



Capítulo 2 - Generalidades

Dr. Patricio Godoy

Profesor Asociado, Universidad Austral de Chile Valdivia, Chile

Los hongos son organismos eucariotas que poseen núcleos organizados. En su citoplasma encontramos mitocondrias, vacuolas, vesículas, retículo endoplasmático, microtúbulos, ribosomas, cristales de glicógeno y complejo de Golgi. Son heterótrofos: esto quiere decir que no pueden sintetizar sus propios nutrientes, además presentan un conjunto de características propias que permiten su diferenciación con las plantas, por ejemplo, no sintetizan clorofila, no tienen celulosa en la composición de su pared celular excepto algunos hongos acuáticos sin importancia clínica (*Oomycota*), no almacenan almidón como sustancia de reserva y no tienen organización de células como tejidos o sistemas.^{1,2}

Los hongos son los organismos de mayor distribución en la naturaleza, los podemos encontrar en el suelo, agua, aire, sobre la superficie de objetos inanimados, en el ambiente cerrado de casas, hospitales, edificios e, incluso, colonizando animales y al propio ser humano. Son considerados los principales degradadores de materia orgánica de nuestro planeta y poseen gran capacidad de adaptación, por lo que sobreviven y se reproducen en diferentes sustratos, temperaturas y condiciones atmosféricas.^{3,4}

Taxonomía

Hasta el año 1980, la taxonomía de los hongos se basaba principalmente en sus características de colonia en medios de cultivo adecuados, y en la conidiogénesis observada bajo microscopía de luz. Hoy en día, la taxonomía se basa en los criterios clásicos antes mencionados más el análisis de su ultraestructura, caracterización fisiológica y la secuenciación de genes como los de la B tubulina, la calmodulina y la actina entre otros. Hibbet, junto a otros autores, presentan una de las clasificaciones taxonómicas actualmente utilizadas por los investigadores clasifican a los hongos en un Reino Fungi, con un subreino *Dicarya* (donde se encuentran las divisiones *Ascomycota* y *Basidiomycota*) y siete divisiones (*phyla*); de donde derivan 35 clases, 12 subclases y 129 órdenes. Es-



tos autores eliminan la clásica división *Zygomycota*, ahora comprendida dentro del *phylum Glomeromycota*, quedando en el *subphylum Mucoromycotina* los principales agentes de la mucormicosis y en el *subphylum Entomophthoromycotina* los agentes de entomofotoromicosis.^{2,5}

Tabla 1: Clasificación del Reino Fungi⁵

Reino	<i>Fungi</i>
	<i>Chytridiomycota</i>
	<i>Callimastigomycota</i>
Phylum (División)	<i>Blastocladiomycota</i>
	Microsporidia
	<i>Glomeromycota</i> (agentes de Mucormicosis)
Subreino	<i>Dicarya</i>
Phylum (División)	<i>Ascomycota</i>
	<i>Basidiomycota</i>

Nutrición

Los hongos son los únicos microorganismos no procariotas que se nutren por digestión extracelular y posterior absorción y presentan grandes diferencias con las bacterias en tamaño, estructura celular y composición química. Con relación a la nutrición, son considerados quimio-heterotróficos, pues solamente consiguen absorber pequeñas partículas solubles como monosacáridos, aminoácidos o péptidos compuestos por un máximo de tres aminoácidos. El proceso de absorción de los nutrientes depende exclusivamente de la producción de exoenzimas que degradan los substratos, constituyendo partículas diminutas en solución acuosa que son posteriormente internadas a través de transporte activo y pasivo, siendo esta característica lo que diferencia a los hongos de otros eucariontes.^{1,6,7}



La producción del tipo de enzima dependerá del tipo de hongo y el sustrato, por ejemplo: los dermatofitos principalmente producen queratinasas, que degradan la queratina de la piel, pelos y uñas, otros hongos producirán hialuronidasas para degradar ácido hialurónico, colagenasas para degradar colágeno y elastasas para degradar elastina entre otras. Las enzimas secretadas dependerán del sustrato que será asimilado.⁷

En general, los hongos tienen un metabolismo primario donde ocurren las reacciones catabólicas y anabólicas necesarias para el mantenimiento y crecimiento de las células: al degradar la materia orgánica, esta es transformada a través de la respiración aerobia en CO_2 , H_2O , energía en forma de ATP (38 ATP por mol de glucosa) y nuevas células. Ciertos hongos levaduriformes, además de realizar la respiración aerobia, realizan un proceso de fermentación cuyos productos finales son CO_2 , etanol, energía (2 ATP por mol de glucosa) y células, por este motivo, muchos hongos son utilizados en la industria de alimentos y bebidas alcohólicas.⁶

Durante el metabolismo secundario, los hongos utilizan rutas metabólicas alternativas de sustancias no vitales para la célula: estos metabolitos pueden ser clasificados como micotoxinas (aflatoxinas, ocratoxinas, fumonisinas), antibióticos (penicilina, cefalosporinas), antifúngicos (griseofulvina, equinocandinas). Otros metabolitos (ciclosporinas, lovastatina) que confieren al hongo una ventaja adaptativa importante.⁷⁻⁹

Pared y membrana celular

La pared celular fúngica está compuesta principalmente por quitina y beta glucanas en una proporción que en la pared de estos compuestos es variable y depende de la posición sistemática de los hongos. Los componentes principales de la pared celular fúngica son hexosas y hexoaminas, que forman las mananas, glucanas y galactomananas (galactomanana, compuesto que se utiliza para el diagnóstico de la aspergilosis invasora). Algunos hongos tienen una pared rica en quitina (N-acetil glicosamina), otros poseen complejos polisacáridos y proteínas, con predominancia de cisteína. Estos compuestos otorgan rigidez a la estructura del hongo.^{1,10}

La membrana celular posee principalmente ergosterol (lípidos muy parecido



al colesterol de la célula humana), un esteroles que poseen todos los hongos excepto especies del género *Pneumocystis*. Este esteroles puede ser utilizado para la identificación y cuantificación de géneros fúngicos y sirve de sitio diana para los antifúngicos del grupo de los azoles, alilaminas y polienos que presentan actividad fungistática o fungicida.^{2,4}

