



Parte III. Apoyo del laboratorio de microbiología y anatomía patológica en el diagnóstico y manejo de infecciones en el paciente con cáncer y trasplante de precursores hematopoyéticos

Marcela Ferrés¹, Mónica Lafourcade², Pilar Gamba³, Inés Cerón⁴, Ernesto Payá⁵ y David Oddó⁶

Support of the laboratory of microbiology and pathological anatomy in the diagnosis and management of infections in cancer patients and transplantation of hematopoietic stem cell transplant receptors

The confrontation of the differential and etiological diagnosis of the infectious diseases of cancer patients, including hematopoietic stem cells transplant (HSCT) recipients, must correspond to an informed, timely decision that directly affects medical behavior that determines a better survival and quality of life for patients. The main goal of this work was to contribute to the management of these patients developing a useful tool for the clinician to make these decisions. For that, infections were grouped by compromised systems, differentiating the possible etiological agents in bacteria, viruses, fungi and parasites, highlighting the relevant diagnostic tests, mentioning the recommended techniques together with the optimal sample type for proper processing. In addition, under each group of techniques we added the item "level of requirement" to suggest what, in the opinion of the authors and the existing evidence, must be mandatory to have at local level or can be derivable to another laboratory.

Keywords: Immunocompromised host; infections; microbiology specimen.

Palabras clave: Inmunocomprometido; infecciones; muestras microbiológicas.

¹Departamento de Enfermedades Infecciosas e Inmunología Pediátrica. Escuela de Medicina. Pontificia Universidad Católica de Chile. Santiago, Chile.

²Laboratorio de Microbiología. Clínica Santa María. Santiago, Chile.

³Unidad de Infectología adultos. Clínica Santa María. Santiago, Chile.

⁴Departamento de Enfermedades Infecciosas del Adulto. Escuela de Medicina. Pontificia Universidad Católica de Chile. Santiago, Chile.

⁵Hospital Dr. Exequiel González Cortés. Departamento de pediatría Universidad de Chile. Santiago, Chile.

⁶Departamento de Anatomía Patológica. Escuela de Medicina. Pontificia Universidad Católica de Chile. Santiago, Chile.

Los autores declaran ausencia de conflicto de interés. El presente trabajo no recibió financiamiento alguno.

Correspondencia a:

Marcela Ferrés Garrido
mferres@med.puc.cl

Abreviaturas

ARNr	: Ácido ribonucleico ribosomal
BDG	: β-D- glucano
CMV	: Citomegalovirus
EDTA	: Ácido etilendiaminetetraacético (anticoagulante)
EFI	: Enfermedad fúngica invasora
EICH	: Enfermedad de injerto contra hospedero
EORTC/	: European Organization for Research and Treatment
MSG	: of Cancer/Mycoses Study Group
GM	: Galactomanano
LBA	: Lavado broncoalveolar
NF	: Neutropenia febril
TDM	: Toma de muestra
TPH	: Trasplante de precursores hematopoyéticos
VEB	: Virus de Epstein Barr

oportuna del agente causal es de particular importancia en estos pacientes, pues repercute directamente en una conducta médica que determina finalmente una mejor sobrevida y calidad de vida de los pacientes.

La solicitud de los exámenes microbiológicos específicos y estudio anatomopatológico debe considerar el análisis de variados aspectos del paciente tales como su patología de base, la categoría de la inmunosupresión, el momento de evolución de la enfermedad y las terapias recibidas, el entorno epidemiológico entendido como el ambiente que lo rodea y sus contactos, las infecciones propias de la época del año y la zona geográfica, el uso previo de vacunas y, por supuesto, las manifestaciones clínicas del episodio actual junto al acabado examen físico, que permitan la formulación de una hipótesis diagnóstica y de estudio.

Desde el punto de vista del agente y la elección del examen más adecuado para su diagnóstico, el médico tratante debe estar en conocimiento de la patogenia, la importancia de los diferentes sitios anatómicos y tiempos de excreción de los agentes, para así escoger "la o las" muestra(s) biológica(s) más representativa(s) y con ello, tener la mejor aproximación diagnóstica con rapidez, e idealmente, a un costo razonable.

El laboratorio de microbiología puede disponer de las mejores técnicas diagnósticas y de personal altamente

Introducción

El estudio etiológico de las enfermedades infecciosas en los pacientes con cáncer, incluyendo los receptores de trasplante de precursores hematopoyéticos (TPH), plantea un importante reto al momento de seleccionar el estudio a realizar. La identificación



capacitado para su procesamiento; su desempeño dependerá, sin embargo, en gran medida, de la calidad de las muestras; por ello es prioritario no perder de vista este aspecto. Esto exige capacitación continua del personal que asegure una correcta toma y transporte de muestras microbiológicas¹.

Es importante también resaltar las limitaciones que impone la condición de inmunosupresión del paciente al momento de evaluar el rendimiento de algunas técnicas diagnósticas como también la interpretación cuidadosa de los resultados, a la luz de la enfermedad de base.

Muchas metodologías diagnósticas, por su costo y por la baja prevalencia del agente que detectan, resulta más conveniente centralizarlas en pocos laboratorios; sin embargo, otras técnicas deben estar disponibles en los centros que atienden pacientes inmunocomprometidos para asegurar un acceso rápido y seguro a un diagnóstico microbiológico específico.

