durante o después del tratamiento y en las lesiones muy inflamatorias o acompañadas de infección bacteriana secundaria.

Los cultivos se mantienen a temperatura ambiente (23-28° C) y se revisan cada 4-5 días para detectar el crecimiento, hasta por un mes, si el resultado es negativo.

Los terrenos de cultivo que se utilizan para el aislamiento deben contener antibióticos que inhiben el crecimiento de bacterias (cloranfenicol) y/o de mohos contaminantes (cicloheximida). En la práctica, el uso solamente del cloranfenicol (250 mg./1) incorporado a la fórmula de los terrenos ha dado excelentes resultados.

El medio *lactritmel* ofrece la ventaja de favorecer la producción de pigmentos y la rápida formación de los órganos vegetativos de reproducción de los dermatofitos, lo que permite su identificación desde el 4?-5° día de la siembra.

M. canis produce pigmento color naranja difusible y abundantes racimos de macroconidias fusiformes, verrugosas, que pueden observarse a través de las paredes del tubo. *M. gypseum* produce colonias color crema, pulverulentas, con reverso amarillento y macroconidias rugosas, fusiformes. *Tr. mentagrophytes* puede reconocerse en sus 3

variedades patogénico-morfológicas: *var. granulosa*, *var. qypsea* y *var. nivea*; produce colonias blanco-crema de superficie granulosa, yesosa o algodonosa y pigmento pardo-rosado en el reverso, con abundantes racimos de microconidas, espirales y macroconidias que van disminuyendo en número desde la *var. granulosa* a la *var. nivea*. *Tr. rubrum* produce precozmente su pigmento rojo púrpura que difunde al medio y lentamente desarrolla micelio aéreo blanco con microconidias en acladias y racimos y escasas o abundantes (según las cepas) macroconidias en salchichón. *Tr. tonsurans* se desarrolla lentamente produciendo colonias color pardo-rosado, de centro levantado (se desarrolla mejor en sablac). *E. f loccosum* produce solonias color caqui, glabras, de lento crecimiento y microscópicamente racimos de macronidias lisas; no produce microconidias.

Otros medios de cultivo utilizados para la identificación y estudio de las cepas aisladas son: *sablac*, *Sabouraud*, medios a base de boñiga (*bostava*, *bostaca*), *menestrone-agar*, *batatagar*, cultivo sobre pelos y tierra estéril, etc.

Para la conservación de las cepas y para prevenir el pleomorfismo se utilizan los medios *Sabouraud conservación*, *bostava* y agua destilada estéril.

6. Inoculación a animales:

Algunos de los dermatofitos presentan patogenicidad natural o experimental para los animales de laboratorio. Su uso se limita sólo a trabajos de investigación en el campo de la micología médica.

7. Epidemiología:

La fuente de infección por *M. canis* son animales (especie zoófila), mamíferos, especialmente gatos y perros, enfermos o portadores sanos, que transmiten la infección a la población susceptible. Menos frecuente es la transmisión por contacto directo interhumano.

La fuente de infección por *Tr. mentagrophytes var. granulosa* (especie también zoófila) son los roedores domésticos y peridomésticos, portadores sanos o enfermos, que al visitar los alrededores de las viviendas dejan abundante material córneo (pelos) que constituye fuente de infección de humanos, y ocasionalmente otros mamíferos (equinos, bovinos, etc.).

La fuente de infección por *M. gypseum* (especie geófila) es el suelo en donde vive como saprofita junto con otros hongos queratinófilos. Rara vez *M. gypseum* infecta animales.

Tr. tonsurans, *Tr. rubrum*, *E. floccosum* y *Tr. mentagrophytes* var. *gypsea* y *nivea* son especies antropófilas; su transmisión se hace por contacto directo interhumano, ropas u otros enseres (baños) que contienen material córneo contaminado por hongos.

DIAGNOSTICO DE LA TINEA NIGRA

Dra. CARMEN MARCANO

1. Orientación clínico-etiológica:

Manchas oscuras, desde un color marrón claro hasta negro, asintomáticas, en palmas y menos frecuentemente en plantas de niños y muchachas jóvenes, sudorosas, de piel blanca, que visitan playas tropicales o subtropicales cálidas, desde los 34° de Lat. Norte hasta los 23° de Lat. Sur, en América y otros continentes.

2. Toma de la muestra:

Al raspado de la mancha con bisturí, se obtienen escamas que se desprenden con facilidad, dejando una superficie de piel aparentemente normal.

Con frecuencia el raspado ocasiona la desaparición de la mancha. 3.

Examen directo:

El examen directo entre lámina y laminilla por aclaramiento con hidróxidos permite, en todos los casos, demostrar la presencia de hongos oscuros, fuliginosos, en la muestra.

La observación microscópica revela de inmediato la presencia de abundante red de hifas fuliginosas, de color rubio-dorado o pardo, delgadas, rectas u onduladas, irregulares.

En la mayoría de los casos debidos a *Aureobasidium werneckii* se presenta abundante brotación: esporas de 2 x 5 u. En los tres primeros casos por *Cladosporium castellanii*, recientemente descritos, no se observó la brotación, lo que permite diferenciar las dos especies, cuando se examinan escamas de tinea nigra.

4. Cultivos:

Aureobasidium werneckii desarrolla colonias negras, húmedas, brillantes, como azabache, en la superficie del terreno, que se hacen

confluentes hasta ocupar toda la superficie en dos semanas y producen pigmento oscuro difusible.

Cladosporium castellanii se desarrolla mas lentamente formando colonias de color verde oscuro, mates, aterciopeladas, levantadas en su centro, con surcos radiados, reverso negro, sin pigmento difusible. Sobre terrenos pobres como lactritmel, produce variantes por sectores, más claros que la variedad original.

En los cultivos en lámina, *Au. werneckii* presenta micelio fuliginoso y numerosas esporas con 0-2 tabiques, formadas de conidióforos dispuestos a intervalos, a lo largo de las hifas. En los cultivos más viejos se observa, en casi todas las cepas, la formación de esporoquias que en parte dan lugar a picnidias con picnidioconidias.

Cl. castellanii presenta hifas fuliginosas, de gruesa pared, ramificadas y tabicadas, al comienzo estériles. Más tarde, a partir de la 35 semana, forma estructuras cladospóricas irregulares, ramificadas, con elementos alargado-elipsoides, 1-4 septados, muy fuliginosos.

La temperatura óptima de crecimiento de *Au.werneckii* es de 23-24° C, mientras que la de *Cl. castellanii* es de 30° C, con temperaturas máximas de crecimiento de 34° C para el primero y 35° C para el segundo.

EL DIAGNOSTICO PRACTICO DE LA PITIRIASIS VERSICOLOR

Dr. HERNAN VARGAS

Sinonimia.

La pitiriasis versicolor es llamada también tiña versicolor, cromomicosis, dermatomicosis furfurácea, manchas hepáticas, tiña flava, pitiasis versicolor tropical, etc.

Orientación clínica.

Se basa sobre la observación de lesiones hipercrómicas, hipocrómicas o eritematosas, linealmente delimitadas, diseminadas.

Fluorescencia.

Con la luz ultravioleta filtrada, cual es producida por lámpara de Wood, las lesiones de pitiriasis versicolor despiden fluorescencia dorada.

Examen micológico.

La toma del material puede hacerse raspando las lesiones para separar y recoger escamas, que serán aclaradas con hidróxido y teñidas con tinta Parker. También puede usarse el método de la cinta adhesiva. La microscopia permite encontrar al parásito, *Malassezia furfur*, el cual presentase bajo dos aspectos: cúmulos de elementos globosos e hifas hialinas, usualmente cortas, frecuentemente acodadas.

Sobre este hallazgo se basa el diagnóstico etiológico de pitiriasis versicolor. *Malassezia furfur* no se cultiva habitualmente.

EL DIAGNOSTICO PRACTICO DE LAS PILONODOSIS

Dr. HERNAN VARGAS

Definición.

Se llaman pilonodosis un grupo de afecciones caracterizadas por la presencia de nódulos adheridos a la superficie de los pelos. Entre ellas tenemos las piedras, producidas por hongos y la pilonodosis palmelina, producida por bacterias. Esta viene llamándose erróneamente tricomicosis axilar. Otros nombres usados para designar a las pilonodosis han sido: tiña nudosa, piedra nostras, tricomicosis nodular, tricomicosis nudosa, etc.

La *piedra blanca* consta de elementos nodulares usualmente muy pequeños, desconocidos por el paciente u observables a simple vista. Tales nódulos son blanquecinos y relativamente blandos, que pueden ser aplastados entre lámina y laminilla. Los nódulos pueden presentarse discretos o formar una vaina continua o subcontinua, la cual podría hacerla confundir con pilonodosis palmelina, como resulta de las imágenes que se están proyectando en este momento. Los cortes histológicos a fuerte aumento de tales nódulos de la piedra blanca muestran que ellos están formados de células o celdillas unidas entre sí por material intercelular, una especie de cemento. El aspecto general asemeja al de un panal de abejas. Eventualmente están adheridos al nódulo de piedra blanca cúmulos de elementos cocoides.

Hay un hecho bastante rutinario en la literatura mundial: la existencia de tricorrexis nodosa en pelos con nódulos exactamente sobre las partes alteradas por tricorrexis. Se ha asomado la idea, de que la piedra blanca causa la tricorrexis.

Yo he estudiado unos 50 casos de piedra blanca a localización genital y perigenital. He visto nódulos de piedra blanca situados sobre sitios de tricorrexis; pero he visto en los mismos pacientes tricorrexis también sin nódulos. He colegido que no es la piedra causa

de la tricolorrexis; ellas pueden simplemente coexistir en el mismo paciente, pudiendo la piedra formarse de preferencia donde existe tricolorrexis.

El cultivo de *Trichosporon cutaneum*, causa de la piedra blanca, es cerebriforme y consta prevalentemente de artrosporos y blastosporos. Para completar la identificación, nos valemos de una batería de fuentes hidrocarbonadas. Se toma en cuenta, además, la termofilia, la pigmentación, etc.

Hemos realizado también estudio ultra-estructural de nódulos de piedra blanca, en el cual se confirmó la estructura descrita, incluyendo los cúmulos de bacterias arrimadas al hongo.

La *piedra negra* se caracteriza por nódulos negruzcos, duros, adheridos a pelos, cuya arquitectura los identifica como ascostromas. Los ascostromas son tejidos compactos conteniendo cavidades, los ascos, que alojan los ascosporos. Todos estos detalles de forma permiten la rápida identificación de *Piedraia hortae* y el consiguiente diagnóstico de la piedra negra.

DIAGNOSTICO DE ESPOROTRICOSIS

Dra. HOMAGDY RODRIGUEZ DE AREVALO

Es una afección micótica, granulomatosa, localizada, producida por una sola especie de hongo, *Sporotrichum schenckii*; el cual usualmente penetra durante o después de un traumatismo.

El diagnóstico definitivo, basado en la demostración del hongo causal, requiere de algunos de los siguientes pasos:

1. Orientación clínica.
2. Examen micológico.
3. Inoculación a animales susceptibles.
4. Sero-inmunología.

Orientación Clínica. Las formas clínicas son variadas, la linfagítica representa las 3/4 partes del total; otras formas son las cutáneas localizadas y diseminadas; raras, la visceral, primaria o secundaria.

Examen micológico. Comprende:

- a) Toma de la muestra.
- b) Examen directo.
- c) Cultivo.

La muestra más productiva es el pus de colecciones cerradas, pústulas o abscesos, que se abren con bisturí o lancetas. Parte de este material se coloca en una lámina porta-objeto para el examen directo; el resto se siembra en medio de cultivos apropiados.

La dificultad para la observación de cuerpos asteroides en muestras mezcladas con sangre nos obliga a tomar la primera gota del pus para el examen en fresco.

El examen directo puede realizarse mediante tres procedimientos:

a) *Examen en fresco*, permite observar los cuerpos asteroides, levadura esférica con corona radiada resultante de la precipitación de

sustancias en la periferia del hongo, representa la forma parasitaria patognomónica del parásito.

Técnica. Sobre una lámina porta-objeto se coloca una gota de agua, luego una gota de pus de la lesión, una laminilla cubre-objeto, sobre la cual se hace débil presión. Exploramos con objetivo de bajo poder, buscando estructuras resfringentes sospechosas. Localizadas éstas, las precisamos con objetivo de mayor poder.

b) Examen directo por tinción. Extendidos del pus, coloreados según la técnica de Giemsa, Schiff o Gomori, nos permiten observar al hongo como una levadura fusiforme u ovoide, de 3 a 5 micras, con gemación, intra o extra celular, denominada "cuerpo en cigarro".

c) Examen directo por histología. Las secciones de tejido sólo ocasionalmente permiten ver cuerpos asteroides u otra forma del hongo dentro de una reacción granulomatosa crónica inespecífica, muy parecida a la causada por otros hongos o protozoarios. Por lo tanto el valor diagnóstico de la histología es limitada.

Cultivo. Es el método más seguro, sensible y específico para el diagnóstico de esporotricosis. Las colonias crecen rápidamente y poseen características macro y microscópicas que permiten su identificación. El cultivo se logra en el 100% de los casos, tanto en los medios clásicos, como en los medios caseros preconizados por Borelli; pueden incubarse a temperatura ambiente para obtener la fase filamentosa del hongo, o a 37° C para la fase levaduriforme.

A temperatura ambiente las colonias son visibles macroscópicamente a partir del tercer día. Al principio, pequeñas, blancas, glabras; a medida que crecen, adquieren un aspecto húmedo, rugoso, oscureciéndose por la formación de conidias aéreas. En lactritmel el crecimiento es más rápido e intenso.

Microscópicamente se aprecian hifas hialinas, finas, ramificadas, tabicadas, portadoras de cornidias ojivales colocadas lateralmente o en los extremos de las ramas laterales a modo de margaritas o manguitos.

A 37° C, en dos a tres días, produce colonias blandas, blanco amarillenta, microscópicamente compuestas de células en gemación ovales, redondeadas o en forma de cigarro.

Inoculación de animales susceptibles. Puede ser necesaria ocasionalmente o para investigación.

El método es sencillo, consiste en inocular pus u otro material sospechoso, por vía intraperitoneal en el ratón, produciendo infección sistemática o en patas, cola y testículos de rata, formándose lesiones nodulares abcedadas. El hongo es identificable por examen directo en fresco y cultivo.



Fig. 1.-Esporitricosis: Forma Linfangítica.



Fig. 2.-Esporotricosis: Forma localizada.

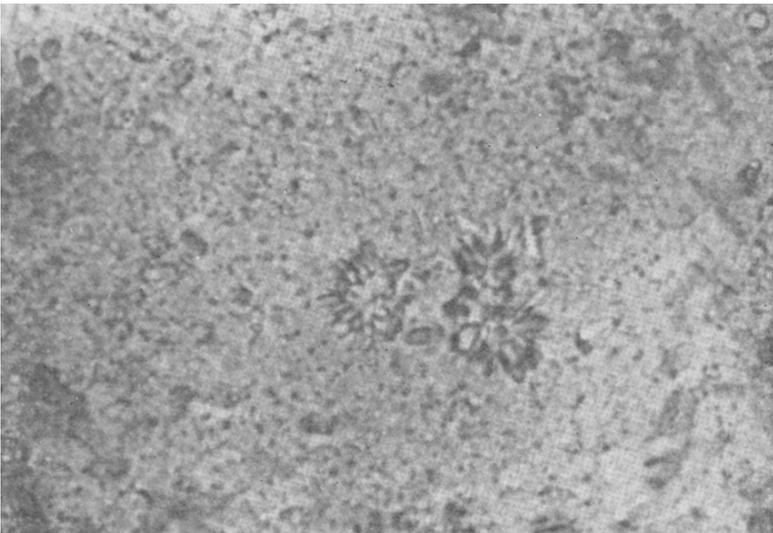


Fig. 3.-Esporotricosis: Examen en fresco del püs demostrando cuerpos asteroides.