Tipos de micelio

El cuerpo vegetativo de los hongos es denominado talo. Dependiendo del talo, el hongo puede ser unicelular (levadura) o micelial (filamentoso). La función del talo vegetativo es absorber nutrientes. Es el tipo de talo que observamos frecuentemente en las muestras clínicas al realizar un examen microscópico directo de un paciente con una infección fúngica: el micelio reproductivo que es el encargado de la reproducción de los hongos se observa en el laboratorio utilizando medios de cultivos específicos y principalmente en la naturaleza, raramente se observa en el material clínico obtenido de los pacientes. Esto se debe a la respuesta inmune del paciente, al tipo de patología y al agente fúngico involucrado. El micelio reproductivo se puede observar en cuadros clínicos producidos por agentes levaduriformes (*Candida*) y en casos de hongos filamentosos como *Scedosporium*, *Fusarium*, *Aspergillus*, etc. La morfología fúngica no es fija ya que existen algunos hongos dimórficos que pueden cambiar la conformación de su pared de micelio filamentoso a levaduriforme, o viceversa, dependiendo de las condiciones de temperatura principalmente.^{1,11,12} Un amplio grupo de hongos producen el talo micelial que está conformado por hifas, que son estructuras filamentosas tubulares semejantes a un cabello. Estas presentan pared celular y membrana celular en cuyo interior encontramos núcleos, material citoplasmático, organelos, y cuyo crecimiento siempre es de tipo apical. Las hifas pueden ser tabicadas, esto significa que se observa cada cierto espacio un tabique o septo. Las hifas tabicadas que se observan en hongos más evolucionados ayudan a evitar la desecación y aportan a la diferenciación.^{1,6}

Otros hongos se presentan como células únicas que se multiplican por gemación por células similares que se depositan sobre la superficie. Esta composición se denomina de blastoconidio, el brote puede permanecer unido



a la célula madre y producir una cadena de células, esta estructura se denomina de pseudohifa. El conjunto de pseudohifas se conoce como pseudomicelio, estas estructuras pueden ser observadas en el examen microscópico directo de pacientes con infecciones producidas por levaduras.¹⁰

Cuando el laboratorio informa mediante un examen microscópico directo (KOH 20%-40%), la presencia de hifas tabicadas hialinas, el clínico debe interpretar este hallazgo como una hialohifomicosis (hongo que no presenta melanina). Si el laboratorio informa la presencia de hifas tabicadas dematiáceas, hongo melanizado, entonces se trata de una feohifomicosis. También puede observarse una estructura diferente a las anteriores: conocidas como talo muriforme, cuerpos escleróticos o fumagoides, células de Medlar, que es una estructura de coloración negra de pared gruesa con septos transversales y horizontales, producto de la respuesta inmune y la presión tisular, en cuyo caso el clínico debe interpretar el informe como una micosis subcutánea denominada de cromoblastomicosis. La presencia de hifas cenocíticas o no tabicadas en un examen directo indica un cuadro clínico de mucormicosis.

Reproducción

Los hongos se reproducen sexualmente (hongos perfectos o teleomorfos) y asexualmente (hongos imperfectos o anamorfos). El producto final de su producción se conoce como esporas, también llamadas conidios o propágulos. Los laboratoristas y clínicos deben prestar especial atención en el tipo de reproducción de los hongos, que es lo que permite clasificarlos taxonómicamente, según la reproducción ya sea esta sexuada o asexuada, el laboratorio siempre deberá informar al clínico el nombre del hongo que más se utiliza, generalmente corresponde a la forma asexuada como se destaca en los siguientes ejemplos: *Pseudoallescheria apiosperma* corresponde a la forma sexuada de *Scedosporium apiosperma*; *Filobasidiella neoformans* corresponde a la forma sexuada de *Cryptococcus neoformans*; las formas sexuadas de *Aspergillus* corresponden a *Emericella*, *Neosartorya*, *Fennellia* y *Eurotium*.¹³⁻¹⁵ En micología clínica, en un 95% de casos el laboratorio informará de la fase asexuada del hongo, ya que la fase sexuada es difícil de observar, esta última depende de muchos factores, entre ellos, y el más importante debe ocurrir la



fusión de dos talos de polaridad diferente. Si, con los métodos clásicos que son la base de la identificación de los agentes etiológicos no se observan estructuras de reproducción, el laboratorio deberá recurrir a las técnicas de proteómica o técnicas moleculares para la identificación.¹⁶

Diagnóstico de Laboratorio

El diagnóstico en el laboratorio dependerá principalmente de una adecuada toma de muestra (el material biológico debe ser suficiente como para aplicar diferentes técnicas). Es indispensable que el clínico indique la sospecha clínica y proporcione al laboratorio la suficiente información, que permitirá a este anticipar la metodología por utilizar, identificar el agente etiológico y seguir los protocolos de bioseguridad. Los clínicos deben especificar el tipo de muestra, la enfermedad de base, el tratamiento, los viajes recientes del paciente, la residencia, la ocupación del paciente, entre otras informaciones.

1. Toma de muestra

Micosis superficiales

Muestra de piel

En las lesiones sugerentes de dermatofitosis, se debe raspar los bordes eritematosos de la lesión, ya que este es el sitio activo de la infección con bisturí o cureta estéril previa asepsia de la piel con alcohol 70% para reducir la microbiota bacteriana, en una cantidad suficiente para realizar un examen microscópico directo y cultivo, condicionando el material en portaobjetos de vidrio o placas de Petri estériles debidamente identificadas para su envío al laboratorio. En las lesiones sugerentes de Pitiriasis, las máculas hipocrómicas o hiperocrómicas se deben raspar con bisturí o cureta estériles, se recomienda realizar un masaje suave antes de la toma de muestra para estimular los queratinocitos y así se pueda obtener una mayor cantidad de escamas, estas deben ser acondicionadas en portaobjetos de vidrio o placas de Petri estériles debidamente identificadas para su envío al laboratorio.



Muestra de uña

La colecta de la muestra dependerá del tipo de lesión; en la onicomicosis superficial blanca o leuconiquia, se raspan las áreas blanquecinas de la superficie de la lámina ungueal con ayuda de bisturí estéril o cureta apropiada para esta función; en las lesiones tipo subungueal distal se deben eliminar las primeras escamas de la porción distal pues pueden contener hongos contaminantes, luego se debe raspar profundamente el área afectada desde la porción distal hasta la proximal para obtener una buena cantidad de escamas para realizar el examen microscópico directo y cultivo. En la onicomicosis subungueal proximal con paroniquia se debe raspar el borde periungueal de la uña con ayuda de bisturí estéril o cureta, todas las escamas obtenidas deben ser depositadas en portaobjetos de vidrio o placas de Petri correctamente identificadas para ser enviadas al laboratorio.