El objetivo de este trabajo es desarrollar una herramienta útil al médico clínico, agrupando las infecciones por sistemas comprometidos y diferenciando los posibles agentes etiológicos en bacterias, virus, hongos y parásitos, explicitando los exámenes diagnósticos más relevantes, mencionando la(s) técnica(s) recomendada(s) junto con el tipo de muestra óptima para su adecuado procesamiento. En consideración de la importancia del estudio histológico de las muestras obtenidas, se incluyó una sección que señala el aporte del estudio anatomopatológico en el diagnóstico de complicaciones infecciosas de este grupo de pacientes. De manera adicional, se incorporó el ítem “nivel de requerimiento” para sugerir lo que, a juicio de los autores y la evidencia existente, debe estar presente obligatoriamente en el centro o puede ser derivable a otro laboratorio.

En este artículo se revisan y entregan recomendaciones en los siguientes aspectos:

- **Importancia de la toma de muestra (TDM)** en el diagnóstico microbiológico, resaltando los elementos claves para asegurar una muestra de calidad que permita la mejor opción para el diagnóstico. Es responsabilidad de cada centro la elaboración de un manual de toma y transporte de muestras. Este documento sólo constituye una recomendación general.
- **Exámenes de laboratorio utilizados para el diagnóstico de las enfermedades infecciosas.** Se presentan en la modalidad de tablas que resumen los exámenes imprescindibles y que deberían estar disponibles en la institución que atiende a pacientes con cáncer y/o TPH, o que puedan ser derivados a centros de referencia. Estas tablas se han organizado desde un punto de vista sindrómico para facilitar el uso por el equipo tratante.
- **Exámenes de cribado de infecciones, previo al inicio de quimioterapia del cáncer o trasplante.**

- **Exámenes de anatomía patológica** con descripción de las distintas técnicas de las que se dispone para estudios de importancia en el diagnóstico de etiología infecciosa en este grupo de pacientes.

Importancia de la toma de muestra

La elección del tipo de muestra microbiológico es de responsabilidad del médico que solicita el examen. Ésta debe ser representativa del cuadro infeccioso que se desea estudiar y es muy relevante que su recolección y transporte cumpla con los requerimientos exigidos por el laboratorio.

Algunas consideraciones fundamentales para una buena TDM y transporte¹:

- Cada centro debe elaborar su propio manual de TDM con aspectos generales y específicos fundamentados en la literatura científica (Ej.: tipos y marcas de insumos para la toma y el transporte de muestras).
- Lo ideal es que la TDM microbiológica se realice antes del inicio de terapia antimicrobiana.
- Las muestras de mala calidad no permiten la ejecución de un examen confiable. Idealmente debe intentarse la repetición de la TDM para la correcta interpretación de los resultados.
- Es recomendable la TDM de sitios estériles y ser cautelosos en la interpretación de resultados de sitios como el tracto respiratorio alto, piel y tejidos blandos, entre otras, considerando el microbioma humano.
- Privilegie la TDM por punción, aspirado o biopsia de tejido y no tomar cultivos de superficie de tejidos por tórula por la escasa cantidad de muestra (aproximadamente 0,05 ml) e inóculo heterogéneo.
- Recuerde que el paciente objetivo es un hospedero “frágil” y que existen momentos como los períodos de neutropenia profunda, en que deben ser evitados algunos procedimientos invasores ya que pueden favorecer la translocación microbiológica.
- Use medios de transporte cuando las muestras son recolectadas con tórula.
- La muestra de tejido debe enviarse en un recipiente hermético y estéril, con solución salina fisiológica (“suero fisiológico”) sin ningún aditivo y a temperatura ambiente. En el caso de exámenes virológicos use medios de transporte especiales (ej.: medio de transporte universal MTU).
- Rotule clara y adecuadamente las muestras especificando el sitio anatómico y la forma de recolección para su correcto procesamiento e interpretación.
- Obtenga la mayor cantidad de muestra posible para que ésta sea representativa del sitio de TDM.
- Transporte al laboratorio lo más rápido posible para no alterar la calidad de la muestra.



- El transporte de la muestra, para estudio viral debe ser refrigerada y para cultivos bacterianos o micológicos a temperatura ambiente; como excepción, las orinas también deben ser refrigeradas hasta ser cultivadas.

Exámenes de laboratorio utilizados para el diagnóstico de las enfermedades infecciosas

Infecciones causadas por bacterias

Las infecciones bacterianas se diagnostican en el laboratorio por métodos directos e indirectos.

- **Métodos directos tradicionales:** permiten visualizar e identificar el microorganismo mediante observación microscópica, uso de distintos tipos de tinciones y cultivos. El cultivo es la piedra angular del diagnóstico microbiológico, pero no es practicable para todos los agentes.
- **Métodos directos por técnicas inmunológicas y moleculares:** pueden ser utilizados cuando el agente no permite su tinción ni su cultivo o simplemente su crecimiento es muy laborioso y lento; estas técnicas detectan parte del agente, por ejemplo, antígenos o material genético. Si bien los estudios moleculares han resultado un gran avance en el diagnóstico de ciertos microorganismos, la mayoría de los estudios de susceptibilidad a antimicrobianos se sustenta en el cultivo, por tanto, los cultivos continúan siendo indispensables para la elección de la terapia.
- **Métodos indirectos:** corresponden al estudio de la respuesta inmune específica del paciente, conocida como serología, que presenta la limitante de baja sensibilidad en pacientes cuya inmunidad está disminuida.