DIAGNOSTICO DECROMOMICOSIS

Dra. HOMAGDY RODRIGUEZ DE AREVALO

Micosis granulomatosa, confinada a la piel y tejido sub-cutáneo, causado por diferentes especies de hongos pigmentados del género *Cladosporium*, *Fonsecaea*, *Phialophora* o *Acrotheca*.

La infección resulta de la introducción traumática del organismo patógeno dentro del tejido.

En Venezuela las especies productoras de cromomicosis son *Fonsecaea pedrosoi*, aislada en todo el territorio y *Cladosporium carrionii*, en el área seca nor-occidental.

El diagnóstico basado en la demostración del hongo causal, requiere los siguientes pasos:

1. Orientación clínica.
2. Examen micológico.

Orientación clínica. Lesiones pápulo-nodulares de superficie escamo-costrosa, verrugosa, ulceradas o no, de extensión periférica, con áreas centrales de cicatriz, generalmente localizadas en partes descubiertas del cuerpo, sugieren el diagnóstico clínico de cromomicosis.

Examen micológico. Comprende:

- a) Toma de la muestra.
- b) Examen directo.
- c) Cultivo.

Toma de la muestra. La lesión es limpiada con gasa impregnada de alcohol de 70; con pinza o bisturí estéril, tomar muestra del pus o escamo-costra, la cual se coloca en láminas estériles para examen directo y cultivo.

Examen directo. El parásito, cromomiceto, presente en los tejidos como cuerpos redondos, pardos, de paredes gruesas, de doble con-

torno, de 6 a 8 micras de diámetro, aisladas o en grupos, multiplicándose por fisión o gemación, puede encontrarse tanto en el pus como en las escamo-costras de las lesiones.

Según el tipo de material, varía la técnica para el examen directo:

1. Una pequeña cantidad del pus es colocada sobre una lámina porta-objeto, se añade una gota de agua o solución salina, luego la laminilla cubre-objeto practicando débil presión para formar una delgada película y eliminar las burbujas; finalmente la preparación se examina al microscopio en busca de los cromomicetos.

2. A escamo-costras sobre una lámina porta-objeto se añade una gota de solución aclarante, KOH, xilol, bencina o lactofenol, se cubre con laminilla y se examina al microscopio para buscar los cromomicetos. Preferible seleccionar escamo-costras de reciente formación.

La biopsia no es necesaria para el diagnóstico de cromomícosis, pero la efectuamos como rutina de trabajo.

Cultivo. Es importante para el diagnóstico de especie. El material tomado de las lesiones se siembra en los medios de cultivos clásicos o en los medios caseros de Borelli.

Cada especie posee características macro y microscópicas que permiten su identificación.

Fonsecae pedrosoi. Produce colonias pardo-verdosas, de superficie lanoso-algodonoso. Microscópicamente se comprueban grandes variaciones en la formación de conidias, reconociéndose tres tipos diferentes de esporulación, presentes en los cultivos en proporciones variables.

1. Tipo cladosporium, caracterizado por conidióforos de longitud variable, portadores de blastoartrosporos elipsoides en cadenas muy ramificadas.

2. Tipo acrotheca, presencia de un conidióforo en la extremidad distal o lateral de la hifa, sobre el cual se originan las conidias.

3. Tipo Phialóphora, las conidias emanan de conidióforos en forma de botella.

Cladosporium carrionii. Produce colonias pardo-verdosas, planas, aterciopeladas. El examen microscópico descubre solamente al tipo da

dosporium de esporulación; los conidióforos laterales y terminales, producen cadenas largas poco ramificadas de blastoartrosporas que se dispersan fácilmente.

Para el estudio de cepas de patogenicidad dudosa pueden servir los siguientes criterios: los cromomicetos patógenos para el hombre crecen a partir de 35⁰ C por lo menos y no licuan la gelatina; las cepas normales recién aisladas producen cromomicosis experimental en ratón y hámster. Todas ellas (normales y anormales) producen cromomicosis en lugares apropiados de la piel humana.

La sero-inmunología no es auxilio para el diagnóstico práctico.



Fig. 1.-Cromomicosis: Caso clínico.

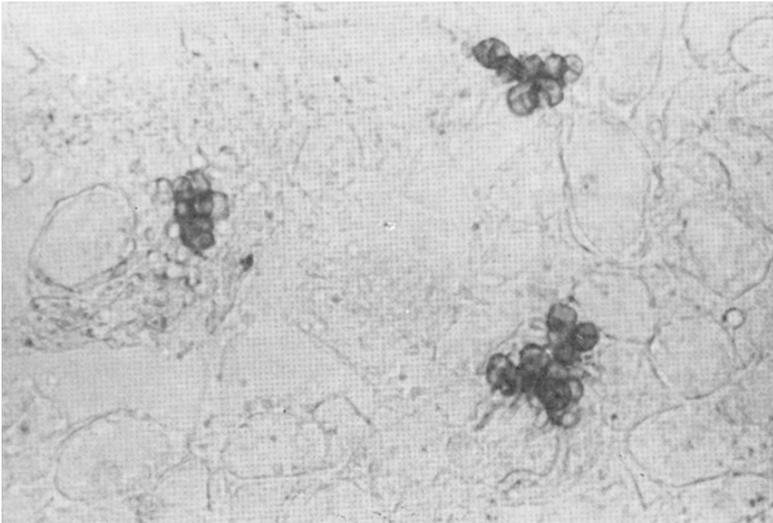


Fig. 2.- Cromomicosis: Examen directo por aclaramiento demostrando cromomicetos.

DIAGNOSTICO RAPIDO DE CANDIDA ALBICANS

Dr. MIDRED FEO

El nombre genérico correcto es *Candida*; el nombre específico correcto de la única (?) especie patógena es *Candida albicans* y el nombre correcto de la enfermedad es candidiasis.

En la actualidad la candidiasis es la micosis más importante por su frecuencia y *Candida albicans* el hongo más frecuentemente aislado de los materiales patológicos. Por lo tanto reviste gran interés el lograr y divulgar métodos diagnósticos económicos, rápidos y seguros, que den base objetiva y oportuna a la conducta terapéutica.

Se cree que *Candida albicans* es saprofito o comensal del hombre sano y vive como huésped de mamíferos y aves en la parte superior del tubo digestivo. Cuando las condiciones de vida del huésped cambian por: enfermedad (como diabetes), embarazo, tratamientos prolongados con antibióticos o corticosteroides, desnutrición, baja de las defensas del individuo, uso de prótesis dentales, cardíacas, renales, sondas permanentes, vestimentas impermeables que mantienen la humedad del tegumento, contacto íntimo con enfermos de candidiasis (feto que nace de madre con candidiasis vaginal, obrero que beneficia aves con candidiasis, cónyuge que viva con cónyuge con candidiasis genital), *Candida albicans* hasta entonces saprofita se vuelve patógena, se multiplica, invade los tejidos del huésped, diseminándose, hasta llegar en raras ocasiones a hacerse sistémica.

Se dice que la candidiasis es una *micosis no clasificable*, por presentar localizaciones propias de las micosis superficiales (piel y mucosa) y localizaciones propias de las micosis profundas.

Son signos constantes de la candidiasis el eritema y la formación de una capa blanquecina, húmeda, sobre el tegumento atacado. Las regiones más frecuentemente atacadas son aquellas tapizadas por un epitelio plano estratificado, que permanecen siempre húmedas: boca, esófago, embudo anal, vulvo-vaginal, balano-prepucio, oído externo, grandes y pequeños pliegues, surcos periungueales, etc.

La muestra para practicar el examen micológico se toma, raspando el material macerado, escamante, que se desprende de las lesiones, rico en detritus celulares, filamentos y blastoporas.

Una parte de este material se examina en fresco, por aclaramiento y tinción, con hidróxido de Na o de K al 10% y tinta Parker, para buscar principalmente filamentos, ya que el valor etiológico de la levadura se manifiesta por su presencia. El médico especialista o práctico dará tanta importancia a estos hallazgos, como a los clínicos, ya que de ellos depende la confirmación del diagnóstico de candidiasis-enfermedad.

Otra parte del mismo material se siembra directamente y por punción en el medio de cultivo Bilis-agar Feo, 1973, para identificar por cultivo naciente a *Candida albicans*.

En este medio *Candida albicans* forma en 24 a 48 horas los elementos característicos que le son propios, las clamidosporas. El diagnóstico de *Candida albicans* se hace por el hallazgo de las clamidosporas.

La identificación de *Candida albicans* completa el diagnóstico etiológico, aunque el sólo hallazgo por cultivo de esta especie no es patognomónico de candidiasis, pudiendo el hongo estar presente como residente ocasional o permanente.

En 1964 publiqué una fórmula del medio Bilis-agar que he venido modificando hasta llegar a la fórmula actual.

La composición del Bilis-agar es ahora la siguiente: bilis en polvo (Oxgall Bacto, BBL, Oxoid) 20 g.; agar, 1 g.; cloranfenicol, 0,25 g.; agua destilada 1.000 ml. Repartir en tubos de 13 x 100 mm. a razón de 2 a 3 ml. cada uno. Esterilizar por autoclave a 10 libras de presión durante 15 minutos. El medio resultante es semi-líquido.

La rápida formación en este medio de las clamidosporas tal vez se deba a la oligoerobiosis, calidad de nutrientes y pH apropiado.

LOBOMICOSIS

Dr. FRANCISCO BATTISTINI

(NO HAY TEXTO)

PARACOCCIDIODOMICOSIS

DIAGNOSTICO PRACTICO

Dr. RAIMUNDO MARTINS CASTRO

Tal como en otras micosis el método más práctico y seguro para establecer el diagnóstico correcto de la paracoccidioidomicosis es la demostración del *Paracoccidioides brasiliensis* en la lesión, en las secreciones o en el producto patológico. Este puede ser hecho por alguno de los siguientes métodos:

1. Examen directo, al fresco.
2. Examen directo, con coloración.
3. Examen histopatológico.
4. Cultivo.
5. Inoculación en animales sensibles.

Para el diagnóstico, en la práctica los métodos más útiles son: el examen directo al fresco y el histopatológico. Para la ejecución del examen directo se recoge el material adecuado de la lesión sospechosa (o cualquier producto patológico -esputo, pus de ganglios, etc.) entre lámina y laminilla se examina. El aspecto microscópico es muy característico por la presencia de células redondas con membrana birren. fringente de tamaños que varían entre 20 y 30 micras. Frecuentemente es posible observar brotes, bien única o múltiples en torno a la célula hija. Los brotes múltiples son característicos del *Paracoccidioides brasiliensis*. En caso de que estemos examinando esputo, pueden verse levaduras que pueden hacernos dudar, para dirimir esta duda se coloca el material en una estufa a 37°C. por 24 horas, en este tiempo las levaduras comienzan a filantarse, en cambio el *Paracoccidioides brasiliensis*, no.

Otro método práctico para el diagnóstico es el examen histopatológico. Las preparaciones se pueden teñir con hematoxilina y eosina, método de rutina que es suficiente para el diagnóstico. En caso de dudas se podrán usar otras coloraciones histoquímicas, PAS, Grydley

y Gomori, que ponen en evidencia al *Paracoccidioides brasiliensis*. En el examen histopatológico el hongo se distingue fácilmente del coccidioides inmitis por ser menor y por no presentar endosporas; si no hay esporulación múltiple puede ser confundido con el histoplasma duboisi o Blastomyces dermatides.

Estas posibilidades son más teóricas que prácticas ya que no hay coincidencias endémicas entre estas tres micosis. Sólo se aplicaría en los casos excepcionales donde los enfermos vivieran en zonas endémicas de las diferentes micosis. Otra posibilidad de confusión es con las "formas finor" del paracoccidioides brasiliensis, que tiene cerca de 5 micras de tamaño, y el histoplasma capsulatum. Generalmente el examen de varias láminas y el uso de coloraciones específicas permite encontrar formas mayores y características del Paracoccidioides brasiliensis. En caso de persistir la duda se recurre al cultivo. En la práctica clínica, los cultivos son poco utilizados como método de diagnóstico, salvo donde hay centros o laboratorios especializados. Los siguientes motivos hacen que el cultivo sea poco empleado como método de diagnóstico: es más fácil de identificar el microorganismo en el examen directo o histopatológico, que aislarlo en cultivo; el crecimiento del hongo es lento (20-30 días) y puede tener dificultades en la identificación de los cultivos.

La inoculación en animales de laboratorio no es utilizada en la práctica como recurso de diagnóstico.

Las pruebas serológicas tienen poco valor para el diagnóstico, se usan para valorar los resultados terapéuticos. Habitualmente se buscan anticuerpos fijadores de complemento y precipitinas. El título de la reacción de fijación de complemento es hasta cierto tiempo, un espejo del número de parásitos existentes. Es bajo en las formas localizadas y alto en las formas diseminadas. Las precipitinas están relacionadas con actividad de la enfermedad. Aparecen y desaparecen antes que los anticuerpos fijadores de complemento. En los tratamientos eficientes hay caída acentuada o desaparición de ambos. En enfermos tratados la permanencia de títulos bajos, residuales, de anticuerpos fijadores de complemento es frecuente.

COCCIDIODOSIS

Dr. HUMBERTO CAMPINS

(NO HAY TEXTO)

HISTOPLASMOSIS

Dra. MARIA ALBORNOZ

(NO HAY TEXTO)

NOCARDIASIS

Dr. TULIO BRICENO M.

Las nocardias son microorganismos aeróbicos que pertenecen a la familia *Actinomycetaceae*. Pueden producir lesiones localizadas o sistémicas, su aspecto puede ser de granuloma o bien puede simular cualquier proceso bacteriano pulmonar, T.B.C. en particular. Pueden invadir las meninges, el cerebro, el pericardio.

En los esputos o pus de abscesos se presentan como pequeñas formas bacilares, Gram positivas y con débil alcohol-ácido resistencia.

Los Rayos X pulmonares no son característicos pudiendo simular T.B.C. o metastasia de procesos tumorales. Las nocardias pueden atacar los huesos.

Se encuentran en todas partes del mundo, se han aislado del suelo. Ataca a todas las razas y en todas las edades.

Cuando se sospecha Nocardiasis se debe hacer frotos del material, hacer un Gram y un Ziehl-Neelsen (sin decolorar muy rigurosamente). Luego sembrar en varios medios algunos sin antibióticos por la susceptibilidad a éstos de las nocardias).

El Sabouraud es satisfactorio para su cultivo.

Los cultivos deben hacerse a temperatura ambiente y a 30° C. Crecen con facilidad en los medios usados para micobacterias. La inoculación al conejo o ratón es útil. Hay que notar que hay grandes diferencias de virulencia.

Las nocardias producen granos blancos amarillentos de alrededor de 1 mm. de diámetro, los cuales en general forman clavas en la periferia.

Las infecciones sistémicas no producen granos.

N. asteroides.

En Sabouraud la colonia es arrugada, su color puede ser amarillento o color anaranjado. La colonia está compuesta de hifas de 1 micra de diámetro que se fragmentan fácilmente. Crece a 45° C., permanece viable a una temperatura de 50° C. mantenida por 8 horas.

N. brasiliensis.

En Sabouraud las colonias son cerebriformes de color amarillo naranja con superficie más o menos arrugada.

N. caviae.

Estas colonias en Sabouraud o Zapek-agar son iguales a las de *N. asteroides* o *N. brasiliensis*.

La inoculación a animales no es un procedimiento de rutina. Sin embargo la *N. asteroides* es patógena para el conejo. La *N. brasiliensis* no lo es. En los cortes histopatológicos coloreados con H y E no se demuestran los filamentos, pueden no colorearse con PAS. Hay que usar coloraciones especiales como el Gram y el Gomori (Metenamina de plata).

CARACTERISTICAS DE LAS NOCARDIAS

Serología.

En conejos se han demostrado aglutininas y precipitinas, además desviación del complemento. Sin embargo estas pruebas no tienen gran especificidad.