Muestras de cabello y pelos

En los casos de cabellos o pelos presentando nódulos micóticos blancos o negros (piedras) que son visibles a simple vista, estos deben ser cortados en la porción suprafolicular en un número entre 10 a 12 utilizando una tijera. En las tiñas del cuero cabelludo y barba, los pelos tonsurados (cortados a 2 mm) que se encuentran en los bordes de las placas de alopecia deben ser arrancados con pinza depilatoria en un número entre 10 a 14. Los cabellos y pelos deben ser acondicionados entre portaobjetos de vidrio o en placas de Petri y deben ser identificados y transportados al laboratorio.

Mucosa de cavidad oral

El raspado de la superficie epitelial comprometida debe realizarse empleando un hisopo (tórula) embebido en solución salina o un bisturí rombo romboide esterilizado. Las lesiones sospechosas de micosis endémicas deben ser investigadas mediante un raspado más profundo obtenido con bisturí.

La muestra puede obtenerse también mediante un lavado de la cavidad oral. El material se obtendrá después de un enjuague con 25 ml de solución salina a 0,9% por 30 segundos. El material del enjuague deberá depositarse en un frasco de plástico estéril. El material deberá ser transportado a temperatura ambiente hasta 30 minutos de recolectada la muestra.^{17,18}



Mucosa genital femenina

Para obtener una muestra de mucosa genital femenina, se debe suspender toda medicación antibiótica y/o antifúngica (local u oral) 10 días antes de la toma de la muestra. La paciente no debe tener relaciones sexuales por lo menos 3 días antes de la extracción de la muestra. La higiene debe ser realizada 48 horas antes de la toma de la muestra, sin ducha vaginal. El médico debe utilizar un espéculo desechable para tomar la secreción de la mucosa del saco vaginal posterior, con ayuda de un hisopo (tórula). Las muestras deben ser enviadas de inmediato al laboratorio, en solución salina estéril para evitar la desecación.^{11,17,18}

Mucosa genital masculina

La muestra del área afectada del glande o prepucio debe ser colectada con un hisopo (tórula) humedecido. Las muestras deben ser enviadas de inmediato al laboratorio, en solución salina estéril.

Micosis subcutáneas

Lesiones supurativas

En el caso de abscesos cerrados, la obtención del material purulento se hace por punción con jeringa estéril o por drenaje, después de una previa asepsia del local acometido. Cuando el absceso drena espontáneamente, el material purulento debe ser colectado con hisopo (tórula), las muestras deben ser enviadas de inmediato al laboratorio en solución salina estéril.

Lesiones de cromoblastomycosis

En la superficie cutánea lesionada generalmente se observan puntos negros debido a la liberación transepitelial del hongo. Las escamas y costras en estos puntos negros se obtienen con ayuda de un bisturí estéril o de una aguja hipodérmica. Se recomienda la realización de dos biopsias: una para el cultivo corriente del laboratorio de micología, que debe ser transportada en suero fisiológico; otra para el servicio de histopatología, que debe ir en formalina al 10%.¹⁹



Lesiones de lacaziosis

La muestra comprende básicamente una biopsia en las mismas condiciones que las de la muestra para cromoblastomycosis, adicionalmente, se pueden coleccionar secreciones de las lesiones ulceradas con bisturí rombo.¹⁹

Micetomas

Para determinar el agente etiológico de los micetomas (puede ser de origen bacteriano actinomicetomas o fúngico eumicetomas) debemos obtener los granos que exudan por las fistulas de manera espontánea si no es el caso debemos depositar una gaza por 12 horas sobre las fistulas para después de este periodo observar los granos que fueron expulsos durante la noche, estos granos pueden ser de color blanco, amarillo, negros o rojos lo que nos ayuda en el diagnóstico. Los granos también pueden ser obtenidos mediante aspiración con aguja fina o biopsia quirúrgica, aunque el examen microscópico de los granos es útil para detectar el microorganismo, es importante identificar los agentes mediante el cultivo en medios adecuados, las biopsias también son útiles en el diagnóstico del micetoma.

13

Muestras de micosis sistémicas

Nariz y senos nasales

La toma de muestra para la búsqueda de los agentes de rinosinusitis puede ser realizada a partir de las siguientes técnicas: hisopo (tórula) en la mucosa nasal o nasofaringe, y tubo con suero fisiológico para evitar la desecación; endoscopia nasal (con endoscopio rígido o flexible) con aspirado; lavado de la secreción nasal (principalmente del meato medio); punción directa (por trocánter) con aspiración de secreción y/o biopsia de la mucosa del seno maxilar, las biopsias son el patrón oro para el diagnóstico. Las muestras deben ser enviadas inmediatamente al laboratorio sin refrigerar.^{17,18}

Secreciones respiratorias y lavado broncoalveolar

Las muestras de esputo se obtienen después de la inhalación o por



expectoración espontánea, el aspirado traqueal se aplica mayormente a pacientes con ventilación mecánica. El lavado broncoalveolar se obtiene mediante la infusión y aspirado de solución fisiológica en pacientes sometidos a broncoscopia, el volumen que debe ser enviado al laboratorio es de 15 ml mínimo, en tubo seco. Su envío al laboratorio debe ser inmediato, el procesamiento debe realizarse antes de 1 hora.^{17,18}

Biopsia pulmonar

Se realiza mediante punción directa de la lesión, biopsia trans-bronquica o toracotomía. Se envían dos muestras: una, en suero fisiológico para el cultivo corriente del laboratorio de micología; otra, en formalina al 10%, para el Servicio de Histopatología. El laboratorista que trabaje la biopsia debe saber que no puede macerarse, para evitar la destrucción de las estructuras fúngicas.