Cada una de estas técnicas presenta ventajas y desventajas que radican en varios factores, entre ellos, el microorganismo que se esté sospechando y el tipo de paciente que se estudiará. Por ello resulta crucial disponer de una diversidad de técnicas para cubrir el enorme abanico de posibilidades etiológicas. Junto con lo anterior, en el diagnóstico bacteriano es muy importante la correcta interpretación de los resultados, más aún si se considera que muchas bacterias de la microbiota normal pudieran interpretarse como agentes causales o, al contrario, pasar inadvertidas en una determinada muestra si no existe un análisis riguroso de la situación particular de cada caso.

Una técnica reciente de identificación múltiple es el Panel de Sepsis (BCID) FilmArray® que analiza 24 patógenos y tres genes de resistencia antimicrobiana asociados con las infecciones del torrente sanguíneo. Puede identificar patógenos en nueve de cada 10 hemocultivos positivos en una hora. Tiene la capacidad de identificar: *Enterococcus* spp, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus* sp., *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* sp, *Streptococcus*

agalactiae, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacteriaceae*, Complejo *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus*, *Serratia marcescens*, *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*; genes de resistencia: *mecA*-resistencia a meticilina, *van A/B*-resistencia a vancomicina, *KPC*-resistencia a carbapenémicos. Otro de los avances recientes en la identificación microbiológica es la espectrometría de masas, específicamente en el MALDI-TOF MS (*matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometer*) que permite acortar los tiempos y mejorar la exactitud respecto a los métodos de identificación convencional de bacterias y levaduras¹⁻³.

Infecciones causadas por hongos

Los pacientes con cáncer y aquellos sometidos a TPH tienen mayor riesgo de presentar enfermedad fúngica invasora (EFI). Los agentes más frecuentemente involucrados son *Candida* spp y *Aspergillus* spp, pero también pueden presentarse infecciones por *Cryptococcus* spp, *Pneumocystis* spp, *Fusarium* spp y Mucorales, entre otros. El diagnóstico temprano de estas infecciones y su oportuno tratamiento impacta en su mortalidad, por lo que una elevada sospecha clínica junto a recursos diagnósticos de laboratorio sensibles y oportunos le otorgarán al paciente una mejor opción de terapia y pronóstico⁴.

Para el diagnóstico de EFI también se cuenta con técnicas directas como tinciones de blanco de calcoflúor para hongos filamentosos y tinta china para *Cryptococcus*, cultivos de sangre, secreción, colecciones o fluidos estériles, y técnicas indirectas basadas en la detección de antígenos fúngicos circulantes como galactomanano (GM), β -D-glucano (BDG), antígeno de *Cryptococcus* spp. El galactomanano es de utilidad en diagnóstico de aspergilosis invasora; sin embargo, también puede resultar positivo en otras infecciones por hongos filamentosos como *Fusarium* spp. El BDG es un marcador panfúngico porque es componente de la pared de *Candida*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Pneumocystis*, *Trichosporon* y *Acremonium*, pero no forma parte de la pared de los agentes de mucormicosis ni de *Cryptococcus* spp⁵.

Una estrategia relevante, destacada durante los últimos años, ha sido el uso de GM, BDG y reacción de polimerasa en cadena (RPC), para la detección temprana de EFI. De hecho, tanto BDG como GM han sido incluidos entre los criterios diagnósticos para EFI de la EORTC/MSG⁴.

El GM se puede realizar en muestras de sangre y lavado broncoalveolar (LBA), existe menos información de su utilidad en líquido cefalorraquídeo (LCR). Su uso es especialmente útil como herramienta de vigilancia en los períodos de alto riesgo en pacientes asintomáticos



con neutropenia post-quimioterapia o TPH, enfermedad de injerto contra hospedero (EICH) o neutropenia febril (NF). En pacientes adultos, los análisis basados en GM, BDG y RPC son herramientas aceptadas para apoyar el diagnóstico de EFI. Sin embargo, su uso en niños ha sido cuestionada. De acuerdo a estudios publicados de su utilización en niños con cáncer y NF y cribado de EFI como complicación de TPH, los valores de GM y BDG poseen sensibilidades bajas y variables; no obstante, con valores predictores negativos altos, en rangos de 85 a 100% para cribado y 70 a 100% en diagnóstico clínico de aspergilosis, pero con resultados menos auspiciosos en el diagnóstico de hongos diferentes a *Aspergillus spp*⁶⁻¹¹.

La amplificación del material genético es una aproximación novedosa y prometedora, pero aún en fase de estandarización.

La identificación de especies y el estudio de sensibilidad son relevantes para la elección de agentes antifúngicos, así como en la vigilancia de cambios epidemiológicos que puedan afectar la elección de tratamientos empíricos. Las pruebas de sensibilidad antifúngica deben considerarse ante el aislamiento de *Candida no-albicans*. Los laboratorios de referencia deben concentrar estos recursos diagnósticos.