A. Zamora y colaboradores han obtenido extractos de los polisacáridos de *N. asteroides* y *brasiliensis* los que demostraron especificidad con el procedimiento de doble difusión del agar. También ha habido especificidad con la inmunofluorescencia.

L. F. Bojalil y A. Zamora informan de pruebas positivas en doble difusión en agar en pacientes infestados con *N. brasiliensis*.

Magnusson preparó un P. P. D. de *N. asteroide* el cual da una intradermo reacción específica.

González Ochoa y Baranda ya habían informado de un extracto polisacárido que daba intradermo reacción específica en esos pacientes.

	Acido Resistencia	Hidrolis de caseina	Disuelve cristales de tirosina	Disuelve cristales de xantina	Licúa gelatina	Crecimiento en 4% de Gelatina	Utiliza la parda	Ureasa	Hidroliza Almidon	Actuacion en Leche Litmus
N.Asteroides	+	-	-	-	-	-	+	+	+-	-
N.Brasiliensis	+	+	+	-	+	+	+	+	+-	Peptona
N.Caviae	+	-	-	+	-	-	+	-	+-	-

(Tomado de Coerant)

DIAGNOSTICO DE LA CRIPTOCOCOSIS

Dr. EDGAR BELFORT

La forma más conocida de criptocosis es la debida a invasión del sistema nervioso central, caracterizada por manifestaciones muy variadas de la esfera neurológica y mental, principalmente las de una meningoencefalitis crónica.

La forma de localización pulmonar, con seguridad la más frecuente, muchas veces no es diagnosticada, aunque durante los últimos años, en diversas partes del mundo se ha venido insistiendo en la comprobación de formas mínimas de criptocosis pulmonar, consideradas como lesiones iniciales o primarias de la enfermedad criptocócica.

Un diagnóstico de certeza de esta afección puede ser alcanzado, mediante el examen micológico de diferentes materiales (LCR, esputo, sangre, orina, pus, fragmentos de tejido, etc.), utilizando los siguientes procedimientos de laboratorio.

- 1) *Examen microscópico directo:* Se examinan preparaciones en fresco y preparaciones efectuadas entre lámina y laminilla, mezclando el material con una gota de tinta china no diluida, demostrándose el *Cryptococcus* como células redondas u ovals de pared gruesa, gemulantes, con un diámetro de 4 a 8 u, rodeadas por una gruesa y nítida cápsula de material mucilaginoso, refráctil, observada muy fácilmente en preparaciones con tinta china, como un grueso halo transparente, de un diámetro en ocasiones varias veces mayor que el de la célula misma (Fig. 1).
- 2) *Cultivos:* Diferentes medios de cultivo (agar-sangre, agar-infusión de cerebro-corazón, agar Sabouraud, agar adicionado de creatinina y extracto de semillas (*Guizotia abyssinica*) permiten el rápido y fácil crecimiento de la levadura. Tanto a temperatura ambiente como a 37° C, en 3 a 5 días aparecen colonias húmeda, mucoides, de superficie opaca, de color crema, con aspecto de leche condensada (Fig. 2). El examen microscópico de estas colonias revela las levaduras rodeadas por una pequeña cápsula.

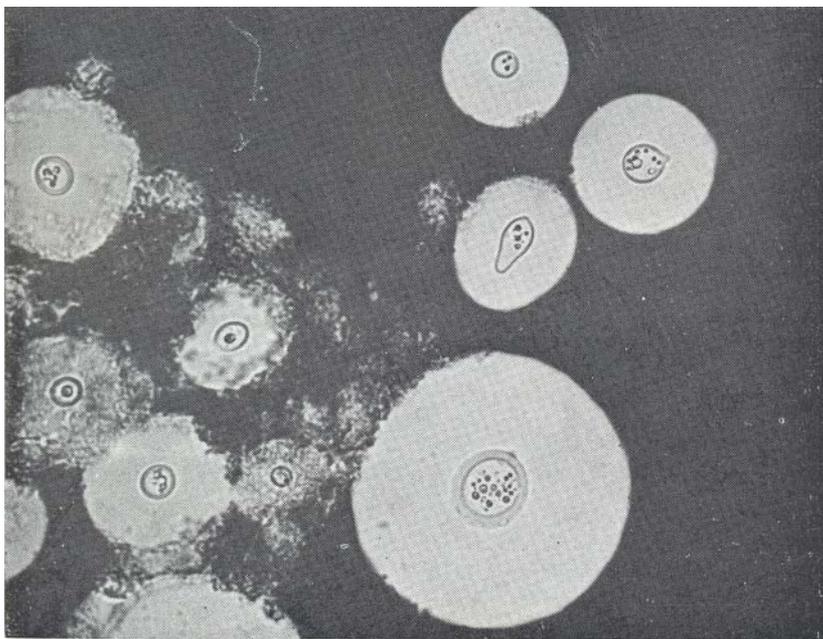


Fig. 1: *Cryptococcus neoformans*. Sedimento de L.C.K., preparación
Con tinta china., 900 X

Estudios efectuados por Staib (1962) demuestran que el efecto de enriquecimiento, para el crecimiento de *Cryptococcus*, que poseen los excrementos de palomas, se debe a su constitución bioquímica. Si bien el ácido úrico, la purina y guanina presentes en la orina de las aves son utilizadas por varias especies de *Cryptococcus*, la creatinina es utilizada exclusivamente por el *neoformans* y no por otras especies, ni por otras levaduras. Además, el autor ha demostrado que un pigmento, derivado de una semilla muy utilizada en los alimentos para canarios (*Guizotia abyssinica*) es absorbido selectivamente por el *C. neoformans*.

Un medio que contiene agar, glucosa, creatinina, extracto de *Guizotia abyssinica* adicionado de cloramfenicol favorece el crecimiento específicamente de *Cryptococcus neoformans* y las colonias adquieren un color marrón muy nítido. Este medio de cultivo es de gran

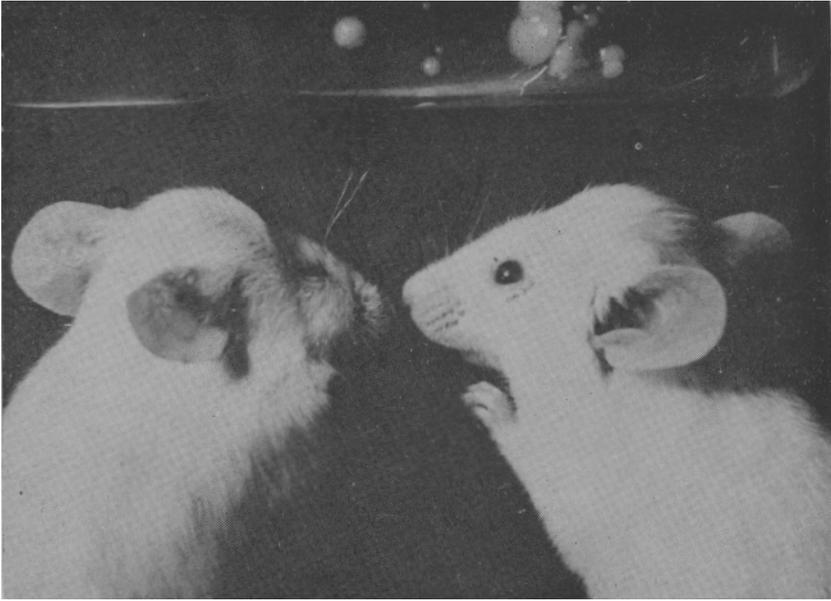


Fig. 2: Colonias de *Cryptococcus neoformans* en Agar glucosado de Sabouraud. 10 días a TA. Importante abultamiento y deformación del cráneo en ratones blancos jóvenes una semana después de inoculados con 0.02-0.04 cc. de suspensión del *C. neoformans*

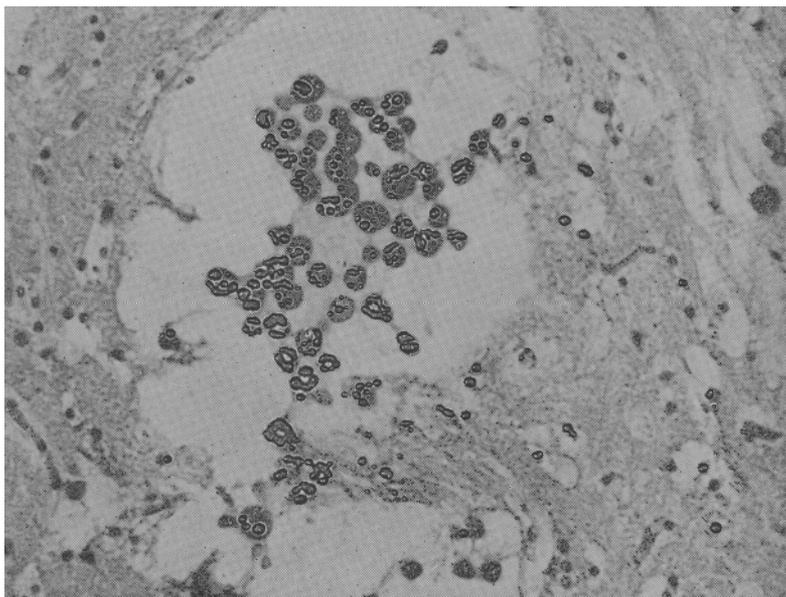
utilidad en el aislamiento e identificación del *Cryptococcus neoformans*.

- 3) *Inoculación animal*: El *Cryptococcus neoformans* es la única especie del género patógena para animales. El animal de elección es el ratón blanco joven y las vías de inoculación más utilizadas son la intracerebral (0.02 a 0.04 cc) y la intraperitoneal (0.5 cc). Ratones blancos de 4 a 6 semanas de edad, bajo ligera anestesia con éter, son inoculados por vía intracerebral. Entre 3 y 5 días después el animal inoculado muestra trastornos del comportamiento: se tranquilizan o bien presentan síntomas cerebelosos como el caminar tambaleante, en círculos. El aumento de la presión intracraneana, por la infección, da lugar a una deformación progresiva de la bóveda craneana de los animales jóvenes y éstos terminan por morir, pasadas una o dos semanas de la inoculación (Fig. 2). Al autopsiar los animales muertos o sacrificados,

se observa el cerebro pre congestionado y edematoso. El examen con tinta china de una uequeña muestra del tejido cerebral revela numerosos *Cryptococcus*, con una gruesa cápsula.

- 4) *Examen histopatológico:* Las células fúngicas son fácilmente demostradas en los tejidos afectados bien sea por el procedimiento histológico de rutina (hematoxilina-eosina) o bien por procedimientos especiales para hongos como el de Gomori-Grocott o el de células aisladas o en cúmulos, redondas u ovales, de 5 a 8 u de diámetro, de gruesa membrana rodeados por un halo claro representado por la cápsula no coloreada, en medio de una reacción inflamatoria tisular muy escasa o ausente (Fig. 3).

Mediante el procedimiento de Mucícarmin de Mayer se puede visualizar muy bien la cápsula del hongo, bajo la forma de un halo rojo que rodea a la pared bien coloreada de la levadura.



*Fig. 3: Lesión pseudoquistica en cerebro de ratón infectado experimentalmente con *C. neoformans*. Coloración de PAS. 250 X*

IDENTIFICACION DEL CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS

La observación y/o el aislamiento de una levadura capsulada en el LCR es evidencia suficiente para un diagnóstico de criptococosis del sistema nervioso central. Al examinar materiales como esputo, orina, heces, piel, etc., es necesario tener en cuenta han sido aislados *Cryptococcus* saprofitas morfológicamente idénticos al *C. neoformans*, aunque muy diferentes desde el punto de vista, biológico.

Características propias del C. neoformans:

- 1) Capaz de crecer a 37° c
- 2) Producción de colonias de color marrón en medio de agarcreatinina + extracto de *Guizotia abyssinica*.
- 3) Prueba de asimilación: Asimila G., gal, S, M y no asimila L y KNO₃.
- 4) Patógena para el ratón.

5) *Métodos inmunológicos:* La inmunofluorescencia tiene

importantes aplicaciones en el diagnóstico serológico de la criptococosis.

La reacción de anticuerpos fluorescentes indirecta (IFA) es utilizada desde los trabajos de Vogel & colab. (1958, 1961) demostrando una gran sensibilidad y especificidad en casos de criptococosis.

Durante los últimos años, trabajos desarrollados por Kaufman & colaboradores, entre otros, hacen hincapié en la utilización concomitante de tres pruebas: Pr. de anticuerpos fluorescentes indirecta (IFA), Pr. de aglutinación en tubos (TA) para determinar anticuerpos contra *Cryptococcus neoformans* y una prueba de aglutinación al látex (LA) para antígenos de *Cryptococcus*. Utilizando esta batería de pruebas serológicas los autores logran el diagnóstico presuntivo de criptococosis en un 95% de casos probados que se sometieron al estudio.

MICETOMAS

Dr. TULIO BRICEÑO M.

Vandyke Carter en 1860 introdujo el nombre de Micetoma para designar una inflamación crónica, fíbrsante, con ataque óseo, presencia de numerosos trayectos fistulosos por donde se drena pus con pequeños granos característicos. El también hizo una clasificación dependiente del color de los granos. En 1905 del parasitólogo francés Emile Brumpt demostró que diferentes clases de hongos podrían producir el mismo cuadro clínico.

El problema de los micetomas es sumamente complejo. Las dificultades se encuentran tanto en el diagnóstico etiológico, como el tratamiento y pronóstico.

En general hay dos tipos de Micetomas los causantes por miembros de la familia *actinomycetaceae* y los causados por verdaderos hongos filamentosos.

Se encuentran entre los actinomycetaceae:

- Actinomyces bovis.
- Actinomyces israeli.
- Nocardia brasiliensis.
- Nocardia asteroides.
- Nocardia Caviae (posible variante de la asteroides).
- Streptomyces madurae.
- Streptomyces pelletieri.
- Streptomyces somaliensis.

Se encuentran entre los hongos verdaderos:

- Madurella grisea.
- Madurella mycetomi.
- Cephalea porium recifei.
- Pyrenochaeta romeroi.
- Monosporium apiospermum.

Son frecuentes los micetomas en los trabajadores del campo, especialmente en los Estados Lara y los del Oriente de Venezuela.

La lista de agentes causales de micetomas aumenta a medida que haya más técnicos e institutos interesados en el problema.

En otras latitudes se han encontrado con frecuencia otros hongos tales como *Phialophora jeanselmei*, *Aspergillus nidulans*, *Cephalosporium falciforme*, *Leptosphaeria senegalensis*.

Juan Mackinon estudiando 74 de maduromicosis encontró 42 casos con diagnóstico positivo distribuidos en la siguiente forma: *M. mycetomy-13*; *M. grisea-12*; *Allecheria boydii-11*; *Phialophora jeanselmei-1* y *Pyrenochaeta romeroi-1*.

En un extenso estudio hecho por Mariat publicado hace años en el Boletín de la Sociedad de Patología Exótica analiza los datos sobre 854 micetomas reportados de todas partes del mundo.

Las conclusiones fueron: la *Madurella mycetomi* en el hongo más frecuentemente observado con un 18,61% del total, siguen la *Leptosphaeria senegalensis* con 5,26%, el *Monosporium apiospermum* con 3,39% y la *Madurella Grisea* con 3,27%.

Las nocardias, especialmente la *N. brasiliensis* son los agentes de micetomas actinomicéticos más frecuentes. La *N. brasiliensis* con un 31,38%, el *Streptomyces pelletieri* 9,48%, el *Streptomyces madurae* 7,72% y el *Streptomyces somaliensis* 7,37%.

Según reciente artículo del Dr. Dante Borelli, aparecido en la revista DERMATOLOGIA VENEZOLANA, Dic. de 1972, los micetomas son producidos en orden de frecuencia por los siguientes microorganismos: *Actinomyces spp.*, *Nocardia brasiliensis*, *Madurella grisea*, *Madurella mycetomi*, *Allescheria boydii*, *Streptomyces madurae*, *Hyalopus (Cephalosporium) falciformis*, *Hyalopus (Cephalosporium) reci f ei*, *Nocardia asteroides*, *Nocardia caviae*, *Streptomyces somaliensis*, *Streptomyces pelletieri*, *Streptomyces paraguayensis*, *Pyrenochaeta romeroi*. En presencia de tantos agentes causales se puede repetir que el micetoma es esencialmente una expresión clínica.