Espujo

Antes de recoger la expectoración profunda, que debe ser a primera hora de la mañana, el paciente si usa prótesis dental debe removerla y realizar un enjuague con agua hervida y enfriada, se debe tomar por lo menos 2 muestras que no deben contener saliva. El material debe ser recolectado en frasco estéril de boca ancha y enviado al laboratorio lo más rápido posible. El cultivo de espujo puede llegar a ser más o menos específico para el diagnóstico infeccioso, por lo que, según la sospecha del tipo de infección fúngica, su resultado debe ser interpretado con cautela, dada la existencia de hongos que hacen parte de nuestra microbiota.^{11,17,18}

Médula ósea

El procedimiento médico de toma de muestra de médula ósea requiere de una rigurosa asepsia. La toma de la muestra debe obtener un volumen de 2 a 3 ml utilizando una jeringa heparinizada (heparina puede interferir con las técnicas biología molecular), y debe ser transportada inmediatamente al laboratorio, donde deberá ser sembrada directamente en medios de cultivo adecuados. Se recomienda tomar los aspirados de médula ósea en frascos de hemocultivo pediátricos de sistemas automatizados, que contienen una proporción de muestra/caldo, ideal.¹⁸



Líquido cefalorraquídeo (LCR)

El procedimiento médico de toma de muestra de líquido cefalorraquídeo requiere de una rigurosa asepsia, el volumen mínimo necesario para la tinción negativa y el cultivo es de 0,5 ml. La muestra debe ser acondicionada en tubo seco y enviada al laboratorio lo más rápido posible, sin refrigerar.

Sangre

La sangre debe ser colectada, de preferencia antes de la administración de antibióticos y en condiciones de asepsia. El volumen de sangre inoculada en los frascos de hemocultivos debe respetar las orientaciones proporcionadas por el fabricante de los frascos. A continuación, los diferentes volúmenes requeridos para frascos del sistema BACTEC:

- Bactec Plus Aerobic/F: 8-10 ml (frasco adulto)
- Bactec Ped Plus/F: 1-3 ml (frasco pediátrico)
- Bactec Myco/F-Lytic: 1-5 ml

Debe identificarse cada frasco con toda la información y enviar al laboratorio junto con la solicitud médica debidamente escrita, en un tiempo máximo y crítico de hasta 30 minutos después de la recolección, sin refrigerar.

Algunas observaciones son importantes en la recuperación de patógenos de sangre: en adultos, cuanto mayor es el volumen de sangre procesado mejor es la recuperación de los microorganismos; la realización de colectas seriadas (más de una vez) aumentan la posibilidad de aislamiento de patógenos, sobre todo cuando la fungemia/bacteremia ocurre de forma intermitente o transitoria; se recomienda un total de al menos 2 a 3 colectas en 24 horas por episodio de sepsis, siendo que cada colecta debe contener al menos 20 a 30 ml de sangre en pacientes adultos; en pacientes graves, diferentes colectas pueden ser realizadas en intervalos de minutos, más deben ser colectadas de diferentes partes del cuerpo.¹⁷

Criterios de rechazo de muestras por parte del laboratorio

Se rechazará una muestra cuando se presente alguna de las siguientes situaciones: discrepancias entre el pedido médico y la identificación de la muestra; origen de la muestra o tipo de la muestra no identificadas; muestras enviadas en frascos o medios de transporte inadecuados para el examen solicitado; muestras colectadas y enviadas tardíamente al laboratorio (después de 24



horas); biopsias enviadas en formalina al 10% para examen directo y cultivo.¹⁸

2. Examen microscópico directo

Este examen es de bajo costo y de rápida ejecución. Puede ser aplicado a cualquier material biológico bajo sospecha de infección fúngica, se realiza utilizando hidróxido de potasio (KOH) al 10% o al 20%, se puede adicionar tinta azul o negra permanente para un mejor contraste (tinta lavable no sirve porque se oxida con el KOH). En el caso de las micosis superficiales en que se analizan las escamas de piel, uñas y pelos, la clarificación demora un mínimo de 12 horas, por este motivo, el clínico debe solicitar el resultado a las 24 horas. Este examen es menos sensible que el cultivo.

El examen microscópico directo puede favorecer la identificación parcial y, en algunos casos, la identificación definitiva, si observamos los siguientes elementos fúngicos: filamentos cortos y levaduras del género *Malassezia* diagnóstico de Pitiriasis versicolor; nódulo blanco adherido al pelo en cuyo interior se observan levaduras y artroconidios diagnóstico de Piedra blanca; nódulo negro adherido al pelo en cuyo interior se observan los lóculos ascígeros con ascos y ascoporas fusiformes es diagnóstico de Piedra negra; talo muriforme o células de Medlar es diagnóstico de Cromoblastomycosis; levaduras multibrotantes en una muestra de mucosa, tejido o lavado broncoalveolar es diagnóstico de Paracoccidioidomycosis; esférulas con endosporas en tejido o lavadobroncoalveolar es diagnóstico de coccidiomycosis; o levaduras con brotes de base ancha en las mismas muestras es diagnóstico de Blastomycosis; cuando realizamos una tinción negativa (tinta china o nigrosina), para una muestra de líquido cefalorraquídeo donde observamos levaduras capsuladas con un halo transparente en un fondo oscuro esto es diagnóstico de criptococosis.^{12,13,19}

En otras situaciones, la identificación mediante el examen microscópico directo es la única herramienta disponible para el diagnóstico, visto que algunos hongos no son cultivables, como era el caso del cuadro clínico denominado Lacaziosis cuyo agente etiológico es *Lacazia loboi* donde se observan levaduras todas del mismo tamaño unidas por una estructura similar a un puente, en un estudio reciente se comprobó que este agente puede ser cultivado en el medio



RPMI pero demora entre 30 a 40 días para desarrollarse; en la Pneumocistosis observamos estructuras muy parecidas a quistes, el agente etiológico *Pneumocystis jirovecii* no se ha conseguido cultivar aún.^{12,13,19}

Otra herramienta muy útil para realizar el examen microscópico directo es la tinción con blanco de calcoflúor, un compuesto químico que sirve para teñir la pared celular de los hongos, la única dificultad de la técnica es que el laboratorista debe realizar la observación en un microscopio de fluorescencia. Las tinciones de Gram y Giemsa son utilizadas para muestras de secreciones (vaginales), líquidos (sangre, lavado bronquio alveolar) y escamas (córnea) en los cuales podemos observar levaduras, pseudohifas y talo filamentoso de color azul o lila (los hongos adquieren una tonalidad violeta). La Tinción de Wright es una tinción hematológica que se utiliza en micología para el diagnóstico de la histoplasmosis principalmente, en que las levaduras se tiñen tenuemente con un halo transparente.¹⁰

Un examen directo negativo nunca descarta una infección fúngica, la sensibilidad de la técnica depende de la concentración de los elementos fúngicos por ml, del lugar anatómico, tipo de paciente, cantidad de muestra, tinción y experiencia del observador.