Y si bien no es parte del estudio etiológico, resulta de gran importancia en el seguimiento de pacientes en tratamiento con voriconazol, contar con la disponibilidad *in situ* o en laboratorios de referencia, de medición de concentraciones plasmáticas de voriconazol, considerando su estrecho margen terapéutico, correlación entre concentraciones y desenlace, y las dificultades en poder llegar a concentraciones terapéuticas, especialmente en pacientes pediátrico¹²⁻¹⁴, aspecto que se desarrolla en el Capítulo III dedicado a terapéutica.

Infecciones causadas por virus

Los agentes virales pueden ser divididos en dos categorías. Los causantes de *infecciones oportunistas*, capaces de provocar una enfermedad grave en el paciente inmunocomprometido, como los virus de la familia *Herpesviridae*, especialmente citomegalovirus (CMV) y el virus de Epstein Barr (VEB); los virus poliovirus, BK y JC, de gran importancia en el manejo de pacientes receptores de TPH^{16,17}. El segundo grupo corresponde a los virus que producen *infecciones autolimitadas* como los virus respiratorios que, en estos pacientes, especialmente los receptores de TPH, puede ocasionar infecciones graves por su inmunosupresión celular¹⁵. Los métodos diagnósticos para las infecciones virales han tenido un progreso notable, fundamentalmente asociado a la mejoría y estandarización de los ensayos moleculares, que aportan en sensibilidad y cuantificación de carga viral. Los ensayos clásicos como las técnicas de detección de antígenos (por técnicas de inmunofluorescencia/ELISA) están aún vigentes y los

cultivos celulares se han reservado para la recuperación de cepas de interés, detección de nuevos agentes, cambios en la genética viral o ensayos de secuenciación para determinar susceptibilidad a antivirales¹⁸⁻²¹.

Infecciones causadas por parásitos

Numerosos parásitos son capaces de provocar graves enfermedades en pacientes con cáncer y TPH, especialmente aquellos en condición de inmunosupresión profunda de células T.

La mayoría de estas infecciones se deben a parásitos intracelulares y pueden ser producidas por reactivación de una infección latente, infección primaria o reinfección.

En Chile, estos agentes se clasifican como de alta o baja relevancia, teniendo en cuenta su gravedad o su frecuencia. Es así como son de alta relevancia *Toxoplasma gondii*, *Cryptosporidium sp*, *Microsporidium sp*, *Blastocystis sp*, *Giardia sp* y *Echinococcus sp*; en cambio son de relevancia menor *Cystoisospora sp*, *Cyclospora sp*, *Entamoeba histolytica*, *Trypanosoma cruzi*, *Strongyloides stercoralis*, *Leishmania sp*, *Plasmodium sp*, *Babesia sp*, *Acanthamoeba sp* y *Schistosoma sp*.²²

El diagnóstico precoz de infección contribuye ciertamente a mejorar el pronóstico de estos pacientes. Entre las técnicas diagnósticas, la microscopia directa, las técnicas serológicas y moleculares, más un acabado estudio histológico, son las herramientas disponibles a usar en aras de optimizar un diagnóstico parasitológico²³.

En las Tablas 1 a 7 se resumen los métodos diagnósticos disponibles según el órgano comprometido y los eventuales microorganismos involucrados, especificando el tipo de muestra, la técnica diagnóstica, condiciones de transporte y el nivel de requerimiento para realizar en laboratorio local o conveniencia de definir laboratorio de referencia.

Exámenes de cribado de infecciones, previo al inicio de quimioterapia del cáncer o trasplante.

Ante la inmunosupresión asociada al cáncer, sus tratamientos y la profunda vulnerabilidad a las infecciones durante un TPH, es importante estar en conocimiento de cuáles infecciones bacterianas, virales o parasitarias han afectado previamente al niño por el riesgo de reactivación de ellas durante este período. Asimismo, el estudio del donante de los precursores hematopoyéticos, con excepción de la sangre de cordón umbilical, informará qué inmunidad específica aportará a su hospedero.

La pesquisa se realiza por más de una técnica de laboratorio, a través de la detección de anticuerpos específicos IgG, IgM o totales, antígenos, o búsqueda de genoma de algunos agentes desde sangre, tejido o biopsia, por ejemplo.



En la Tabla 8 se listan los principales exámenes y agentes que pueden causar complicaciones durante la inmuno supresión del paciente oncológico o receptor de trasplante.

Métodos para el diagnóstico de los agentes infecciosos en material anatomopatológico

El aporte del laboratorio de anatomía patológica en el estudio de las enfermedades infecciosas en los pacientes inmunocomprometidos representa una valiosa contribución al momento de su enfrentamiento diagnóstico, terapéutico y pronóstico. El laboratorio posee una variedad de técnicas rutinarias que pueden ser utilizadas en la mayoría de las instituciones que cuenten con un laboratorio de anatomía patológica.

Los métodos de examen o estudio anatomopatológico de las infecciones combinan, actualmente, las tradicionales e insustituibles técnicas morfológicas con métodos complementarios de tipo inmunohistoquímico y con técnicas de biología molecular^{28,29}.