Para el diagnóstico es indispensable la obtención de granos, éstos se pueden lograr exprimiendo los trayectos supurantes, cureteándoles o dejando una mecha por más o menos 24 horas.

El color y la forma de los granos nos da un indicio de la clase de microorganismos responsables. Las técnicas de cultivos ya son de todos conocidas. En todo caso en que se sospeche actinomices habrá que hacer un Ziehl-Neelsen de los frotos de los granos y hacer siembras en anaerobiosis.

CARACTERES DE LOS GRANOS EN MICETOMAS

N. asteroides: Pequeños, 1 milímetro diámetro, color. blanco amarillento, blandos con formas en clava o no.

N. brasiliensis: Pequeños, 1 milímetro diámetro, color blanco amarillento, blandos con formas en clava o no.

N. cavíae: Pequeños, 1 milímetro diámetro, color blanco amarillento, blandos con formas en clava o no.

S. madurae: Grandes, de hasta 10 milímetros, blanco amarillentos, blandos con clavos o no.

S. semaliensis: Pequeños, de 1 a 2 milímetros, amarillo oscuro, duros, redondeados con bordes lobulados, clavos periféricas.

S. pelletieri: Pequeños, de 3 a 500 micras, rojas, duros y lisos.

S. paraguayensis: Pequeños, de 50 micras de diámetro, negros, duros, con clavos en periferia.

Actinomyces: Gránulos pequeños, blanco amarillentos, hifas de 1 micra de diámetro, clavos en la periferia (estos granos a veces no están presentes).

Granos negros: Negros opacos, 4 mm hifas gruesa en sustrato ocre. *M. micetomii*; *M.* grisea, lobulados, zona externa oscura, interna clara. Formas tubulares en *pyrenochaeta romeroi*; *Lepto-Sphoeria senegalensis*; *phialohora jeanselmei*: vermiculares, blancos con grandes clamidospora.

Granos blancos amarillentos: *Allescheria boydii*, *Monosporium apiospermum*, *Cephalosporium falciforme*, *Cephalosporium recifè*

(Este tiene zona peridérica con clamidosporos y centro claro con hifas).

Granos de actinomycetos: Hifas muy delgadas de 1 micra o menos; no hay clamidosporas pero sí se encuentran clavos en la periferia. Y por último la *neotestidinarosatii*.

Granos de maduromicosis: Hifas gruesas de 2 a 4 micrones además se encuentran machos clamidosporas.

INMUNOLOGIA

Los estudios inmunológicos en las enfermedades micósicas tienen un gran porvenir a pesar de extremada dificultad. Su importancia se diagnostica y pronostica. Son útiles en el tratamiento, por ejemplo para desensibilizar al paciente, y aun también los procedimientos inmunológicos pueden ayudar en la Taxonomía como ha pasado con el deslinde entre la *Madurella grisea* y la *Pyrenochaeta romeroi*, las pruebas serológicas favorecen su diferenciación.

Recientemente la Pan American Health organization (PA H O (5) ha publicado un manual de procedimientos estandarizados de serodiagnóstico para micosis sistémicas.

Esperamos que estos procedimientos aplicados a otras micosis sean publicados en un futuro próximo.

Citaremos algunos trabajos ilustrativos en los estudios inmunológicos. El Sheikn Magoub (6) ha contribuido con notables estudios sobre el tema, en sus experiencias en el Sudán empleó el método de la doble difusión en agar con antígenos preparados con 4 especies de *Streptomyces* (*S. somaliensis*, *S. madurae*, *S. Pelletierie*, *S. canescens*), y el de *Madurella mycetomi*. Colectó suero de 14 pacientes con *M. mycetomi*. Se emplearon 36 sueros de control. Todos, menos uno, de los sueros de actinomicetomas reaccionaron con uno o más de los antígenos de *Streptomyces*, pero ninguna frente a antígenos de *Madurella*.

Las reacciones más fuertes fueron con antígenos homólogos. Todos los sueros de maduromicetomas, humanos o de ratones, reaccionaron con el antígenos de *Madurella* pero ninguno con el antígeno de *Streptomyces*. Los 36 controles fueron negativos. No se encontraron reacciones cruzadas entre actinomicetomas y maduromicetomas.

También en este artículo -se mencionan los trabajos de I. G. Murray y el Moghraby quienes probaron que intradermo reacciones con antígenos apropiados pueden hacer distinguir entre lesiones micetómicas producidos por *Streptomyces somaliensis* y *S. Madurae*.

I. G. Murray publicó en 1971 un interesante trabajo sobre el progreso en el diagnóstico serológico de los micetomas y otros hongos,

tropicales. En animales de experimentación pudo distinguir entre infecciones producidas por *Madurella micetomi* y *M. grisea* utilizando intradermo reacciones. En pacientes se comprobó que en los casos de actinomycetomas había reacción frente a antígenos de actinomicetos. En los maduromicetomas las reacciones fueron irregulares, pero nunca hubo reacción con los antígenos de actinomicetos.

Los conceptos serológicos también se pueden aplicar en taxonomía. Por empleo Segretain y Destomes señalaron las similitudes entre *M. grisea* y *Pyrenochaeta romeroi* sin embargo Murray y Buckley demostraron diferencias serológicas entre ellas.

Desde el punto de vista diagnóstico ha habido en el campo serológico grandes progresos. Naturalmente falta mucho por hacer. Uno de los grandes escollos es la estandarización de los antígenos. Estos no se consiguen comercialmente de tal manera que cada investigador tiene que preparar sus propios antígenos.

En general los métodos son simples y bastante seguros. Es de esperar que en el futuro se creen centros para conducir estos trabajos, cosa que ya está siendo analizada por la organización Pan-Americana de la salud (PAHO).

Aunque desbordemos un tanto la naturaleza de esta presentación quisiéramos hacer una breve referencia al tratamiento de los micetomas. Aquí más que nunca es importantísimo el estudio micológico de las lesiones para determinar el hongo causante. En los casos de actinomycosis la penicilina es el antibiótico de elección a razón de 2 a 4 millones diarios, en general este tratamiento debe ser completamentado con otros antibióticos de amplio espectro. Las sulfanilamidas son útiles. En algunos casos resistentes a la penicilina se puede usar la estreptomina. Algunos autores americanos recomiendan aún el yoduro de potasio en solución saturada, tomada en gotas, en dosis progresivas, empezando con 3 T. I. D. hasta llegar a 20 gotas T. I. D., luego empezar de nuevo; sin embargo algunos opinan que este tratamiento es de efectos dudosos.

La cirugía debe recomendarse en ciertos casos para el drenaje y curetaje de fístulas o lesiones óseas. Aun se podría recomendar lobectomías en casos pulmonares refractarios y en casos seleccionados.

El tratamiento de las nocardiasis es el mismo aunque hay que notar que éstas son bastante sensibles a los sulfanilamidas.

Hay drogas que afectan adversamente la buena evolución del tratamiento antimicótico como el uso de corticoesteroides, antifólicos y quizá algunos otros más.

La Diaminodifenilsulfona se puede usar a razón de 100 a 200 miligramos diarios.

En el número de mayo de 1972 del Am. Journal of Trop. Med. and Hyg. El Seikh Mahgoub informa de 5 casos infectados por *A. madurae*, *A. pelletieri*, *N. brasiliensis* y *Streptomyces somaliensis* curados con la administración oral de sulfametoxazole más trimetropin (nombre comercial *Seprin*).

En los archivos de Med. interna de diciembre 1969 se encuentra un caso de *Monosporium apiospermum* tratado con anfotericina y 2-2 dihidroxy 5-5 diclorodifenilsulfoxide localmente, fueron disueltos en Dimetisulfoxide (D.M.S.O.) separadamente e inyectados permanentemente por catéter en las fístulas. Primero se empleó la anfotericina y después la otra droga. Hubo mejoría temporal.

En caso tratado y observado por mí por años de infección por *M. apiospermum* no hubo mejoría temporal.

En caso tratado y observado por mí por años de infección por *M. apiospermum* no hubo mejoría con tratamiento muy prolongado con griseofulvina. Más tarde tuvo tratamiento quirúrgico con curación.

La doctora M. C. de Albornoz reportó un caso de *Cephalosporium recifei* tratado con gran mejoría de las lesiones con griseofulvina a razón de 2 gramos diarios por 3 meses.

La anfotericina B. puede ser muy útil usada, bien por el método de inyección rápida (pequeña dosis) recomendado por el Dr. Borelli o bien por el método corriente de administración lenta y dosis elevadas.

MICETOMAS

Dr. RAMON ZAMORA

Cumpliendo con la parte encomendada por el Dr. Dante Borelli, de seguida expongo sobre el diagnóstico práctico de los Micetomas. Consideramos que el micetoma es un síndrome producido por diversos agentes etiológicos. Cada agente tendrá una sensibilidad para los antibióticos o quimioterapia, además cada cepa tiene una virulencia especificada. Es por ello que es muy importante conocer la especie que afecta al paciente.

Para la identificación de los agentes de micetomas se necesita de datos que aporta el estudio morfológico del grano, el color, etc. El cultivo del grano, visualizando características macroscópica y microscópica, propiedades bioquímicas de la colonia.

Inoculación experimental especialmente a ratones; por último la morfología del grano procesado por métodos histopatológicos, con coloraciones especiales.

Hay agentes de micetoma cuya identificación puede hacerse con la sola observación en fresco del grano, mientras que otros necesitan agotar todos los procedimientos antes expuestos.

PROCEDIMIENTOS

Una vez hecho el diagnóstico clínico de micetoma se procede a abrir una de las fístulas del órgano afectado. Al comprimir deben salir los granos. 1º) Observar el color, que puede ser negro, rojo o claro (blanco-amarillento). 2º) Examen directo en fresco: se coloca entre lámina y laminilla colocando previamente una gota de formol. Observe los bordes, las estructuras periféricas (clava en los *Actinomyces*, flecos en el *Streptomyces madurae*, etc.), el centro o médula: si tiene hifas tramadas o flojas con clamidoscopras intercaladas (*Aureobasidium mansonii*). 3º) *Cultivo*. es necesario disponer de la siguiente batería de medios: a) Agar-corazón cerebro al 1% de agar, sembrando por función e incubado a 37° C en caso de que haya sospecha de acti-

nomycosis. b) *Sabouraud o Lactrimel: sin antibiótico*, donde crecen todos los agentes de micetomas: Nocardias, Streptomyces y Eumicetos.

La incubación debe ser de 25 a 30°C. Una vez desarrollados se observará el aspecto microscópico, sus pigmentos como el violeta en la Nocardia asteroides, amarillo en la Nocardia brasiliensis, el cambio de tonalidad amarillo naranja-rojo en el Streptomyces madurae, el moho gris ratón en la Madurella grisea, etc.

El reverso para observación de la producción de pigmento difuso, por ejemplo, amarillo en la Madurella mycetomi.

El estudio de propiedades bioquímicas: como el comportamiento en la leche tornasolada, liquefacción de la gelatina muy usados en la identificación de nocardias.

El cultivo en lámina para identificación de Streptomyces y todos los Eumicetos, donde se busca la producción de órganos de reproducción: esclerotes en Madurella mycetoni, picnidias en Pirenochaeta romeroi: Chaetosphaeronema larense, fialides como en el Aureobasodiu mansonii.

La inoculación al ratón se utiliza como sustituto del cultivo en algunas especies o para la identificación en otras debido a la producción de granos experimentales.

La histopatología también aporta datos que en algunos casos son definitivos como en el Streptomyces somaliensis.

RESUMEN

Extracción del grano: Observación y su morfología. Siembra en medios para hongos que no contengan antibióticos.

Histopatología: Inoculaciones experimentales.

CONCEPTO DE ENDEMIAS

Dra. MARIA B. DE ALBORNOZ

Se entiende por epidemia la presencia habitual de una enfermedad dentro de un área geográfica.

Básicamente, la orientación y estudio para clasificar a determinada zona como endémica a una infección, podría estar determinada por los siguientes aspectos: (Ver Cuadro N° 1).

El punto de partida sería el diagnóstico clínico de casos, ya sea en la misma zona de origen del paciente o en centros especializados de enfermos provenientes de determinadas zonas, esto llevaría a hacer estudios epidemiológicos, los cuales ayudarían a conocer la magnitud de la infección presente en la población, y por último, los estudios ecológicos, el cual comprendería el aislamiento del agente causal y el conocimiento de los factores que condicionan la viabilidad del hongo en su reservorio.

De lo anteriormente expuesto es fácil deducir la importancia que para el estudio y diagnóstico de las micosis supone la presencia de personal especializado y bien equipado, distribuido en todo el país.

Los estudios efectuados en Venezuela que permiten catalogar a ciertas áreas como endémicas, han sido llevadas a cabo en la Histoplasmosis, Paracoccidioidomicosis y Coccidioidomicosis.

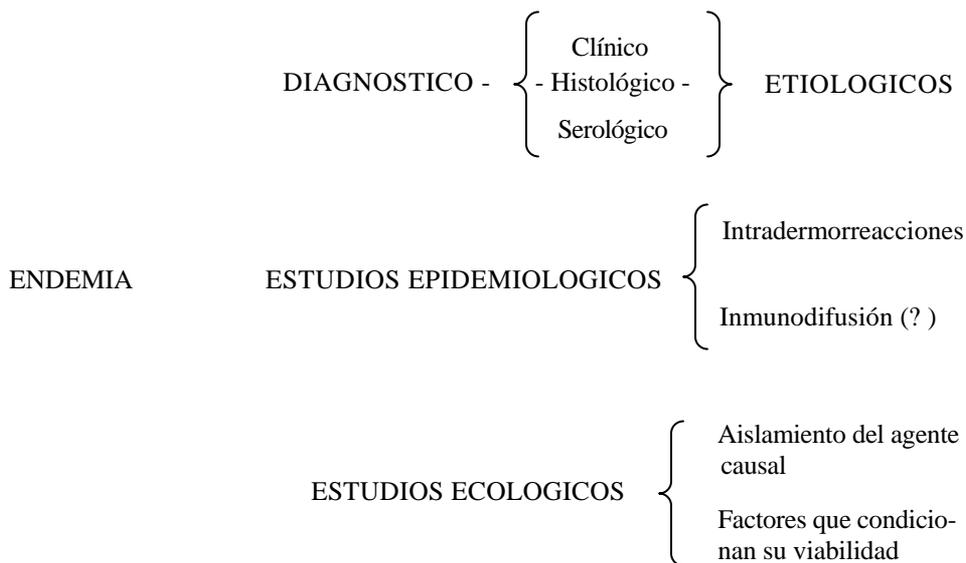
Por los resultados obtenidos en las encuestas epidemiológicas, las zonas endémicas de la Paracoccidioidomicosis e Histoplasmosis parecen coincidir: estados andinos, regiones centrales: Miranda, Aragua y Carabobo, y en las regiones orientales: Monagas, Anzoátegui y Bolívar; estas últimas zonas han sido más estudiadas para la Histoplasmosis.

Sobre la Coccidioidomicosis la zona endémica es mucho más reducida por los estudios de Campis, se considera limitada a las zonas más áridas de Lara, Zulia y Falcón.

En cuanto a las micosis subcutáneas, la Esporotricosis es una de la más frecuente y extendida en todo el país, predominando en los estados centrales y zonas andinas.

En la Cromomicosis, tenemos que una gran mayoría de los casos proviene de las zonas áridas del Zulia, Lara, Falcón y Yaracuy, casos esporádicos provienen del resto del territorio nacional.