3. Técnicas histológicas

El examen histopatológico tiene por objetivo evaluar dos aspectos principales: primero, determinar la respuesta inflamatoria desarrollada en el proceso infeccioso y segundo caracterizar desde el punto de vista morfológico los elementos fúngicos presentes en el tejido. El examen anatomopatológico permite identificar el agente causal por sus características morfológicas y también se puede evaluar la respuesta inflamatoria.¹⁷

Tinciones utilizadas en micología

Para el análisis de las micosis se utilizan las siguientes tinciones: Hematoxilina - Eosina (H-E), utilizada principalmente para observar la respuesta inflamatoria al agente fúngico; PAS (Ácido Peryódico de Schiff), que oxida los 1,2-glicoles, formándose grupos aldehído que, con el reactivo de Schiff, reaccionan tiñendo el citoplasma de los hongos de un color rojo luminoso; la tinción



de Gomori-Grocott, que es una variación de la tinción argéntica, impregna las estructuras fúngicas con plata y estas se observan de una coloración café oscura, el tejido se tiñe de color verde cuando se utiliza el colorante verde malaquita o azul cuando se utiliza el azul de metileno como contraste. Otras tinciones complementarias pueden también ser utilizadas, como Fontana-Masson, para el estudio del pigmento melanina importante para identificar los agentes de feohifomicosis. La tinción de Mucicarmin de Mayer se utiliza para la identificación de *Cryptococcus spp.* y de otros hongos como *Rhodotorula* que en su pared o cápsula poseen glicoproteínas, presentando una tonalidad rosa oscura. La técnica de Inmunofluorescencia para *Pneumocystis jirovecii* utiliza anticuerpos monoclonales específicos contra determinantes antigénicos de la pared de los quistes y trofozoitos; tiene una sensibilidad cercana al 100% y una especificidad de 96%.²⁰

4. Cultivos

El aislamiento de los hongos en cultivo permite la identificación de los principales agentes de infecciones fúngicas. La gran mayoría de los hongos no requiere de medios ricos en nutrientes, en general, ellos presentan sus estructuras de reproducción necesarias para su identificación en medios pobres, por lo tanto, los laboratorios siempre deben tener, para el diagnóstico e identificación de las levaduras, agar Sabouraud (SDA), medios cromogénicos como CHROMagar Candida, CHROMagar Malassezia, Albicans ID; Agar Dixon, Agar Staib, agar arroz o maíz para la preparación de microcultivos y para la identificación de hongos filamentosos; agar papa (PDA), agar papa-zanahoria (PCA), agar avena (OAT), agar Czapeck (CZK), agar extracto de malta (MEA), entre otros.^{12,13}

Es importante adicionar antibióticos a los medios de cultivo, como cloranfenicol y/o gentamicina, para evitar la contaminación bacteriana presente en la microbiota de los pacientes, además, se deben utilizar medios con antifúngicos como la cicloheximida (Medio Mycosel) que evita el crecimiento de hongos ambientales para el diagnóstico en las micosis superficiales y sistémicas. En el laboratorio de micología debemos utilizar medios de cultivo, con y sin cicloheximida, ya que este antifúngico puede inhibir el crecimiento de hongos patógenos



como *Cryptococcus neoformans/gattii*, todas las especies de *Penicillium*, *Talaromyces marneffeii*, especies del género *Aspergillus*, *Lomentospora prolificans*, algunas especies del género *Candida* y los agentes de mucormicosis.¹⁸

Hongos filamentosos

En general, los hongos filamentosos producen sus estructuras de reproducción en medios de cultivo pobres en nutrientes como los mencionados en el apartado anterior. La temperatura de incubación varía entre 25°C y 28°C. El tiempo de incubación puede variar entre 3 días, como en el caso de los agentes de mucormicosis y algunos agentes de hialohifomicosis, y 45 días como en el caso de algunos dermatofitos y agentes de feohifomicosis. Debemos incubar a los agentes de micosis endémicas y a las especies del género *Sporothrix* a dos temperaturas a 25°C y 35°C, ya que estos agentes son dimórficos, para los cuales se recomienda una incubación extendida de hasta 8 semanas.

Las esporas producidas por los hongos filamentosos pueden presentar diferentes características de tamaño y forma, pueden estar constituidas por una célula conocido como ameroconidio o cuando presentan más de una célula didimoconidios, fragmoconidios, dictioconidios entre otros, estos pueden ser móviles o inmóviles. Los conidios pueden ser producidos y permanecer hasta su madurez dentro de estructuras especializadas como esporangios, zoosporangios o ascomas; o formarse y madurar dentro de estructuras especializadas (esporógenas) tales como basidios, fiálides o anélides o, directamente, de la hifa, como los arthroconidios y aleurosporas, producidos por varios tipos de hongos, incluidos los dermatofitos (agentes de tiñas). Todas estas características facilitan la identificación clásica de los hongos filamentosos.^{13,17}

Hongos levaduriformes

La mayoría de las levaduras producen colonias glabras (no tiene pelos), de color blanco o beige, y de aspecto cremoso y superficie lisa en agar Sabouraud. Según las condiciones nutricionales o de incubación, algunas cepas muestran un borde fino estrellado o franjado en el margen de la colonia. Las diversas especies no pueden ser diferenciadas macroscópicamente cuando



se utilizan medios de cultivo habituales para el aislamiento. Por otra parte, algunas características macromorfológicas del cultivo son peculiares de determinados géneros: *Rhodotorula* y *Sporobolomyces* producen colonias de color naranja; *Cryptococcus spp.* produce colonias mucosas debido a la presencia de cápsula; colonias de *Trichosporon spp.* presenta aspecto seco y superficie rugosa. Finalmente, las levaduras dematiáceas producen colonias negras debido a la alta concentración de melanina en la pared celular. La gran mayoría de las levaduras crecen bien a temperaturas de incubación entre 32 y 35°C.¹⁷ Las levaduras son organismos unicelulares, redondeados, ovals o alargados que se reproducen por brote simple o fisión. La formación de los brotes ocurre generalmente en la posición polar, otras presentan brotes que nacen simultáneamente en varios puntos. Los brotes, o células hijas son liberadas de la célula-madre para formar células independientes llamadas de blastoconidios o blastosporos que pueden continuar unidos y dar origen a las células elongadas llamadas de pseudohifas o hifas verdaderas, las cuales no presentan constricción en los septos intercelulares. Además de los blastoconidios y pseudohifas, las levaduras del género *Trichosporon* y *Saprochaeta* pueden presentar artroconidios (estructuras derivadas de la fragmentación de la pared celular que forman segmentos rectangulares), tanto *Candida albicans* como *Candida dubliniensis* presentan clamidoconidios típicos (estructuras de resistencia formada por la diferenciación de las hifas).^{2,12}

La identificación de las levaduras se realiza utilizando pruebas bioquímicas, para esto podemos utilizar la metodología clásica que consiste en la asimilación (auxonograma) y fermentación (zimograma) de los carbohidratos o métodos comerciales manuales basados en los mismos principios como Auxacolor, Fungichrom, API Candida, ID 32C, etc., también pueden ser identificadas utilizando métodos comerciales automatizados como los sistemas Vitek, Walk Away MicroScan y recientemente se está utilizando un equipo basado en resonancia magnética llamado T2MR.