El uso de la inmunohistoquímica y la patología molecular suele reservarse para instituciones de mayor complejidad y los costos asociados a su ejecución suelen ser mayores^{30,31}.

Nivel macroscópico

En este nivel se identifica la muestra, se observa y se describe. En los casos de piezas quirúrgicas, una adecuada observación y disección permite obtener muestras representativas de las lesiones (muestreo) para estudio histopatológico. En algunos casos, el análisis macroscópico orienta el diagnóstico, como por ejemplo, en la colonización y ocupación de cavidades orgánicas pre-existentes como los aspergilomas; en las inflamaciones mucosas pseudomembranosas asociadas a hongos del género *Candida*; en los infartos de tipo séptico secundarios, propios de hongos angio-invasores; o en los casos de lesiones nodulares mucinosas producidas por *C. neoformans*.

Las muestras pequeñas obtenidas por punción, métodos endoscópicos o biopsias incisionales, deben ser procesadas en forma completa. Biopsias de órganos completos, partes de órgano o grandes biopsias excisionales deben ser muestreadas incluyendo tejido alterado, tejido aparentemente sano, tejido de la interfase lesión-sano y material no tisular (bolas micóticas, material mucoideo, pseudomembranas, etc.).

La fijación de las muestras debe ceñirse a los protocolos estándares que tienen los laboratorios de anatomía patológica, usualmente con formalina-tampón al 10%, en volumen y tiempo en concordancia con el tipo de muestra.

Las muestras para microscopia electrónica deben fijarse en glutaraldehído.

En esta instancia, antes de proceder a la fijación de los especímenes, es siempre mandatorio, si antes no se ha hecho, disponer de muestras para los cultivos microbiológicos correspondientes y eventualmente, para otro tipo de análisis que requiera de tejido no fijado en formalina.

Nivel de requerimiento: Deben estar disponibles en todos los centros que manejan pacientes con cáncer y TPH.

Nivel microscópico habitual o de microscopia óptica

Los análisis a este nivel de observación pueden desarrollarse en forma rápida o de manera diferida, de acuerdo con la disponibilidad de técnicas y premura de cada caso. Por otra parte, se pueden aplicar técnicas o métodos de estudio simple o complejos según los protocolos de trabajo que se planifiquen.

- *Análisis rápidos con técnicas simples:* Los análisis rápidos, de tejidos congelados o citología, pueden usar clarificantes como el KOH, el lactofenol o el azul de lactofenol, o tinciones rápidas mono o policromáticas como el azul de toluidina, la tinción de Gram, Papanicolaou, Giemsa o similares, o las tinciones abreviadas de hematoxilina & eosina y de Gomori-Grocott. En este ámbito se incluye el examen con blanco de calcoflúor, un blanqueador de algodón fluorescente que se une a la celulosa y quitina de la pared fúngica, y que exhibe fluorescencia cuando se expone a luz ultravioleta, permitiendo delinear claramente elementos fúngicos; sin embargo, tiene falsos positivos con fibras vegetales, colágeno o elastina. Las técnicas simples se emplean, preferentemente, en muestra citológica o tejidos congelados que requieren de procesamiento sencillos, de fácil observación y resolución rápida.
- *Análisis diferidos con técnicas de baja y mediana complejidad.* La microscopia óptica diferida habitual con tinciones corrientes o de baja complejidad –hematoxilina & eosina, el Van Gieson– permite identificar la mayoría de los elementos fúngicos tisulares presentes en las micosis humanas, ya sea superficiales o profundas. Además, es el medio a través del cual podemos definir, de manera concluyente, el tipo de respuesta tisular frente a la infección micótica, estableciendo un diagnóstico formal.
- *Análisis con técnicas de mayor complejidad:* Con posterioridad a los exámenes señalados surgen las orientaciones necesarias para la aplicación de técnicas de mayor complejidad, ya sea de carácter histoquímico, inmunohistoquímico o de biología molecular. En estos estudios se emplea una variedad de tinciones e impregnaciones histoquímicas cuya finalidad es resaltar los elementos micóticos en los cortes de tejido.



Las técnicas histoquímicas de mayor utilidad y disponibilidad en el diagnóstico anatomopatológico de las micosis humanas se pueden sistematizar de acuerdo con su sitio y mecanismo de acción³²⁻³⁴, a saber:

- **Técnicas parietales-oxidativas:** Ácido periódico base de Schiff o PAS, Gridley y Gomori-Grocott. El principio común de estas tres técnicas es la oxidación de los grupos hidroxilos de los complejos polisacáridos existentes en la pared fúngica, a grupos carbonilos (aldehídos o cetonas) en presencia de ácido periódico (PAS) o ácido crómico (Gridley y Gomori-Grocott). Los aldehídos, así formados, reaccionan posteriormente con la base Schiff (leucofucsina) coloreando la pared del hongo color rojo púrpura en el PAS y rojo rosado en el Gridley (reacción de Feulgen); el PAS se contrasta con hematoxilina de Harris y el Gridley con amarillo de metanilo. En el caso de la impregnación de Gomori-Grocott, los aldehídos reducen los complejos de nitrato de plata metenamina confiriéndole a la pared fúngica un color café-negro-grisáceo, el color está dado por el depósito de plata reducida en el sitio en que se localizan los aldehídos. La intensidad de la coloración obtenida con estas técnicas depende básicamente, de la cantidad de aldehídos presentes en la pared de los hongos. Esta impregnación puede contrastarse con verde luz o con hematoxilina & eosina.
- **Técnicas para mucina-mucopolisacáridos ácidos capsulares:** Estas técnicas se emplean, básicamente, en la identificación de *Cryptococcus neoformans*, a través del realzamiento de su cápsula rica en mucopolisacáridos ácidos, especialmente en las llamadas variedades húmedas, que son las más frecuentes. Los dos métodos más utilizados son el mucicarmín de Mayer y el azul antiguo (*ancient blue*).