CUADRO N° 1



**LA TECNICA CON ANTICUERPOS FLUORESCENTES
DIRECTA PARA EL DIAGNOSTICO
DE LAS ENFERMEDADES MICOTICAS**

Dr. WILLIAM KAPLAN

INTRODUCCION

Con la introducción de la técnica con anticuerpos (FA) fluorescentes (COONS *et al*) se puso a la disposición un valioso instrumento serológico para la rápida detección e identificación de microorganismos así como también la demostración de anticuerpos en sueros y . otros tipos de especímenes. Desde su advenimiento, la inmunofluorescencia ha demostrado ser un instrumento valioso para la investigación inmunológica, patología experimental, investigaciones citológicas y el diagnóstico microbiológico.

PRINCIPIO

La técnica FA es un procedimiento de coloración inmunoquímico, que permite la visualización microscópica de una reacción antígeno anticuerpo. Entonces, la inmunofluorescencia es un procedimiento por el cual las reacciones inmunes pueden observarse al nivel celular y como tal combina las disciplinas de inmunología y microscopia. Las reacciones pueden observarse empleando anticuerpos conjugados a un tinte fluorescente. El complejo anticuerpo-fluorocromo se denomina anticuerpo identificado o conjugado. La unión del anticuerpo identificado y el antígeno resulta en un producto fluorescente, cuando se observa bajo un microscopio que capte esta fluorescencia. Los componentes esenciales de un microscopio fluorescente convencional constituyen una fuente de luz brillante que produce un flujo poderoso de energía especialmente en la región de onda corta del espectro de luz, filtros selectivos para el control de la excitación fluorescente y la emisión de radiación y microscopio corriente acondicionado con condensador de campo oscuro.

Los fluorocromos usados con mayor frecuencia son derivados de fluoresceína, una tintura fluorescente que da un color amarillo

verdoso. Los fluorocromos de otros colores como la rodamina y sus derivados dan un color rojizo y también se usan como compuestos para clasificar.

El procedimiento FA más sencillo, denominado técnica FA directa, asegura la aplicación del anticuerpo identificado en tinte de cultivos o materiales clínicos, o en secciones de tejidos. Después de un período predeterminado de incubación, se retira el exceso de conjugado, lavándolo, se monta la preparación y se examina por medio de un microscopio de fluorescencia. El procedimiento FA directo se usa principalmente para la detección e identificación de organismos o antígenos.

Los métodos que se describen para realizar las pruebas FA directas para la detección e identificación de hongos son esencialmente aquellas usadas por la Sección de Micología del Centro para el Control de la Enfermedad, Atlanta. Otros trabajadores han usado modificaciones de estos procedimientos, habiéndolos encontrado satisfactorios.

REACTIVOS

1. Antglobulinas Fluorescein-identificadas.

Los reactivos diagnósticos para la identificación de la mayoría de los hongos patógenos todavía no se pueden conseguir comercialmente. Por consiguiente, quien desee aplicar la técnica FA directa para el estudio de problemas médico-micológicos tendrá que preparar sus propios conjugados, al menos que se tenga acceso a otras fuentes de dichos reactivos. Las instrucciones generales para la preparación de los conjugados pueden encontrarse en los manuales "Técnica de Anticuerpos Fluorescentes" por Cherry y "La preparación y Caracterización Fisioquímica de los Reactivos Anticuerpos-Fluorescentes" por Herbert y en los libros "Trazo de Proteínas Fluorescentes" por Mairn y "Métodos de Anticuerpos Fluorescentes" por Goldman. Los documentos que tratan sobre la producción de conjugados para la detección e identificación de hongos se encuentran en un artículo de repaso por Kaplan.

2. Globulinas preinmunización Fluorescein-identificadas.

Este conjugado, llamado "normal", sirve de control negativo en las pruebas FA directas.

3. Solución Tripsina al 1%.

Una solución de reserva de tripsina al 10% se prepara de acuerdo al procedimiento descrito por Wallis *et al.* La solución de reserva se disuelve al 1 % de concentración con solución salina buffer de fosfato y luego se ajusta a un pH de 8,0 con buffer carbonatobicarbonato, pH 9,0.

4. Solución Ditiotreitol (Reactivo Clelland).

Este reactivo se prepara disolviendo 0,5 gramos de ditiotreitol en un total de 100 ml. de una solución de sodio citrato al 2,94% (el ditiotreitol es estable en solución y el reactivo puede prepararse por adelantado).

5. Solución N-acetil-1-cisteína.

Este reactivo se prepara disolviendo 0,5 gramos de N-acetil-1-cisteína en un total de 100 ml. de una solución de citrato de sodio al 29,4% (como al N-acetil-1-cisteína, es relativamente inestable en solución, el reactivo debe ser preparado antes de su caso).

6. Buffer salino-fosfato pH 7,2.

Solución A: Disolver 1,4 gramos de Na_2HPO_4 en 100 ml. de H_2O destilada.

Solución B: Disolver 1,4 gramos de $\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ en 100 ml. de H_2O destilada.

Agregar 84,1 ml. de solución A a 15,9 ml. de solución B. Luego agregar 8,5 gramos de Na Cl. Disolver y agregar suficiente H_2O para hacer 1 litro.

7. Buffer bicarbonato-Carbonato, pH 9,0.

Solución A: Disolver 5,3 gramos de Na_2CO_3 en 100 ml. de H_2O .

Solución B: Disolver 4,2 gramos de Na HCO_3 en 100 ml. de H_2O .

Teóricamente, cuando se mezclan 4,4 ml. de solución A con 100 ml. de solución B, el pH debe ser 9,0. Sin embargo, en la práctica usualmente es necesario agregar tanto como 17 ml. de solución A a 100 ml. de solución B para obtener el pH apropiado.

8. Líquido glicerol-salino para montar.

Este líquido para montar se prepara agregando una parte de buffer salino-fosfato, pH 7,2 a 9 partes de glicerol C.P.

APARATOS ESPECIALES

1. *Microscopio fluorescente.*

Las hifas y las esporas de los hongos pueden tener autofluorescencia. Si no se usan filtros apropiados, estos elementos pueden fluorescer con un color verdoso simulando el de fluoresceína. Si esto ocurre, puede ser difícil diferenciar entre autofluorescencia y fluorescencia de anticuerpo-antígeno fluorescente específico. Este problema se puede obviar utilizando filtros apropiados.

Las siguientes combinaciones de filtros son satisfactorias para utilizar con hongos:

<i>Filtro Primario</i>	<i>Filtro Secundario</i>
BG-12,3 mm. de espesor	Wratten 2A
BG-12,3 mm. de espesor	Schott GG-9
5113 Vidrio Corning, 3 mm. de espesor	Wratten 2A

Otras combinaciones de filtros también pueden ser completamente satisfactorias.

2. *Láminas para microscopio.*

Es importante que las láminas sean de 1 mm. o menos de espesor. También se sugiere se utilicen láminas con extremos escarchados.

3. *Cámara de humedad.*

Una placa de Petri acondicionada con filtro de papel sirve de cámara de humedad satisfactoriamente.

PROCEDIMIENTO

1. *Especímenes de procesamiento.*

a) Cultivos.

Las suspensiones de cultivos se hacen en H₂O destilada. Se toma una presilla empapada en la suspensión y se coloca en una lámina y se extiende para cubrir un área de 1 cm. de diámetro. Se deja airear hasta secarse, y luego se fija por calor.

b) Pus, exudados, tejido fresco.

Los preparados se colocan directamente en las láminas y se dejan al aire. Los preparados se fijan por calor.

c) Líquido espinal, orina.

El espécimen debe centrifugarse primero. Los preparados se colocan directamente del sedimento en las láminas. Los preparados se dejan secar al aire, y luego se fijan por calor.

d) Espustos.

Los espustos deben primero digerirse ya sea con dítiotreitol o N-acetil-1-cisteína. Se agrega un volumen igual de cualquiera de los digestivos al espécimen y se mezcla en una mezcladora vortex hasta que el esputo se licúe. (10 a 60 segundos, según sea necesario). El esputo licuado se centrifuga y se preparan los extendidos del sedimento directamente en las láminas. Se dejan secar al aire y luego se fijan por calor.

e) Secciones de parafina de tejido en formalina.

Se cortan secciones de un grosor de 4 a 6 u. Se desparafinan las secciones en la forma usual, pasándolas a través de dos cambios de xilol y luego se hidratan por medio de pases a través de concentraciones graduadas de alcohol a buffer salino pH 7,2. Luego se digieren las secciones en una solución de tripsina de 1,0%, pH 8,0 durante una hora a 37° C en un baño de agua. Las secciones digeridas se fijan entonces por calor.

f) Secciones de tejidos previamente teñidas por métodos convencionales.

Es posible aplicar la técnica FA para la detección e identificación de hongos en secciones previamente teñidas por los métodos hematoxilina y eosina, el Giesma, el Wrigth, o el Brown y Brenn. (Los hongos en secciones previamente teñidos por los métodos PAS, Gomori nitrato metamina-plata y Gridley, no pueden, como regla, ser teñidos nuevamente por el procedimiento FA). Para aplicar FA en la demostración de hongos en secciones previamente teñidas por estos métodos histológicos convencionales se deben retirar los cubreobjetos calentando la lámina a fin de ablandar el adhesivo. Luego se sumergen las láminas en xilol para retirar los cubre objetos y el adhesivo residual, se enjuagan en buffer fosfato-salino, pH 7,2. Luego se digieren las secciones en tripsina al 1,0% como se indicó en la sección anterior.

2. Tinción de las preparaciones.

a) Se aplica una porción generosa de antiglobulinas identificadas con una pipeta capilar al extendido o a la sección procesada.

Se aplica una porción de globulinas preinmunización identificadas (conjugado normal) y una réplica del extendido o de la sección procesada. Este es el control negativo.

b) Se esparcen con cuidado los reactivos con aplacador de madera sobre toda el área de cada extendido o sección.

c) Se colocan los extendidos o secciones en una cámara húmeda, y se incuban durante 45 minutos a 37° C.

d) Se retiran las láminas de la cámara húmeda y se enjuaga el exceso de conjugados en buffer-fosfato salino, pH 7,2. Entonces se lavan las preparaciones en buffer-fosfato salino, pH 7,2, durante 10 minutos.

e) Luego se lavan las láminas en agua destilada durante 5 minutos.

f) Se retiran las preparaciones y se dejan secar al aire.

g) Los extendidos o secciones se montan con solución buffer glicerol-salina.

h) Se examinan las preparaciones bajo microscopio de fluorescencia con objetivo seco de baja potencia primero y luego con el de la alta potencia.

Las células en las preparaciones tratadas con antiglobulinas identificadas que muestran una fluorescencia amarillo-verdosa (si el fluorocromo usado es fluoresceína) son los hongos buscados. Los hongos en el control negativo no deben fluorescer.

3. Determinación de los grados de fluorescencia.

El grado de fluorescencia puede determinarse de acuerdo a los siguientes criterios:

4+ fluorescencia máxima, amarillo-verde brillante

3 + fluorescencia amarillo-verde brillante

2+ fluorescente, pero opaco

± poca fluorescencia, muy opaca

- ninguna fluorescencia.

Fluorescencia de una intensidad de 1 a 4+ se interpretan como reacción positiva; ± y- como negativa.

DISCUSION

La técnica FA directa es un instrumento muy valioso y práctico para la detección e identificación rápida de hongos en cultivos y en la mayoría de los tipos de material clínico incluyendo secciones de tejidos fijados en formalina. Los reactivos han sido desarrollados para la identificación específica de muchos de los agentes de enfermedades micóticas profundamente implantadas, más importantes. Para otras será necesario realizar trabajos avanzados. También se pueden usar agentes FA que no sean especies específicas con gran ventaja en el diagnóstico de las enfermedades micóticas. Estos conjugados pueden usarse con fines residuales. Pueden usarse para la identificación presuntiva de hongos si la morfología del hongo teñido permite una clara distinción de otros organismos antigénicamente afines.

Quienes han usado la inmunofluorescencia para la demostración de hongos en cultivo así como en material clínico han quedado favorablemente impresionados con su rapidez, simplicidad y versatilidad. Sin embargo, el uso apropiado de la técnica FA requiere no menos habilidad, experiencia y formación de criterio que cualquier otro procedimiento diagnóstico micológico. Quienes tengan intención de utilizar esta técnica con fines de diagnóstico deberán procurarse el entrenamiento necesario.

POSIBILIDADES DE ERROR

1. Empleo de filtros no apropiados en la microscopía fluorescente.
2. La presencia de artefactos que lleven a la confusión en materiales clínicos como esputos, o en secciones de tejidos.
3. Empleo de reactivos FA no específicos para la identificación específica de hongos.
4. Dejar de incluir controles negativos apropiados.
5. Dejar de enjuagar las preparaciones apropiadas y adecuadamente después del tratamiento con los conjugados.
6. Empleo de láminas de vidrio demasiado gruesas.

El valor de la técnica de anticuerpos (FA) fluorescentes como instrumento para el diagnóstico e investigación en la microbiología está ampliamente documentado. Puede usarse para la rápida visualización e identificación de microorganismos, tanto viables como no viables, en cultivos así como en especímenes clínicos y ambientales.

En forma modificada, la inmunofluorescencia también puede usarse para detectar y medir anticuerpos en sueros y otros tipos de materiales clínicos.

Un número de trabajadores, atraídos por las potencialidades de diagnóstico e investigación de esta versátil técnica han investigado la posibilidad de usar el procedimiento FA en la micología médica. En la mayor parte, estos investigadores han hecho hincapié en las aplicaciones diagnósticas prácticas. Sus estudios han versado sobre el desarrollo de reactivos sensibles y específicos así como métodos efectivos para demostrar agentes de enfermedades micóticas en cultivos y en materiales clínicos. Algunos trabajadores han empleado también inmunofluorescencia para detectar y medir anticuerpos fungosos en sueros. Hasta el presente, la técnica FA ha sido aplicada a casi todas las micosis de importancia. Una revisión de lo que se ha alcanzado demuestra que la inmunofluorescencia se ha desarrollado hasta un nivel práctico para el diagnóstico de un número de enfermedades micóticas. Sin embargo, para otras micosis todavía habrá que realizar otros trabajos más evolucionados.

El presente trabajo no tiene la intención de ser una revisión comprensiva de todos los trabajos publicados que tratan sobre la aplicación de la inmunofluorescencia en la micología médica; en cambio, sí cubre aquellas aplicaciones diagnósticas consideradas de gran valor práctico en este momento. Estas aplicaciones se refieren al diagnóstico de las siguientes enfermedades: blastomicosis, candidiasis, coccidioidomicosis, criptocosis, histoplasmosis, paracoccidioidomicosis, esporotricosis y actinomicosis.

Blastomicosis.

La técnica FA se ha desarrollado hasta un nivel práctico para el diagnóstico de la blastomicosis. Se ha logrado un reactivo específico para la detección e identificación de *Blastomyces dermatitidis* en forma de levadura, y aparentemente se ha confirmado su eficacia en el uso diagnóstico.

Gordon fue el primer trabajador que empleó el procedimiento FA para colorear la levadura de BL *dermatitidis*. En una comunicación anterior reportó que las globulinas fluorescein identificadasisocianato, obtenidas de conejos infectados experimentalmente con *B. dermatitidis* habían teñido en forma brillante la levadura de

este hongo, pero también hubo reacción cruzada con células de *Candida albicans*. El reactivo, sin embargo, presentó poco o ninguna coloración cruzada con células de *Paracoccidioides brasiliensis* e *Histoplasma capsulatum*. Estos hallazgos preliminares indican la posibilidad de preparar un reactivo específico FA para la *B. dermatitidis* en forma de levadura. Este producto fue preparado subsecuentemente por Kaplan y Kaufman. Nosotros preparamos conjugados con antiglobulinas de conejos que habían sido previamente inmunizados con células de levadura *B. dermatitidis* en formalina. Además de colorear la levadura y las formas miceliales de la *B. dermatitidis* las antiglobulinas identificadas también colorearon en cruzamiento la levadura y las formas miceliales de *H. capsulatum*, *P. brasiliensis* y las células de muchos otros hongos heterólogos. Estos reactivos pueden producirse específicamente para la forma de levadura de *B. dermatitidis* por medio de absorciones con células en forma de levadura de *H. capsulatum* y *Geotrichum candidum*. Estas antiglobulinas identificadas absorbidas resultaron efectivas para la detección e identificación en las formas de tejido de *B. dermatitidis* tanto en cultivo como en materiales clínicos, incluyendo secciones de tejido fijadas en formalina.