5. Serología

Varios métodos no dependientes de cultivo han sido utilizados en el diagnóstico de las infecciones fúngicas, principalmente las endémicas, como



la Paracoccidioidomycosis, Histoplasmosis, Coccidioidomycosis y Blastomycosis, constituyendo en ocasiones el diagnóstico serológico el primer indicio de la naturaleza fúngica de la enfermedad del paciente. Estas técnicas utilizan anticuerpos policlonales, monoclonales o antígenos, que pueden ser cuantificados con una excelente sensibilidad y especificidad.²¹

Detección de Anticuerpos

Para el diagnóstico serológico de *Paracoccidioides* pueden emplearse la técnica de Fijación del Complemento (FC) o la de inmunodifusión (ID) -que es una técnica semi-cuantitativa, ambas con una sensibilidad y especificidad de entre 65% a 100% en individuos con infección aguda o crónica pulmonar dependiendo del antígeno utilizado, títulos de 1:8 son considerados presuntivos de un cuadro clínico de Paracoccidioidomycosis. La ID es altamente recomendada para el diagnóstico de esta enfermedad.²²

Para la histoplasmosis, se utilizan principalmente la ID y FC, utilizando como antígeno la histoplasmina y filtrados solubles del micelio y levaduras de *Histoplasma capsulatum*, la histoplasmina contiene dos componentes: el antígeno H que detecta anticuerpos durante la fase aguda de la enfermedad y el antígeno M que detecta anticuerpos que se producen durante todas las fases de la enfermedad. La técnica de Western Blot presenta buenos resultados para el diagnóstico de la histoplasmosis en sus formas agudas y crónicas.²² En la coccidioidomycosis, la determinación de anticuerpos se realiza mediante las técnicas de inmunodifusión simple, Elisa o Fijación del Complemento, en las cuales los anticuerpos de tipo IgM están presentes en la etapa aguda a partir del octavo día, mientras los anticuerpos de tipo IgG aparecen en la fase crónica o de diseminación después de 3 meses de evolución.^{11,23}

Una de las aplicaciones de la técnica de ELISA que se utiliza para la detección de anticuerpos es Platelia™ *Candida* Ab (Bio-Rad Laboratories®, California, Estados Unidos), la cual detecta anticuerpos circulantes contra el manano de *Candida spp.* y es de gran ayuda en el diagnóstico de la candidemia y de la candidiasis invasora.²⁴



Detección de Antígenos

La detección y cuantificación del polisacárido capsular de *Cryptococcus* puede realizarse mediante aglutinación con partículas de látex (LA), con una sensibilidad cercana al 95% y una especificidad cercana al 100%. Esta técnica es útil para el monitoreo terapéutico o inmunoensayos enzimáticos (Elisa) en sangre y LCR.²⁵

Los galactomananos son exoantígenos de las diversas especies de *Aspergillus* y otros hongos filamentosos (hialinos y negros), estos son liberados a nivel sanguíneo durante la invasión tisular y se pueden detectar en fluidos como suero y lavado bronquioalveolar. La prueba consiste en un inmunoensayo tipo “sandwich” comercial (Platelia Aspergillus®, BioRad) que utiliza un anticuerpo monoclonal dirigido contra el galactomanano. El ensayo entrega los resultados en índices de absorbancia siendo considerado positivo un índice de Absorbancia de 0,5, el examen positivo siempre debe ser confirmado con una segunda muestra. Es un marcador muy útil para el diagnóstico precoz (5 a 8 días antes de las manifestaciones clínicas) de la aspergilosis pulmonar invasora y diseminada, y sirve además para el seguimiento terapéutico.^{2,15,20}

El ensayo inmunocromatográfico lateral (*Lateral Flow Assay*) para la detección de un antígeno capsular de *Cryptococcus* en suero y líquido cefalorraquídeo para ha sido aprobado por la FDA, presentando una mejor sensibilidad y especificidad que LA y Elisa para el diagnóstico de la criptococosis. Esta metodología se encuentra en diferentes etapas de desarrollo para el diagnóstico de la Aspergilosis, Histoplasmosis y Coccidioidomicosis.^{24,26}

6. Métodos moleculares

Aunque se han logrado importantes avances en la identificación de muchos hongos de importancia clínica, aún existen dificultades para el adecuado reconocimiento de ciertos géneros y especies, generalmente porque estos no producen sus estructuras de fructificación en cultivo. Por este motivo, los métodos moleculares están siendo cada vez más utilizados para la identificación rápida y sensible. La identificación se realiza principalmente por la comparación de secuencias de una fracción del ADN del microorganismo con secuencias depositadas en la base de datos GenBank del Instituto Nacional de Salud de



EE. UU. (www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank) o la EMBL de la European Molecular Biology Laboratory. Para cada identificación se deben seguir los siguientes pasos: extracción del DNA (hoy en día existen muchos Kits comerciales); amplificación del material genético por PCR generalmente se utilizan partidores para la región ribosomal ITS1- 5,8S - ITS2 -Internal Transcriber Spacer que son conocidos como partidores universales (se utilizan para la identificación de una gran cantidad de hongos filamentosos y levaduriformes); en casos particulares se utilizan partidores para los genes de la β -tubulina (identificación de especies de *Aspergillus*), para el factor de elongación α (identificación de especies de *Fusarium*), para el gen de Calmodulina (identificación de las especies de *Alternaria*), para la amplificación de la región IGS de los genes ribosomales (para la identificación de las especies de *Trichosporon*), se debe comprobar el producto de la amplificación mediante electroforesis en un gel de agarosa, posteriormente se deben purificar estos productos de PCR para secuenciarlos, las secuencias deben ser comparadas con las secuencias depositadas en los bancos antes mencionados para su identificación a nivel de especie.²⁷⁻³⁰ Otras herramientas utilizadas para estudios filogenéticos y epidemiológicos, especialmente para el análisis de brotes son las siguientes: polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) del DNA mitocondrial (mtDNA); análisis del RFLP de regiones amplificadas por PCR (PCR-RFLP); análisis del polimorfismo en la conformación de las cadenas sencillas de DNA (SSCP); análisis del polimorfismo del DNA amplificado con partidores arbitrarios (RAPD), entre otras técnicas.¹²