La tinción de mucicarmín de Mayer es una técnica que data desde 1896, cuyo colorante fundamental es el carmín de origen natural. Se han desarrollado muchas modificaciones de la tinción original, pero en todas, la cápsula de *C. neoformans* se tiñe de rojo, los núcleos celulares de negro o azul y el fondo es amarillento.

El azul antiguo es un colorante del grupo de los ftalocianinas, moléculas que tienen un átomo central de cobre; es una sustancia de carácter básico que se liga a los grupos ácidos de los mucopolisacáridos (sulfatados y no sulfatados pH dependientes) originando un compuesto salino coloreado. A menor pH, se tiñen sólo los mucopolisacáridos ácidos sulfatados. Con esta tinción, la cápsula de *C. neoformans* se tiñe de azul, los núcleos celulares de rojo o rosado y el citoplasma rosado pálido.

- **Técnicas para sustancias pigmentarias:** La presencia de pigmentos es algo común en el reino de los hongos, incluidos algunos del tipo de la melanina o similares. Desde el punto de vista del diagnóstico

anatomo-patológico, tiene importancia un grupo de hongos filamentosos pigmentados correspondientes a “Phaeohiphomyces” o también denominados hongos dermatíaceos. La coloración de las hifas se produce por la presencia de pigmentos melánicos de la pared de las mismas, característica que puede ser evidente en los cortes histológicos teñidos con técnicas corrientes. Sin embargo, en algunos casos la pigmentación no es obvia. Por otra parte, se ha descrito que *C. neoformans*, también posee en su pared pigmentos melánicos inaparentes con las tinciones usuales, pero cuya demostración tendría valor diagnóstico en los casos de variedades secas o acapsuladas de este hongo. Por tanto, la demostración histológica de este pigmento en los hongos tisulares tiene trascendencia diagnóstica. La identificación de estas sustancias melánicas en las paredes fúngicas se basa en la propiedad de afinidad argéntica que tienen estos pigmentos, es decir, la propiedad de reducir el nitrato de plata. La técnica empleada con estos fines se denomina “Fontana-Masson”; la que es una impregnación argéntica sobre las granulaciones pigmentarias dotadas de capacidad reductora. Las zonas con melanina se tiñen negro-grisáceo y los núcleos y citoplasma celular rojo-rosado, ya que se contrasta con solución de rojo nuclear.

- **Técnicas diferenciales:** En este grupo se incluyen todas las variedades de tinción de Gram empleadas en cortes de tejidos. El mecanismo de esta antigua y útil tinción no es bien conocido. Sin embargo, se estima que las bacterias y otros microorganismos grampositivos poseerían una pared celular rica en grupos sulfhidrilo, los que formarían enlaces disulfuro estables con el violeta de genciana o de metilo, previo al tratamiento con tintura de yodo, reteniendo el violeta después del lavado diferenciador con alcohol-acetona y tomando el colorante de contraste (safranina, fucsina o rojo neutro). Las bacterias y microorganismos gramnegativos no retienen el violeta y se tiñen con el colorante de contraste. El punto crucial de todas las formas de tinción de Gram para tejidos es la diferenciación con alcohol o acetona, de manera que cada laboratorio debe ensayar cada método hasta precisar con exactitud el tiempo de diferenciación para su técnica. Las levaduras y esporas son habitualmente Gram positivo (azul, violeta o negro) y las hifas Gram negativo (rojo) o Gram variable.
- **Otras tinciones:** Otras coloraciones que están integradas a la batería dispuesta para el diagnóstico de agentes infecciosos en muestras de tejidos, son el Giemsa y similares, y las tinciones ácido-alcohol resistente. La tinción de Giemsa para secciones histológicas emplea como colorante fundamental una mezcla de derivados tiacínicos catiónicos (azur A, B y azul de metileno)



destinados a teñir los núcleos celulares y de eosina como colorante citoplasmático. Es una excelente tinción para estimar la morfología celular, especialmente de células linfohematológicas y de agentes infecciosos intracelulares y para su diagnóstico morfológico diferencial. En las micosis profundas ha sido útil en la pesquisa de histoplasmosis, tanto en frotis como en cortes histológicos.

Las tinciones ácido-alcohol resistentes se usan rutinariamente en el diagnóstico de agentes infecciosos tisulares, particularmente de micobacterias, criptosporidios, microsporidios y en algunas esporas micóticas.