Estos reactivos absorbidos no reaccionan, sin embargo, con la forma micelial de *BL dermatitidis*. En consecuencia, la FA todavía no puede emplearse para la identificación de la forma micelial de este hongo.

Candidiasis.

Numerosos trabajadores han explorado la posibilidad de emplear la inmunofluorescencia para la detección e identificación de la *Gandida albicans* así como otras especies de *Candida*. En todos los casos, los reactivos FA que se han producido han coloreado en forma brillante los organismos homólogos, tanto en cultivos como en materiales clínicos. Sin embargo, estos productos presentaron una reacción cruzada con otros miembros del género así como con otros hongos heterólogos. Todos los esfuerzos por producir conjugados específicos de una especie para la identificación de las *Candidae* han fracasado. Hasta el presente no ha sido posible obtener un solo reactivo específico para el uso diagnóstico. Sin embargo, algunos trabajadores han logrado utilizar con éxito una combinación de reactivos FA para identificar algunas de las especies de la *Candida*.

Gordon, Elliott, y Hawkins reportaron que la identificación específica de la *Candida albicans*, tipos A y B, *tropicalis* C, *stellatoidea* C, y de la *Torulopsis glabrata* se podía lograr empleando un par de antiglobulinas fluorescentes identificadas dirigidas contra la *C. albicans* Tipo A y contra la *T. glabrata*. El primer conjugado, cuando fue absorbido por células de *C. stellatoidea*, diferenció la *C. albicans* tipo A -*C. tropicalis* y *C. albicans* tipo B- *C. stellatoidea* de todos los otros organismos tipo levadura que se probaron. El último conjugado cuando fue absorbido por células de *C. albicans* tipo A, separó los dos pares de organismos en sus componentes respectivos y permitió la identificación de la *T. glabrata*. Los resultados obtenidos con el uso de la inmunofluorescencia con estos reactivos absorbidos y los obtenidos con los métodos convencionales se conforman con la identificación del 95% de 585 hongos tipo levadura.

Aun cuando no se han producido anticuerpos fluorescentes específicos para ciertas especies de las candidae, los reactivos FA *Candida* son de gran valor en los estudios experimentales así como para la investigación de materiales clínicos en los que sólo se requiere la detección de los organismos.

Varios investigadores han reportado que la técnica FA indirecta puede emplearse para la detección y medición de los anticuerpos de la *C. albicans* en suero. Lehner, en sus estudios, examinó el suero de 96 pacientes con candidiasis clínica, 99 individuos clasificados como portadores de *Candida*, y 80 sujetos de control no portadores. Reportó que el suero procedente de los sujetos de control por lo general presentó titulación para el anticuerpo fluorescente de hasta 1 : 8, mientras que el suero de los portadores tuvo titulación de hasta 1 : 16. En contraste, con algunas excepciones, el suero procedente de pacientes con candidiasis clínica tuvo titulación mayor de 1 : 16. En base a estos hallazgos, Lehner sacó la conclusión de que la técnica FA indirecta puede usarse como un auxiliar en el diagnóstico de la candidiasis. Esterly, en un estudio independiente, confirmó en su esencia el trabajo de Lehner. Ella examinó el suero de 47 pacientes con candidiasis clínica y el de 122 individuos normales y portadores de *Candida*. Encontró que el 96% de 122 "normales" y portadores tenían titulación en el suero de 1 : 64 o menos, mientras que 26 de los 47 pacientes con candidiasis clínica tuvieron titulaciones mayores de 1 : 64. Es de notar que dos terceras partes

de los pacientes con candidiasis, quienes eran mayores de seis meses, tuvieron titulaciones de 1 : 128 o más. Esterly concluyó que la prueba FA indirecta es un método simple, rápido y reproducible para detectar anticuerpos en suero que reaccionen contra la *C. albicans* y que puede usarse ventajosamente como un instrumento de diagnóstico. Esterly atribuyó las diferencias en los promedios de titulación en los dos estudios a la interpretación del punto final de fluorescencia.

Coccidioidomycosis.

La técnica FA ha sido desarrollada hasta un nivel práctico para la detección e identificación del *Coccidioides immitis* en forma de tejido así como también para la detección de anticuerpos contra este organismo en suero. Kaplan y Clifford fueron los primeros en desarrollar conjugados específicos para la identificación del *C. immitis* en forma de tejidos. Ellos encontraron que las antiglobulinas producidas por conejos infectados con *C. immitis* así como la de conejos inmunizados con artrosporas matadas con formalina, también pueden utilizarse con este propósito. Los conjugados preparados con estas antiglobulinas colorearon las endosporas y el contenido de las esférulas. Sin embargo, no tienen especificidad y cruz-colorearon el *H. capsulatum*, el *B. dermatitidis*, así como otros hongos heterólogos. La especificidad para el *C. immitis* en forma de tejido se consiguió por absorción de estos conjugados con células en forma de levadura de *H. capsulatum*. El conjugado preparado con las antiglobulinas procedentes de conejos infectados también puede ser específico por dilución. Se llevó a cabo un estudio para evaluar los conjugados específicos para uso diagnóstico. Usando los reactivos coloreamos las paredes de las endosporas y el contenido de las esferulas en frotis de pulmón de ratones que habían sido inoculados intraperitonealmente con suspensiones, de 42 aislados diferentes de *C. immitis* así como también en frotis de materiales clínicos procedentes de 16 de 21 casos culturalmente confirmados de coccidioidomycosis en humanos. Estos conjugados también colorearon el *C. immitis* en secciones de tejidos fijados en formalina.

Con la colaboración del Dr. Milton Huppert, de la Administración del Hospital de Veteranos, San Francisco, California, los estudios mencionados en el párrafo anterior se extendieron para el desarrollo de una prueba FA de inhibición para la detección de anticuerpos

contra la *C. immitis* en suero. Los conjugados específicos producidos por Kaplan y Clifford fueron usados en esta investigación. Nosotros examinamos 106 sueros por el procedimiento de inhibición FA y comparamos los resultados nuestros con los obtenidos por la prueba de fijación de complemento. De los 106 sueros probados, 91 habían sido obtenidos de casos de coccidioidomicosis confirmada y 15 de individuos afectados por otras enfermedades. Todos estos pacientes habían residido en un área endémica de coccidioidomicosis durante diferentes períodos de tiempo. De los 91 casos de sueros con coccidioidomicosis, 76 fueron positivos tanto para la prueba de inhibición FA como para la de CF, y cinco fueron negativos para los dos métodos. De los 15 sueros obtenidos de pacientes con otras enfermedades, nueve resultaron negativos y cuatro fueron positivos a las dos pruebas. Estos datos demuestran una conformidad general entre la prueba FA y la CF en estas series. También se estudió la eficacia de la prueba de inhibición FA para la detección de suero positivo tubo precipitina (TP). Estos casos tempranos de suero coccidioidemicosis fueron negativos a la prueba CF. Diez de los 11 sueros positivos TP probados fueron positivos al procedimiento de inhibición FA. Para obtener información sobre la especificidad de la prueba de inhibición FA, se probaron sueros procedentes de casos de blastomicosis, criptococcosis, e histoplasmosis. Casi la mitad de los sueros de histoplasmosis resultaron positivos, mientras que los de blastomicosis y criptococcosis fueron negativos. El alto grado de correlación entre los resultados obtenidos tanto por la prueba CF como la TP y el procedimiento de inhibición FA indica que esta última técnica puede usarse para la rápida detección de anticuerpos de *C. immitis* en suero. La prueba de inhibición FA no debe emplearse, sin embargo, en lugar de los procedimientos serológicos convencionales rutinarios. El papel apropiado de la técnica de inhibición FA es el cambio el de un instrumento suplementario para el diagnóstico en la prueba de sueros anticomplementarios y para la detección de anticuerpos en sueros, cuando se requieren unos resultados rápidos.

Todavía no se ha encontrado un reactivo FA de confianza para la forma micelial de *C. immitis*. El conjugado específico para la forma de tejido de este hongo no reacciona con elementos de la forma micheba. Sin embargo, el conjugado específico puede usarse indirectamente

tamente y con cierta ventaja para la identificación de cultivos de la forma micelial. La identificación de *C. immitis* en cultivo necesita del empleo de pruebas patógenas animales para demostrar conversión a la forma de tejido. El reactivo FA específico puede usarse para detectar e identificar endosporas y esférulas de *C. immitis* en tejidos de animales inoculados, en los casos en que los métodos convencionales no den resultado.

Cryptococcosis.

La técnica FA tiene muchas aplicaciones prácticas en el diagnóstico de la criptococcosis. Puede usarse para detectar e identificar el *criptococcus neoformans* en cultivo y en material clínico. También puede emplearse para demostrar anticuerpos criptocócicos en sueros y otros fluidos del cuerpo.

Entre los primeros reportes sobre el uso de la inmunofluorescencia en la micología médica está el de Eveland y sus asociados. Ellos utilizaron con éxito antiglobulinas *C. neoformans* marcadas con fluoresceína, no absorbidas, para estudiar la distribución de la *C. neoformans* y sus productos polisacáridos en tejidos fijados en formalina. Subsecuentemente, Marshall y sus colaboradores colorearon secciones de tejidos procedentes de casos humanos con criptococosis, con anticuerpos fluorescentes y compararon los resultados con los obtenidos con el mucicarmin de Mayer. Reportaron que su conjugado, aun cuando no específico para *C. neoformans*, coloreó el organismo con mayor intensidad y rapidez que el mucicarmín. En 1960, Kase y Marshall usaron la técnica FA para identificar *C. neoformans* en cultivo. De 92 aislamientos de este hongo, 91 fueron coloreados con antiglobulinas de conejo identificadas, preparadas contra cepas de *C. neoformans* identificadas como Evans tipo A, y Neill tipo 5. El aislado que no reaccionó pertenecía al Evans *C. neoformans* tipo suero C. Kase y Marshall colorearon este aislado con conjugados preparados con globulinas contra *C. neoformans* de Evans suero tipo B y C. También reportaron que sus antiglobulinas identificadas no tuvieron reacción cruzada con 23 especies diferentes de levaduras heterólogas pertenecientes a géneros distintos al *Cryptococcus*. Sin embargo, sus reactivos sí colorearon 4 aislados de *C. neoformans* var. *innocuos*, que muchos trabajadores consideran son especies distintas, el *C. diffluees*. Kase y Marshall no trataron de colorear ninguno de los otros miembros del género *criptococcus*.

Kaufman y Blumer investigaron la posibilidad de producir reactivos FA específicos para la identificación de la *C. neoformans*. Sus antiglobulinas de *C. neoformans* identificadas colorearon en forma brillante 27 aislamientos diferentes de *C. neoformans*. Estos, sin embargo, tuvieron reacción cruzada ante otras especies de *criptococcus* así como de varios miembros del género *Candida*. Encontraron que absorciones consecutivas con células de levadura de *C. neoformans* var. *uniguttulatus*, *C. albicans* y *C. curvata* producían el conjugado específico para *C. neoformans*. Sin embargo, el reactivo absorbido no coloreó un número de cepas de *C. neoformans*, un hecho que limita su utilidad en el diagnóstico. Esta falla en colorear fue lo que llevó a Pidcoe y Kaufman a intentar desarrollar un reactivo FA específico de mayor sensibilidad. Prepararon este conjugado absorbiendo antiglobulinas *C. neoformans* fluorescein-identificadas con células de *C. diffluens* y *C. krusei*. No cruz-coloreó 30 hongos heterólogos pertenecientes al género *Ozastomyces*, *Candida*, *Coccidioides*, *Cryptococcus*, *Histoplasma*, *Rhodotorula* y *Torula*. En pruebas con 34 aislados de *C. neoformans* todos a excepción de uno se colorearon en forma brillante con este reactivo. Además, el conjugado absorbido se empleó con éxito en la identificación de *C. neoformans* en frotis de exudados de lesiones y en secciones de tejidos procedentes de individuos infectados.

Pidcoe y Kaufman sacaron la conclusión de que su reactivo puede usarse efectivamente para el diagnóstico rápido y exacto de la criptococosis.

La inmunofluorescencia tiene una aplicación importante en el diagnóstico serológico de la criptococosis. La técnica del anticuerpo (IFA) fluorescente indirecto actualmente se usa con este fin. Vogel y sus asociados demostraron primero que la prueba IFA puede usarse para detectar anticuerpos criptococales en suero. Vogel continuó estos estudios y recientemente reportó que el suero procedente del 80% de pacientes con criptococosis era positivo a la prueba IFA. Se obtuvieron reacciones a bajo nivel con sueros procedentes de individuos que no tenían esta enfermedad. Sin embargo, no se observaron reacciones cruzadas con sueros procedentes de pacientes con blastomycosis, histoplasmosis, ni esporotricosis.

Recientemente, Kaufman y Blumer evaluaron la prueba IFA junto con otras pruebas para el diagnóstico serológico de la criptococosis.

Ellos reportaron que para una mayor cobertura diagnóstica se debían realizar tres pruebas serológicas concurrentemente: la prueba latex de aglutinación, para la detección de antígenos criptococales, y la prueba IFA tubo de aglutinación, para anticuerpos contra la *C. neoformans*. En sus manos la prueba IFA permitió la detección de anticuerpos criptococales en un 38% de pacientes con criptococosis. Se obtuvieron algunas reacciones cruzadas con sueros de pacientes con blastomycosis e histoplasmosis. Aun cuando la prueba IFA no fue completamente específica, ellos consideraron que era valiosa para el diagnóstico serológico de la criptococosis, particularmente cuando los especímenes son negativos a las pruebas latex y tubo aglutinación.

Histo plasmosis

La inmunofluorescencia puede usarse con gran provecho en el diagnóstico de la histoplasmosis. Puede emplearse para la detección e identificación de *H. capsulatum* en forma de tejido, en cultivo y en material clínico. Además, la inmunofluorescencia puede emplearse para demostrar anticuerpos de *H. capsulatum* en suero.

El informe anterior sobre la aplicación de la técnica FA en la histoplasmosis es por Gordon. Tuvo éxito en la coloración de la *H. capsulatum* en forma de células de levadura, con globulinas fluoresceín-identificadas obtenidas de conejos infectados con *H. capsulatum*. Este conjugado, sin embargo, coloreó en forma cruzada aislamientos de *B. dermatitidis* así como otros hongos heterólogos. Los esfuerzos por eliminar las reacciones cruzadas por medio de dilución del reactivo sólo tuvieron un éxito parcial.

A continuación del informe de Gordon, Kaufman y Koplax iniciaron estudios para desarrollar un reactivo FA específico para la forma del tejido del *H. capsulatum*. Produjeron este conjugado absorbiendo antiglobulinas *H. capsulatum* fluoresceín-identificadas con células de *B. dermatitidis* en forma de levadura. El conjugado específico se usó para identificar las células de *H. capsulatum* en forma de tejido en cultivo así como en frotis de impresión. Porter, Thomas, Furcolow y Varga examinaron 800 especímenes clínicos durante una investigación extensiva, con un conjugado producido de acuerdo con los procedimientos de Kaufman y Kaplan, así como con un reactivo producido por absorciones múltiples con tejidos y polvos de *Candida sp.* Reportaron que este último reactivo resultó efectivo, fácil de preparar, y más específico que el anterior.

En una evaluación posterior del conjugado específico, sin embargo, se encontraron un número de aislados de *H. capsulatum* que no colorearon o que lo hicieron en forma muy pálida. Con estos aislados se demostró que pertenecían a uno de los cinco serotipos reconocidos de *H. capsulatum*, denominado tipo 1:4.