En el año 2006, Roche Diagnostics introduce el primer test comercial basado en PCR a tiempo real, SeptiFast, para la detección de los 25 patógenos productores de sepsis, incluyendo 6 hongos causantes de sepsis (*C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicales*, *C. glabrata*, *C. krusei* y *Aspergillus fumigatus*), en aproximadamente 6 horas este método es capaz de ofrecer resultados microbiológicos al clínico, el problema está en el número limitado de hongos que consiguen identificar.³¹

El Panel de Sepsis (BCID) FilmArray® de Biomérieux analiza una lista integral de 24 patógenos asociados con las infecciones del torrente sanguíneo, puede identificar patógenos en 9 de cada 10 hemocultivos positivos en una



hora con sólo 2 minutos de manipulación. El Panel de Sepsis para FilmArrayTM, es un sistema de PCR multiplex que integra la preparación, amplificación, detección y el análisis de la muestra, consigue identificar las levaduras *Candida albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicales*, *C. glabrata*, *C. krusei*, al igual que el sistema anterior el problema está en el número limitado de hongos que consigue identificar.

7. Espectrometría de masas

La técnica de MALDI-TOF (Matrix assisted laser desorption/ionisation time of flight) es una técnica de espectrometría de masas que presenta un alto potencial para la identificación de especies de hongos levaduriformes y filamentosos.³² En algunos casos específicos, la técnica de MALDI-TOF ha sido aplicada en la identificación de agentes fúngicos hasta el nivel de especie e incluso en la identificación de especies crípticas como es el caso de *Candida parapsilosis sensu stricto*, *Candida orthopsilosis* y *Candida metapsilosis*, y también para diferenciar *Candida glabrata sensu stricto* de *Candida nivariensis* y *Candida bracarensis*.³³⁻³⁶

Una de las principales ventajas de esta técnica es la posibilidad de analizar células fúngicas intactas, que generan perfiles de masa molecular que se usan como una huella digital. Estas masas moleculares específicas son constituidas principalmente por proteínas ribosomales.^{37,38} La notable reproductibilidad de la técnica de MALDI-TOF MS se basa en la medición de la gran cantidad de componentes químicos orgánicos, los cuales se observan en el espectro de masa en un rango de entre 2 y 20 kDa.³⁹ Componentes tales como polisacáridos, lípidos, fosfolípidos, quitina, pueden ser encontrados en la pared fúngica, siendo componentes muy útiles para la identificación por esta técnica.⁴⁰



Bibliografía

1. Webster J, Weber R. *Introduction to fungi*. 3th ed. New York, USA: Cambridge University Press. (2007). p. 362-63.
2. Bonifaz A. *Micología Médica Básica*. 5a ed. Mcgraw-Hill Interamericana Editores, S.A. De C.V. (2015).
3. Silva V, Zaror L. *Diagnóstico Micológico en el Laboratorio*. 1a ed. Santiago de Chile: Universidad Mayor, Facultad de Medicina. (2014).
4. Russell R, Paterson M, Lima N. *Introduction (cap 1)*. En: Russell R, Paterson M, Lima N, Editores. *Molecular Biology of Food and Water Borne Mycotoxigenic and Mycotic Fungi*. 1a ed. Florida, USA: CRC Press. (2016). p. 1-4.
5. Hibbett DS, Binder M, Bischoff JF, Blackwell M, Cannon PF, Eriksson OE, Huhndorf S, et al. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycol Res*. 2007 May;111(Pt 5):509-47. doi: 10.1016/j.mycres.2007.03.004. Epub 2007 Mar 13. PMID: 17572334.
6. Valenzuela E. *Guía de Hongos (MICR 105-112-240-323)*. Instituto de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile.
7. Deacon J. *Fungal Biology*. Fourth Edition. Blackwell Publishing, Malden, MA. (2006).
8. Ghannoum MA, Perfect JR. *Antifungal therapy*. Informa Healthcare USA, Inc. (2010).
9. Fierro F, Vergara M. *Impacto de la biología molecular y las nuevas tecnologías en el conocimiento de la función celular y sus aplicaciones*. Primera edición. Ciudad de México: D.R. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco. (2011).
10. Dismukes W, Pappas P, Sobel J. *Clinical Mycology*. Published by Oxford University Press, Inc. New York, New York. (2003).
11. López CE. *Análisis Micológico*. 1a ed. Rosario, Argentina: UNR Editora, Editorial de la Universidad Nacional de Rosario. (2014).
12. Arenas, R. *Micología Médica Ilustrada*. 5a ed. Mcgraw-Hill Interamericana Editores. (2014).
13. De Hoog GS, Guarro J, Gené J, Figueras MJ. *Atlas of clinical fungi*. 2da edición. España: Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS)/Universitat Rovira i Virgili. (2000). 1126 pp.
14. Brandt M, Warnock D. *Taxonomy and Classification of Fungi*, In: Jorgensen J, Pfaller M, Carroll K, Funke G, Landry M, Richter S, Warnock D., (ed.) *Manual of Clinical Microbiology*. 11th ed. Washington DC, USA: ASM Press. (2015). p. 1935-43. doi: 10.1128/9781555817381.ch113.
15. Pasqualotto, AC. *Aspergillois: from diagnosis to prevention*. Dordrecht Heidelberg London NY: Springer. (2010). V. 1. 1027 pp.
16. Dyer PS, O'Gorman CM. *Sexual development and cryptic sexuality in fungi: insights from Aspergillus species*. *FEMS Microbiol Rev*. 2012 Jan;36(1):165-92. doi: 10.1111/j.1574-6976.2011.00308.x. Epub 2011 Oct 6. PMID: 22091779.