- *Análisis diferidos con técnicas de alta complejidad:* Corresponden al uso de técnicas inmunológicas y moleculares para llegar al diagnóstico:

- Examen con microscopia de contraste de fases, utilizado para identificar hongos capsulados como *C. neoformans*, dada la capacidad de refracción de luz de la gruesa cápsula micótica.
- Examen con técnicas inmunológicas con anticuerpos poli o monoclonales marcados con fluorocromos o cromógenos. El examen inmunofluorescente requiere de muestras de tejido frescas no fijadas en formalina. El examen inmunohistoquímico con cromógenos (DAB) se hace sobre cortes de muestras fijadas en formalina e incluidas en parafina; para estos análisis se dispone, en forma rutinaria, de anticuerpos monoclonales primarios para *Candida* que son útiles en el diagnóstico de micosis por hongos levaduriformes, para *Pneumocystis* spp, y para *Aspergillus*, este último de gran utilidad en las micosis invasoras por hialohyphomycetes. Estos exámenes inmuno-histoquímicos requieren de la elección de cortes de tejido con la presencia de elementos micóticos que se quiere identificar.
- Análisis de RPC para elementos de inserción o secuenciación de ARNr 16S, en especial a partir de muestra de tejido microdisecadas con presencia de agentes infecciosos o representativas de las lesiones estudiadas. Se dispone de estudios estandarizados para *Candida* spp, *Aspergillus* spp, *Pneumocystis* spp.
- Examen con técnicas de hibridación *in situ* fluorescente (FISH) o hibridación *in situ* cromogénica (CISH) en paracoccidioidomicosis.

Nivel de requerimiento: Intermedio y derivación. Dado que parte de las técnicas pueden ser implementadas en los centros que atienden a estos pacientes, se sugiere enviar los “análisis diferidos de alta complejidad” a un centro de derivación o referencia con el que se mantenga una comunicación cercana y fluida.

Nivel ultramicroscópico o microscopia electrónica de transmisión

Los análisis con microscopia electrónica de transmisión de tejido fijados en glutaraldehído o recuperado de las inclusiones en parafina, aunque lentos, son de utilidad en la caracterización ultraestructural de los elementos micóticos en los propios tejidos. Los estudios basan su observación en las características de la cápsula, pared celular, septos, membrana citoplasmática, núcleo y organelos.

Nivel de requerimiento: Derivación a un centro de referencia.

En la Tabla 9 se resume en forma esquematizada un complemento de los métodos morfológicos, inmunohistoquímicos, ultraestructurales y moleculares disponibles en el diagnóstico de enfermedades infecciosas.

Patrones morfológicos de las enfermedades infecciosas

Cada una de las muestras procesadas se somete a un examen descriptivo en que el patólogo observa, el o los patrones morfológicos^{35,36}, que son el producto de la interacción entre el agente infeccioso y el hospedero afectado. Los patrones morfológicos son, a grandes rasgos, descritos como: patrón no reactivo, alterativo, paratrófico, hiperplásico, atrófico, vascular, inflamatorio y mixtos.

- *No reactivo*, en infecciones con agentes poco inmunogénicos (*C. neoformans*, esquistosomas adulto). Es posible también encontrarlo en infecciones en fase inicial o en tratamiento y en infecciones en pacientes inmunocomprometidos.
- *Alterativo*, en el que se describe necrosis y destrucción y es propio de infecciones invasoras localizadas, generalizadas graves (virales, bacterianas, micóticas y parasitarias), virus desmielinizantes (JC) y priones.
- *Paratrófico* está ejemplificado por los efectos virales citopáticos (CMV, herpesvirus, VZV, VRS, papovavirus, molusco contagioso, etc.).
- *Hiperplásico*, se ve hiperplasias linfoides y mieloides, hiperplasia megacariocítica (ehrlichiosis y anaplasmosis) o hiperplasia pseudo-epiteliomatosa (micosis y escabiosis).
- *Atrófico*, localizado puede ser secundario a compresión y el generalizado a atrofia linfática relacionada al VIH.
- *Vasculares*, pueden ser de vasos pequeños o medianos con oclusión luminal (por ejemplo, orden Mucorales, géneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Paecilomyces* y *Pseudoallescheria*; *Dirofilaria immitis* y género *Angiostrongylus*; con trombosis e infarto. O de vasos sanguíneos medianos y grandes con daño parietal o adventicial (bacterias y hongos con desarrollo de aneurismas micóticos).



- *Inflamatorio*, puede ser descrito como pseudomembranoso, exudativo purulento, supurado, flegmonoso o abscedado. Caseificado o granulomatoso tuberculoideo, linfoplasmocitario o mixto.

En conclusión, el uso del laboratorio de Anatomía Patológica es un gran aporte al entendimiento de las enfermedades infecciosas que afectan a los pacientes con cáncer e inmunosupresión y a los que han recibido TPH. Existen niveles de complejidad creciente para obtener un diagnóstico preciso y su implementación debe ser evaluada por cada institución; sin embargo, los requerimientos básicos macroscópicos y microscópicos con las tinciones más conocidas deben estar disponibles en todos los centros hospitalarios que reciben y manejan estos pacientes.

En forma adicional, se entrega información de las técnicas y tinciones utilizadas para identificar agentes infecciosos y una descripción general de los patrones morfológicos que se describen en los informes de anatomía patológica, que facilite la conexión entre el paciente y los resultados de sus exámenes.