La falla del conjugado específico desarrollado por Kaufman y Kaplan para reaccionar con el serotipo 1:4 limitó su utilidad diagnóstica. Por tanto, Kaufman y Blumer realizaron un estudio para producir un reactivo FA que permitiera demostrar específicamente el *H. capsulatum*, sin importar sus componentes antigénicos. Su finalidad era la de producir anticuerpos identificados contra el serotipo más completo de *H. capsulatum*. La absorción de este conjugado con células de *C. albicans* eliminó toda la reactividad cruzada a excepción de la de *B. dermatitidis* y *H. duboisii*. Sin embargo, el reactivo *C. albicans* absorbido coloreó brillantemente todos los serotipos de *H. capsulatum* conocidos. Al intentar eliminar la coloración cruzada residual por medio de absorciones con *B. dermatitidis* o *H. duboisii* el conjugado perdió su reactividad para colorear tanto los organismos homólogos como los heterólogos. A pesar de la presencia de anticuerpos de reacción cruzada, el conjugado de *C. albicans* absorbido puede usarse para fines de diagnóstico. Usualmente el *H. capsulatum* puede diferenciarse del *B. dermatitidis* en base a la morfología. Estos dos organismos pueden diferenciarse, cuando sea necesario, con FA usando el conjugado específico para la forma de levadura de *B. dermatitidis*. Este último reactivo colorea el *B. dermatitidis*, pero no reacciona con el *H. capsulatum*. El *H. capsulatum* puede diferenciarse del *H. duboisii*, cuando así se requiera, por medio de métodos micológicos convencionales.

Un número de trabajadores han investigado el valor de las antiglobulinas absorbidas *Candida* fluorescein-identificadas de *H. capsulatum* para demostrar el *H. capsulatum* en materiales clínicos humanos. Encontraron que sus conjugados todavía presentaban reacción cruzada de cierto grado con las células *B. dermatitidis* en forma de levadura. Varios trabajadores han explorado la posibilidad de usar el reactivo con esputos humanos. En base a estudios realizados con 84 muestras de esputos procedentes de 28 pacientes con histoplasmosis pulmonar (cavernosa) crónica comprobada o sospechada, Lynch y Plexico sacaron la conclusión de que los conjugados *Candida*-absorbidos pueden usarse con ventaja para la rápida verificación de la presencia de

H. capsulatum en los esputos. Reportaron que se obtuvieron mejores resultados con frotis preparados con el sedimento centrifugado de esputos tripsin-digeridos que con material no digerido. Carski, Cozad y Larsh en un estudio independiente confirmaron esencialmente el trabajo de Lynch y Plexico. Carski y sus asociados concluyeron que el procedimiento FA, realizado con antiglobulinas Candida-absorbidas identificadas puede ser un auxiliar valioso de los métodos culturales y clínicos en el diagnóstico de la histoplasmosis pulmonar. Debido a las persistentes reacciones cruzadas de sus conjugados con algunas cepas de B. dermatitidis así como algunos resultados positivos-falsos, estos investigadores recomendaron precaución cuando se intente usar la inmunofluorescencia como el único método para el diagnóstico de esta enfermedad. Porter y sus co-trabajadores exploraron la posibilidad de usar conjugados Candida-absorbidos para demostrar el H. capsulatum en frotis impresos con tejido. Examinaron tejidos procedentes de 372 animales representando 16 especies, por medio del procedimiento FA y compararon los resultados con los obtenidos por cultivo e histopatología. Sus hallazgos indicaron que la técnica FA es muy útil en la demostración de H. capsulatum en frotis de impresión con tejido animal infectado naturalmente. Sin embargo, ni la FA, ni la histopatología, o el cultivo por sí solo resultó completamente confiable para el diagnóstico de tales infecciones. Para una cobertura máxima en el diagnóstico, recomendaron usar los tres métodos.

Varios trabajadores han investigado la aplicabilidad de la inmunofluorescencia para la detección de H. capsulatum en secciones de tejido fijados. En sus estudios sobre la patogénesis de la histoplasmosis experimental en el ratón, Frocknow, Connelly y Ray demostraron la posibilidad de usar la inmunofluorescencia para demostrar H. capsulatum en secciones de tejido fijadas en ácido pícrico-alcohol-formalina. Yamaguchi, Adriano y Braunstein aplicaron con éxito la técnica FA para demostrar el H. capsulatum en secciones de tejido procedente de pulmones y nódulos linfáticos humanos que habían sido fijados en formalina al 10% o en fluido Bouin. Reportaron que lograron detectar células de levadura coloreada en secciones desparafinadas en 22 de 24 tejidos previamente hallados por medio del procedimiento de coloración Grocott para ser infectados con organismos morfológicamente consistentes con H. capsulatum. Las antiglobulinas H. capsulatum fluorescein-identificadas no absorbidas fueron empleadas en estos

dos estudios. Kaplan y Kraft también encontraron que el procedimiento FA resultaba muy útil para la demostración de *H. capsulatum* en secciones de parafina de tejidos fijados en formalina demostrando procesos activos de enfermedad. Nosotros reportamos que la digestión de secciones desparafinadas con 1% de tripsina durante una hora a 37°C antes de aplicar los conjugados realizaba considerablemente la coloración de *H. capsulatum* así como de otros hongos patogénicos. Además, encontramos que el procedimiento FA colorea el *H. capsulatum* así como otros hongos en secciones de tejido que habían sido previamente coloreado por las técnicas H & E, Brown y Brenn y Giemsa. No pudimos, sin embargo, colorear el *H. capsulatum* u otros hongos en secciones previamente coloreadas por los procedimientos Gomori metenamina-plata nitrato, PAS, o Gridley. En estos estudios, empleamos antígeno de *H. capsulatum* fluoresceína-identificados no absorbidos así como también conjugados que habían sido absorbidos con *C. albicans*.

Varios trabajadores han investigado la posibilidad de usar el procedimiento FA para demostrar anticuerpos *H. capsulatum* en suero. Kaufman, Chubert y Kaplan en un estudio usaron una modificación de la prueba de inhibición FA sencilla de Goldman. Para perfeccionar la exactitud de la prueba, usaron el conjugado específico desarrollado por Kaufman y Kaplan. Estos trabajadores examinaron 53 sueros procedentes de casos de histoplasmosis sospechosos o confirmados por la prueba de inhibición FA y compararon los resultados con los obtenidos con las pruebas de fijación-complementaria e inmunodifusión. Encontraron que la prueba de inhibición FA resultaba un procedimiento simple efectivo para la rápida detección de anticuerpos contra células de levadura entera de *H. capsulatum*. Sin embargo, no resultó efectiva para la detección de anticuerpos contra la histoplasmosis. En un estudio subsiguiente Kaufman, Brand y McLaughlin usaron la prueba de inhibición FA y la prueba agar gel precipitín para examinar cualitativamente 127 sueros anticomplementarios procedentes de humanos y perros clínicamente sospechosos de sufrir de histoplasmosis. Siempre que fue posible estos resultados se compararon con los obtenidos por la prueba CF en sueros no-anticomplementarios repetidos. Los resultados obtenidos con las pruebas de inhibición FA e inmunodifusión demostraron una correlación de un 97% con los obtenidos por la prueba CF. El uso concurrente de estas dos pruebas, por consiguiente,

puede brindar un diagnóstico serológico rápido cuando los sueros son anticomplementarios y no pueden probarse por el procedimiento CF.

Hook y Fife recientemente investigaron la posibilidad de usar antígenos solubles para detectar anticuerpos contra *H. capsulatum* por inmunofluorescencia. Se purificaron por medio de filtración gel los antígenos procedentes tanto de la levadura como de las formas miceliales de *H. capsulatum*, fijados en discos de papel, y se usaron en el procedimiento FA indirecto para detectar anticuerpos en sueros procedentes de pacientes con histoplasmosis. La evaluación de este procedimiento GA antígeno soluble indicó sensibilidad adecuada para la serodiagnos. Sin embargo, los sueros procedentes de casos culturalmente confirmados de blastomycosis, coccidioidomycosis, y criptococosis también reaccionaron con los antígenos solubles. Consecuencialmente, en términos de especificidad, la técnica no ofreció ninguna ventaja sobre las pruebas serológicas rutinarias para la histoplasmosis. Sin embargo, la vista de su rapidez y relativa simplicidad, Hook y Fife llegaron a la conclusión de que la técnica podía usarse ventajosamente como procedimiento de filtración para la serodiagnos de la histoplasmosis.

En la actualidad, no existen reactivos FA para la identificación específica de la forma micelial de *H. capsulatum*. La inmunofluorescencia no puede, por tanto, usarse con este fin.

Paracoccidioidomycosis

En la actualidad, el diagnóstico de la paracoccidioidomycosis por inmunofluorescencia está todavía en la etapa experimental. Sin embargo, el repaso de lo que se ha hecho hasta ahora sugiere que la FA podría convertirse en un instrumento útil en el diagnóstico de esta enfermedad.

Silvia y Kaplan fueron los primeros trabajadores que investigaron la posibilidad de aplicar la técnica FA en el diagnóstico de la paracoccidioidomycosis. Se prepararon conjugados con dos lotes de antisueros de conejos producidos contra la forma de levadura de dos cepas de *P. brasiliensis*. Ambos reactivos colorearon en forma brillante elementos de las formas levadura y micelial de 15 aislamientos de *P. brasiliensis*. Además, también presentaron reacción cruzada con las formas de tejidos de *H. capsulatum*, *B. dermatitidis*, *sporothrix schenckii*, y otros hongos heterólogos. La absorción dos veces de un lote de anticuerpos identificados con células de levadura de *S. schenckii* y una vez con cé-

lulas de la forma micelial de *C. immitis* produjeron este conjugado específico para la forma de tejido de *P. brasiliensis*. Una absorción del segundo conjugado con crecimiento micelial de *C. immitis* seguida de una sola absorción con células de levadura de *H. capsulatum* y una absorción con células de *Rhodotorula sp.* produjeron el específico para la forma de tejido del *P. brasiliensis*. En una evaluación limitada los dos reactivos específicos permitieron la detección e identificación del *P. brasiliensis* en esputos procedentes de tres casos culturalmente confirmados de paracocidioidomicosis pulmonar así como en exudados purulentos procedentes de un nódulo linfático infectado. Estos resultados preliminares sugieren que la inmunofluorescencia puede convertirse en un instrumento valioso para el diagnóstico rápido de la paracocidioidomicosis. Se necesitan otras evoluciones, sin embargo, antes de que la FA pueda usarse en forma rutinaria confiadamente para el diagnóstico exacto de esta enfermedad.

Silvia y Kaplan reportaron que sus conjugados específicos no reaccionaron con la forma micelial de *P. brasiliensis*. Aparentemente, la forma micelial no tiene el factor (es) específico (s) que se halla presente en la forma de levadura o posee el factor(es) a un nivel muy bajo para ser detectado. Otros estudios adicionales se requieren antes de que la FA pueda usarse para la identificación de la forma micelial de *P. brasiliensis*.

Es porotricosis

La técnica FA es un método excelente para el diagnóstico rápido de la esporotricosis. Se han desarrollado reactivos y métodos para la identificación específica de la forma de tejido de *sporotrix schenckii* y están siendo usados en varios centros micológicos.

El primer informe sobre la aplicación de la técnica FA para la esporotricosis es por Kunz. En 1959, identificó antiglobulinas *S. schenckii* de conejo con fluorescein isocianato y coloreó con éxito este hongo en cultivo, en secciones de tejido congeladas, y en frotis procedentes de animales infectados experimentalmente. Ninguna de las 18 especies heterólogas de hongos reaccionaron con los anticuerpos identificados.

En 1959, Kaplan e Ivens también realizaron estudios sobre la aplicación de la inmunofluorescencia para la identificación de *S. schenckii* en cultivo y en materiales clínicos. Preparamos conjugados con globulinas procedentes de conejos que habían sido inmunizados con cé-

lulas de *S. schenckii* en forma de levadura, destruidas con formalina. Estos reactivos colorearon tanto la forma levadura como la micelial de este hongo. Los conjugados diluidos de 1:4 a 1:12, dependiendo del lote probado, colorearon brillantemente el hongo en pruebas de rutina. Además, los reactivos diluidos no cruz-colorearon ninguna de las 47 cepas de 21 especies de hongos heterólogos, representando 12 diferentes géneros. Estos trabajadores también demostraron la presencia de células *S. schenckii* en frotis por impresión procedente de testículos de ratones infectados experimentalmente. Kaplan y González Ochoa evaluaron estas antiglobulinas específicas identificadas para el diagnóstico de la esporotricosis en el hombre. Nosotros examinamos por medio de la FA, frotis de exudados procedentes de lesiones procedentes de 34 pacientes sospechosos de padecer esporotricosis y comparamos los resultados con los obtenidos por cultivo. La técnica FA reveló células *S. schenckii* en frotis procedentes de 24 (89%) de 27 individuos culturalmente positivos. De siete individuos culturalmente negativos uno se halló positivo por la FA. Este paciente FA-positivo respondió favorablemente a la terapia con potasio yodado. Esta evaluación ha sido continuada y los resultados se encuentran sumariados en el Cuadro 1. En esta serie se probaron también esputos y tejidos fijos. Nuestra última evaluación de la prueba FA confirma los hallazgos previos favorables. Como se indica en el Cuadro 1, de 41 casos culturalmente positivos estudiados, 37 (90%) resultaron positivos por la FA; de 28 casos culturalmente negativos, 27 (96%) resultaron FA negativos.

Los conjugados que son específicos para los tejidos de *S. schenckii* también colorearon ^{la} forma micelial de este hongo. Sin embargo, será necesario evaluación adicional antes de que los reactivos sean de confianza para la identificación de la forma micelial.

Activomicosis

La inmunofluorescencia es un método excelente para la detección e identificación de los agentes etiológicos principales de la actinomicosis en el hombre. Los reactivos FA para la coloración específica de *Actinomyces naeslundii* y los dos serotipos reconocidos de *A. israelii* han sido desarrollados por Lambert, Brown y Georg. Estos conjugados pueden usarse efectivamente para detectar estos organismos ya sea en cultivo o en frotis de tejidos y exudados de lesiones. Gerenc-

set y Slack han preparado un conjugado para la coloración específica de *Arachnia (Actinomyces) propionica* tanto en cultivo como en materiales clínicos. El desarrollo de estos reactivos ha simplificado grandemente el diagnóstico de actinomicosis, ya que el aislamiento e identificación de los agentes etiológicos por medio de métodos convencionales se lleva mucho tiempo y es difícil.

COMENTARIOS .

Una revisión objetiva de lo que se ha logrado indica claramente que la inmunofluorescencia es un instrumento valioso y práctico, con una extensa aplicación el diagnóstico de las enfermedades micóticas. La técnica ha sido desarrollada hasta un nivel práctico para el diagnóstico de la mayoría de las micosis principales y actualmente se usa rutinariamente en algunos centros micológicos. Todos los que han empleado la inmunofluorescencia han quedado gratamente impresionados con su rapidez, simplicidad y versatilidad. No puede dejarse de lado, sin embargo, que el uso apropiado de la técnica FA requiere no menos habilidad, experiencia y criterio que cualquier otro procedimiento micológico, era necesario facilitar el adecuado entrenamiento a aquellos que tengan intención de utilizar la técnica con fines de diagnóstico.

SUMARIO

Se ha dado un repaso a las contribuciones más importantes en la aplicación de la técnica anticuerpo fluorescente (FA) para el diagnóstico de las enfermedades micóticas. Se ha alcanzado un gran progreso en el desarrollo y uso de los reactivos FA para la demostración de los hongos patogénicos tanto en cultivo como en materiales clínicos. Se han desarrollado reactivos específicos para las formas de tejido de *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, *Paracoccidioides brasiliensis* y *sporothrix schenckii*. También se han producido reactivos específicos para la detección e identificación de *Cryptococcus neoformans* así como de los agentes principales de actinomicosis en el hombre.