17. Colombo A, Godoy P, Reis V. *Apostila de Micología. Laboratorio Especial de Micología. São Paulo, Brasil: UNIFESP. (2009).*
18. SBPC/ML. *Recomendações da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/ Medicina Laboratorial: boas práticas em microbiologia clínica. Barueri, SP, Manole: Minha Editora (2015).*
19. Lacaz CS, Porto E, Martins JEC, Heins-Vaccari EM & Takahashi De Melo N. *Tratado de Micología Médica. 9a ed. São Paulo: Sarvier. (2002). 1104 p.*
20. Guzmán DAM. *Importancia del laboratorio en el diagnóstico de las micosis invasoras. Rev Chilena Infectol. 2004; 21(1):39-47.*
21. De Camargo ZP. *Diagnóstico Imunológico das Infecções Fúngicas, (cap. 30). En: Costa Sidrim JJ, Gadelha Rocha MF, (editores). Micología Médica à luz de autores contemporâneos. 1 a ed. Rio de Janeiro, Brasil: Guanabara Koogan. (2004). p. 302-26.*
22. Maertens JA & Marr K. *Diagnosis of fungal infections. CRC Press. (2007).*
23. Silveira FP, Queiroz-Telles F, Nucci M. *Invasive Mold Infections, (cap 7). In: Maertens JA, Marr K. (editors). Diagnosis of fungal infections. V 47. New York, USA: Informa Healthcare USA, Inc. (2007). p. 149-98.*
24. Tangarife-Castaño VJ, Flórez-Muñoz SV, Mesa-Arango AC. *Diagnóstico micológico: de los métodos convencionales a los moleculares. Med & Laborat 2015; 21:211-42.*
25. Tapia C. *Cryptococcus. Rev Chilena Infectol. 2014;31(6):719-20.*
26. Nacher M, Blanchet D, Bongomin F, Chakrabarti A, Couppié P, Demar M, et al. *Histoplasma capsulatum antigen detection tests as an essential diagnostic tool for patients with advanced HIV disease in low and middle income countries: A systematic review of diagnostic accuracy studies. PLoS Negl Trop Dis. 2018 Oct 19;12(10):e0006802. doi: 10.1371/journal.pntd.0006802.*
27. Landlinger C, Basková L, Preuner S, Willinger B, Buchta V, Lion T. *Identification of fungal species by fragment length analysis of the internally transcribed spacer 2 region. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2009 Jun;28(6):613-22. doi: 10.1007/s10096-008-0683-3.*
28. Unda F, Agüero J, Fariñas MC, Martínez-Martínez L. *Identificación de hongos de importancia clínica mediante técnicas moleculares [Identification of clinically relevant fungi using molecular techniques]. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2011 Apr;29(4):282-5. Spanish. doi: 10.1016/j.eimc.2010.12.011.*
29. Guarro J. *Taxonomía y biología de los hongos causantes de infección en humanos [Taxonomy and biology of fungi causing human infection]. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2012 Jan;30(1):33-9. Spanish. doi: 10.1016/j.eimc.2011.09.006.*
30. Irinyi L, Serena C, Garcia-Hermoso D, Arabatzis M, Desnos-Ollivier M, Vu D, et al. *International Society of Human and Animal Mycology (ISHAM)-ITS reference DNA barcoding database-the quality controlled standard tool for routine identification of human and animal pathogenic fungi. Med Mycol. 2015 May;53(4):313-37. doi: 10.1093/mmy/myv008.*



31. Lodes U, Bohmeier B, Lippert H, König B, Meyer F. PCR-based rapid sepsis diagnosis effectively guides clinical treatment in patients with new onset of SIRS. *Langenbecks Arch Surg.* 2012 Mar;397(3):447-55. doi: 10.1007/s00423-011-0870-z.
32. Santos C, Paterson RR, Venâncio A, Lima N. Filamentous fungal characterizations by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *J Appl Microbiol.* 2010 Feb;108(2):375-85. doi: 10.1111/j.1365-2672.2009.04448.x.
33. Santos C, Lima N, Sampaio P, Pais C. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight intact cell mass spectrometry to detect emerging pathogenic *Candida* species. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2011 Nov;71(3):304-8. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2011.07.002.
34. Rodrigues P, Santos C, Venâncio A, Lima N. Species identification of *Aspergillus* section *Flavi* isolates from Portuguese almonds using phenotypic, including MALDI-TOF ICMS, and molecular approaches. *J Appl Microbiol.* 2011 Oct;111(4):877-92. doi: 10.1111/j.1365-2672.2011.05116.x.
35. Taverna CG, Mazza M, Bueno NS, Alvarez C, Amigot S, Andreani M, et al. Development and validation of an extended database for yeast identification by MALDI-TOF MS in Argentina. *Med Mycol.* 2019 Feb 1;57(2):215-225. doi: 10.1093/mmy/myy021.
6. Maldonado I, Cataldi S, Garbasz C, Relloso S, Striebeck P, Guelfand L, López Moral L; Red de Micología de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires (RMCA-BA), Argentina; Red de Micología de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires.: Identificación de levaduras del género *Candida*: los métodos convencionales frente a MALDI-TOF MS [Identification of *Candida* yeasts: Conventional methods and MALDI-TOF MS]. *Rev Iberoam Micol.* 2018 Jul-Sep;35(3):151-154. Spanish. doi: 10.1016/j.riam.2018.02.002.
37. Oliveira MM, Santos C, Sampaio P, Romeo O, Almeida-Paes R, Pais C, Lima N, Zancopé-Oliveira RM. Development and optimization of a new MALDI-TOF protocol for identification of the *Sporothrix* species complex. *Res Microbiol.* 2015 Feb-Mar;166(2):102-10. doi: 10.1016/j.resmic.2014.12.008.
38. Passarini MR, Santos C, Lima N, Berlinck RG, Sette LD. Filamentous fungi from the Atlantic marine sponge *Dracmacidon reticulatum*. *Arch Microbiol.* 2013 Feb;195(2):99-111. doi: 10.1007/s00203-012-0854-6.
39. da Silva, FC, Chalfoun, SM, Batista, LR et al. Use of a polyphasic approach including MALDI-TOF MS for identification of *Aspergillus* section *Flavi* strains isolated from food commodities in Brazil. *Ann Microbiol* 65 , 2119–2129 (2015). <https://doi.org/10.1007/s13213-015-1050-0>.
40. Santos C, Ventura JA, Lima N. New Insights for Diagnosis of Pineapple *Fusariosis* by MALDI-TOF MS Technique. *Curr Microbiol.* 2016 Aug;73(2):206-13. doi: 10.1007/s00284-016-1041-9.