Habrà sin embargo que continuar los trabajos de desarrollo antes de que los reactivos ideales para la detección e identificación de la *Histoplasma capsulatum* en la forma de levadura estén a la disposición. Sin embargo, ya se pueden usar dos reactivos ventajosamente con fines de diagnóstico. Uno es el conjugado preparado por la absorción de

antiglobulinas *H. capsulatum* fluorescein-identificadas con células de levadura de *B. dermatitidis*, el cual permite la identificación específica de la mayoría de las cepas en forma de levadura de *H. capsulatum*. Sin embargo, no reacciona con aislados pertenecientes a un serotipo de este hongo. El segundo es un reactivo preparado por absorción de antiglobulinas *H. capsulatum* identificadas con células *Candida* el cual ofrece una cobertura para el diagnóstico más amplia, ya que reacciona con todas las cepas de *H. capsulatum* sin importar el serotipo. Sin embargo, este conjugado todavía cruz-colorea el *B. dermatitidis* y el *H. duboisii*. Desde un punto de vista diagnóstico, este sacrificio en la especificidad es de proporciones aceptables. Usualmente el *H. capsulatum* puede diferenciarse del *B. dermatitidis* en base a la morfología. De ser necesario, estos organismos pueden diferenciarse por medio de la FA usando el conjugado específico para la forma de tejido de *B. dermatitidis*. Cuando sea necesaria la diferenciación de *H. capsulatum* del *H. duboisii* tendrá que obtenerse por medio de los métodos micológicos convencionales.

Los reactivos FA especie-específicos para la identificación de las especies *Candida* todavía no han sido desarrollados. Los conjugados que se han producido son útiles únicamente para fines selectivos y para diferenciar algunas especies *Candida* de otras de este género y también de levaduras pertenecientes a otros géneros.

Se ha progresado también en el empleo de la inmunofluorescencia para demostrar anticuerpos contra algunos hongos patogénicos en sueros así como fluido espinal. El procedimiento FA indirecto ha resultado valioso en la detección de anticuerpos en sueros criptococales y de candida. La técnica FA de inhibición que emplea levadura de células *H. capsulatum* puede usarse para la rápida detección de anticuerpos contra todas las levaduras de células *H. capsulatum*. Sin embargo, la prueba no es efectiva para la detección de anticuerpos contra la histoplasmina. El procedimiento FA indirecto, empleando antígenos solubles de *H. capsulatum* en las formas micelial y de levadura, es útil para la demostración de anticuerpos contra este organismo en sueros. El procedimiento FA de inhibición también puede usarse para la detección de anticuerpos contra *C. immitis* en sueros así como en fluido espinal.

CUADRO 1

Comparación de anticuerpos fluorescentes (FA) y métodos de cultivo para la demostración de *Sporothrix schenckii* en materiales clínicos procedentes de casos sospechosos de esporotricosis.

Resultados de cultivos	Resultados anticuerpo Fluorescentes		Totales
	FA Positivos	FA Negativos	
Cultivo Positivos	37	4	41
Cultivo Negativos	1	27	28
Totales	38	31	69

MESA REDONDA DE MICOLOGIA

(Discusión)

Dr. RAMON ZAMORA (Barquisimeto).

Quisiera que la Dra. Marcano me dijera, por favor, ¿cómo es el ataque de *Microsporum canis* al pelo? También quisiera que el doctor Vargas me dijera, ¿cómo es la fluorescencia en pitiriasis versicolor?

Dra. MARCANO (Caracas).

Microsporum canis ataca el pelo de la manera que Sabouraud llamó ectothrix: mete hifas continuas, ramificadas, en el interior del tallo hacia la raíz, culminando en la franja de Adamson; de ellas parten ramas que rompen la cutícula y maduran como artrosporos y forman manguito espeso en el lugar de la vaina interna.

Dr. BORELLI (Caracas).

El Dr. Vargas no está: fue llamado y tuvo que salir urgentemente para Maracaibo. Con el permiso del doctor Zamora y en beneficio de los que aquí muestran interés por la fluorescencia de la pitiriasis versicolor, voy a resumir mi propia experiencia. Las lesiones de pitiriasis versicolor fluorescen usualmente de color dorado. Se encuentran raros casos cuyas lesiones no fluorescen y otros raros casos que fluorescen de color rojo ladrillo, exactamente como en el eritrasma. Fluorescencia indistinguible de la producida por pitiriasis versicolor o por el eritrasma puede observarse en casos de enfermedades no parasitarias, por ejemplo en las papilomatosis de Gougerot y Carteaud o en síndromes parecidos que se acompañan de alteración de la capa córnea. Para aumentar la intensidad y la pureza de la fluorescencia conviene que el paciente no se bañe ni se perfume o espolvoree la piel el día del examen. Propendo a creer que la fluorescencia en la pitiriasis versicolor es un fenómeno físico y no físico-químico, como en el eritrasma (porfirinas).

Dr. MARTIN CASTRO (Sao Paulo).

Quisiera subrayar la importancia en la práctica dermatológica diaria del uso de la fluoroscopia con la luz de Wood. Todos sabemos

cuánto es difícil curar la pitiriasis versicolor. Curarla es fácil, pero recidiva. Hay pacientes que tienen profusión de lesiones desde la cabeza hasta las rodillas, cubriendo casi todo el cuerpo. Ellos deben saber cuánto se extiende su erupción. Por eso es importante explorar con la fluoroscopia la extensión de las lesiones y enseñarlas al acompañante del enfermo. Es método auxiliar del tratamiento.

Yo quisiera hacerla a la Dra. Marcano una pregunta o más bien una sugerencia. Hace tiempo, yo tenía problemas en la enseñanza de la micología médica, cuando empecé a adquirir experiencia con un líquido para mantener preparaciones permanentes, particularmente de *Microsporum*, que es el mismo que se usa actualmente para clarificar y montar insectos en parasitología. Es muy útil para quienes tienen que enseñar preparaciones como las de tiña endothrix, que se conservan por 10, 15 y hasta 20 años muy buenas. He probado a mezclarlo con lactofenol; pero he acabado abandonando estos ensayos.

El diagnóstico de tiña negra es un asunto muy importante. Una vez, en mi país, un dermatólogo diagnosticó melanoma en un niño y se le mandó cortar la pierna al enfermo, cuando se trataba de tiña negra plantar. Son errores que ocurren por la gran rareza de esta afección y su aspecto. Una placa negra en mano o pie puede hacer pensar en melanoma, e inducir a cometer un error muy grave como ese.

Con respecto a la esporotricosis, quisiera pedir disculpa a la doctora Rodríguez por disentir un poco. En esporotricosis he trabajado mucho. El examen directo, a excepción de la inmunofluorescencia es poco menos que inútil. Nunca he encontrado *Sporotrichum schenckii* al examen directo. El cuerpo asteroide no es específico: hay en la blastomicosis queloidiana, hay en la sarcoidosis. Yo creo con absoluta seguridad que no se puede afirmar el diagnóstico de esporotricosis sobre la base del hallazgo del cuerpo asteroide en la histología.

Se ha mencionado el uso de la esporotriquina por la Dra. Alboznos para el diagnóstico de la esporotricosis. En Sao Paulo tenemos una experiencia de veinte años. Negativa, excluye la esporotricosis. Positiva, no indica directamente la existencia de la enfermedad. El valor práctico de la esporotriquina es más epidemiológico que clínico.

Con respecto a la cromomicosis, ayer hubo una conferencia muy importante del Dr. Zaías. El mostró la utilidad de esos puntitos negros para establecer el diagnóstico más sencillo, fácil y práctico para el

diagnóstico de la cromomicosis. En mi experiencia, también la biopsia es muy útil; pero con relativa frecuencia es difícil encontrar los cromomicetos en la biopsia.

Al Dr. Battistini una sugerencia. En el año 1961 un colega en Sao Paulo hizo inoculaciones en embrión de pollo de material de lobomicosis y consiguió mantenerlo por varios pasajes sucesivos. Es un método de trabajo usado por los virólogos y poco por los micólogos. Generalmente los micólogos no saben manejar el huevo embrionado, pero, teniendo al lado al virólogo, se aprende con mucha facilidad y, para quienes desean trabajar con lobomicosis, vale la pena dominarlo.

Respecto a la histoplasmina, creo que debo tocar un punto que merece comentario. Recuerdo el caso de una monja, que debe conocer también el Dr. Belfort. Esa monja, que era médica, hizo un cuadro sospechoso de ser histoplasmosis. Se le puso histoplasmina y salió negativa. Parece ser que tal cuadro era banal. A los 2 ó 3 años la monja hizo otro cuadro respiratorio que sí era de histoplasmosis y esta vez la parte inyectada con histoplasmina reaccionó espontáneamente. La observación ha sido comunicada.

Estoy de acuerdo con el Dr. Belfort, cuando él habla del uso y el abuso de los cistostáticos. Respecto al diagnóstico de la criptococosis por el examen del líquido cefalorraquídeo, considero importante divulgar entre los bioanalistas los criterios que permiten diferenciar el *Cryptococcus* de otras células eventualmente presentes en el líquido.

Merece comentario lo que acaba de decirnos la Dra. Albornoz respecto a los centros regionales. No se pueden tener muchos laboratorios que requieren personal altamente especializado. Hace falta laboratorios internacionales. Que sea en Caracas, en La Paz o en Puerto Príncipe poco importa; importante es que los haya. Nosotros nos encontramos solos; no sabemos con quién hablar; a veces hablamos solos.

Últimamente se ha prestado atención a la paracoccidioidosis familiar. Se logró reunir 14 parejas de casos familiares: padres e hijos o hermanos con paracoccidioidomicosis. Se ha venido así valorizando un factor genético como predisponente más importante a la enfermedad.

Dr. R. DIAZ. (Santo Domingo)

Yo quisiera saber si en la esporotricosis linfagítica para un patólogo es posible dar diagnóstico sin los otros métodos de investigación.

MODERADOR

¿Alguien que se ocupe de anatomía patológica puede contestar esta pregunta?

Dr. MARTINS CASTRO. (Sao Paulo)

Yo puedo contestar esta pregunta, como dermatólogo clínico, que si recibo del patólogo el diagnóstico de esporotricosis no lo creo.

Dr. BORELLI. (Caracas)

Yo quisiera comentar algunos puntos (muy pocos). Empezando por lo de los cuerpos asteroides.

La reacción del tejido en la esporotricosis no es específica, pero cuando se halla el cuerpo asteroide uno alcanzó el diagnóstico. Nosotros creemos que el cuerpo asteroide se produce siempre, en cualquier caso de esporotricosis. Con la histología es difícil encontrarlos porque la histología es un método inadecuado, porque diluye el material cortando la muestra en secciones finísimas. La micología utiliza un método mucho más productivo, porque selecciona material abundante y lo ve a pequeño aumento. El material más apropiado son los abscesos miliares. Volviendo a la histología, recuerdo un trabajo japonés en el cual se informaba que sobre 15 casos de esporotricosis, en 14 aquellos esforzados trabajadores encontraron cuerpos asteroides. En nuestro medio no podemos emplear tanta mano de obra. De manera que la conducta nuestra es la siguiente: cuando la clínica nos orienta hacia el diagnóstico de esporotricosis, buscamos el cuerpo asteroide. Lo buscamos en los abscesos miliares, o sea en el pus naciente. Los abscesos miliares no se encuentran tanto en los nódulos linfangíticos, sino más bien en los alrededores de la lesión inicial, en forma de pápulo-pústulas. Tomamos una gota o la fracción de una gota de pus, la ponemos entre lámina y laminilla con un poco de agua y allí buscamos y hallamos uno o varios cuerpos asteroides. El diagnóstico se hace difícil cuando uno no está orientado hacia la posibilidad de una esporotricosis o cuando no hallamos pus o cuando el paciente, por ejemplo, es un niño chiquito en brazos de la madre:

el médico viene, incinde, saca una gota de pus y la madre asustada desaparece con el niño. Puede que en esa gota de pus no haya cuerpos asteroides; pero cuando se tiene facilidades para buscar cuerpos asteroides, se puede esperar encontrarlos con la técnica correcta y hacer el diagnóstico en pocos minutos en el 90% de los casos. Naturalmente hay que buscar con fe y con técnica.

Respecto a la especificidad del cuerpo asteroide, yo creo que tenemos que aclarar los conceptos. El Dr. Martins se ha referido a cuerpos asteroides que se encuentran en vacuolas de células gigantes, en seno de granulomas, por ejemplo en el granuloma de la lobomycosis o en el granuloma de la sarcoidosis o de la lepra; pero aquéllas son estructuras radiadas, un poco irregulares, sin cuerpo. El término "cuerpo asteroide" ha sido usado en este caso impropriamente, porque el mismo había sido ya consagrado por Luz y Splendore para designar una forma especial, patognomónica, de *Sporotrichum schenckii* en el tejido. Evidentemente los histopatólogos que inauguraron esa acepción de "cuerpo asteroide" ignoraban estos antecedentes. Tal vez tales cuerpos intracelulares mejor serían llamados "cuerpos aracnoides".

El cuerpo asteroide de *Sporotrichum* tiene en su centro una gran levadura casi siempre brotante; levadura brotante, de doble contorno, que puede tener concreciones más o menos radiadas alrededor suyo.

De todas maneras el cuerpo asteroide de la esporotricosis es un ejemplo de actinofitosis, como se encuentra en muchísimas otras parasitosis, en donde sobre el cuerpo del parásito necrobiótico se depositan sustancias, casi siempre comprendiendo fosfato y carbonato de calcio, que frecuentemente se prolongan en radios, hasta llegar a parecerse a un erizo.

Con respecto a la paracoccidioidosis familiar, ni la doctora Albornoz ni yo (no sé si el Dr. Belfort), hemos visto en Venezuela ningún caso con dos o más pacientes en una familia.

Dr. BELFORT. (Caracas)

Yo he visto un caso de doble infección en una sola familia, hace como tres años. Tal vez la Dra. Albornoz ha conocido esto. Nosotros diagnosticamos paracoccidioidosis oral y pulmonar en un paciente residente de Paracotos, pueblo a 30 kms. de Caracas. Le indicamos sulfas y lo citamos para 2 meses después. Volvió él y nos dijo

que el hermano, residente también de Paracotos, presentaba las mismas lesiones bucales. Le sugerimos de traer al hermano y efectivamente lo trajo 2 meses más tarde; pero ambos habían estado tomando sulfas y presentaban cicatrices orales muy parecidas. Nuestro diagnóstico en el segundo caso se basa entonces sobre la similitud de las lesiones, la igualdad de las cicatrices y la respuesta favorable a la administración de sulfas.

Dr. R. MARTINS CASTRO. (Brasil)

Yo sigo creyendo que, a los fines del diagnóstico práctico, la búsqueda del cuerpo asteroide no es útil. Mario Moraes en Amazonas describe la presencia de levaduras en cortes histológicos de 4 sobre 5 casos de esporotricosis estudiados en Manaus. Yo creo que lo mismo que se encontró en Amazonas debería poderse encontrar en otra parte.

EPILOGO

MODERADOR

Hemos trabajado cuatro horas y media y veo que muchos de los presentes lamentamos no poder prolongar la discusión para debatir los numerosos puntos que -a Dios gracias- se prestan a discrepar o requieren precisión, dentro del programa expuesto.

Cuando veía llenarse la sala más y más, crecía en mí amarga la sospecha de que el público se agolpara para lapidarnos; pero ahora, al ver tantas caras risueñas y amigas, me doy cuenta de que hemos tenido éxito. El mérito debe compartirse entre los expositores, que han hablado claro y compacto, y los asistentes, que nos han honrado con su interés y persistencia.

A este punto resulta justo dar las gracias a los organizadores del Congreso, por haber ideado y apoyado, por primera vez en la historia de nuestras reuniones, la realización de una sesión enteramente dedicada a micosis. Confío en que esta experiencia nos ayudará a producir en el futuro mejores eventos sobre tema tan apasionante.