Resumen

El enfrentamiento del diagnóstico diferencial y etiológico de las enfermedades infecciosas de los pacientes con cáncer, incluyendo los receptores de trasplante de precursores hematopoyéticos (TPH), debe corresponder a una decisión informada, oportuna y que repercuta directamente en una conducta médica que determine una mejor sobrevida y calidad de vida de los pacientes. El objetivo de este trabajo fue aportar en el manejo de estos pacientes desarrollando una herramienta útil al médico clínico para tomar estas decisiones. Para ello se agruparon las infecciones por sistemas comprometidos diferenciando los posibles agentes etiológicos en bacterias, virus, hongos y parásitos, explicitando los exámenes diagnósticos más relevantes, mencionando la o las técnicas recomendadas, junto con el tipo de muestra óptima para su adecuado procesamiento. De manera adicional, se incorporó el ítem “nivel de requerimiento” para sugerir lo que, a juicio de los autores y la evidencia existente, debe estar presente obligatoriamente en el centro o puede ser derivable a otro laboratorio.

Tabla 1. Métodos de laboratorio para el diagnóstico de infecciones del torrente sanguíneo

Diagnóstico de infecciones bacterianas en el torrente sanguíneo ¹				
Diagnóstico sindromático	Técnicas diagnósticas	Muestra	Toma de muestra	Transporte
Infección del torrente sanguíneo asociado a catéter venoso central	Cualitativo: tiempo diferencial	Sangre ² <i>Adultos</i> : 20-30 ml por set de hemocultivos ³ (una muestra por punción venosa periférica y otra por el catéter venoso central) <i>Niños</i> : volúmenes según peso corporal ⁴	Igual volumen por frasco ² No deben pasar más de 10 minutos entre la toma de ambas muestras Pesar los frascos y consignar volumen de sangre	De inmediato T° ambiente. Rotular frascos para asegurar interpretación de resultados
	Cuantitativo diferencial	Sangre Dos jeringas de tuberculina obtenidas de punción periférica y otra del catéter venoso central	Igual volumen 1 ml de sangre	De inmediato T° ambiente. Rotular jeringas para asegurar interpretación de resultados
	Cultivo de la punta del catéter	Al día de hoy se desestima su valor predictor en el diagnóstico y se recomienda no utilizarlo		
Infección del torrente sanguíneo NO asociado a catéter	Cultivo corriente automatizado Identificación de hemocultivos positivos a través de técnicas moleculares o espectrometría de masa (Filmmarrays Y Malditoff)	Sangre <i>Adultos</i> : 20-30 ml por set de hemocultivos ³ <i>Niños</i> : volúmenes según peso corporal ⁴	En adultos se recomienda obtener dos-tres set de cultivos por episodio séptico En niños es recomendable dos set de cultivos por episodio séptico	De inmediato T° ambiente

¹Nivel de requerimiento: deben estar disponibles en cada institución que maneje estos pacientes. ²El volumen de sangre es la variable más importante en el rendimiento de cualquier hemocultivo. Una botella debe llevar un volumen máximo de 10 ml. ³Set de hemocultivos se refiere a dos botellas inoculadas con sangre obtenida desde la misma punción. En pacientes con catéter multilumen, idealmente tomar sangre de todos los lúmenes. Si no es posible, tomar muestras al lumen que más se emplea.

⁴Volumen de sangre recomendado para hemocultivos en niños.



Peso (kg)	Volemia total (ml)	Volumen de sangre recomendada para cultivo (ml)		Volumen total para cultivo (ml)	% de volemia
		Cultivo N° 1	Cultivo N° 2		
≤ 1	50-99	2 (frasco amarillo)		2	4
1,1 - 2	100-200	2 (frasco amarillo)	2 (frasco amarillo)	4	4
2,1 - 12	> 200	3-4 (frasco amarillo)	3-4 (frasco amarillo)	6-8	3
> 12 - 40	> 800	10 (frasco verde)	10 (frasco verde)	20	2,5
> 40	> 2.500	10-20 (1-2 frascos verde)	10-20 (1-2 frascos verde)	40	<2

Diagnóstico de infecciones fúngicas en el torrente sanguíneo¹

Diagnóstico sintomático	Técnicas diagnósticas	Muestra	Toma de muestra	Transporte
Infección fúngica asociada a catéter venoso central	Cualitativo: Hemocultivos ²	Sangre <i>Adultos</i> : 20-30 ml por set de hemocultivos ⁴ (una punción por vía periférica y otra por el catéter venoso central) <i>Niños</i> : volúmenes según peso corporal ⁵	Igual volumen ³ < 10 minutos entre la toma de ambas muestras Idealmente pesar los frascos y consignar volumen de sangre	De inmediato T° ambiente Rotular frascos para facilitar interpretación
Infección fúngica del torrente sanguíneo NO asociada a catéter venoso central	Hemocultivos ²	Sangre <i>Adultos</i> : 20-30 ml por set de hemocultivos ⁴ <i>Niños</i> : volúmenes según peso corporal ⁵	Igual volumen ^{1,2} < 10 min entre la toma de ambas muestras Idealmente pesar los frascos y consignar volumen de sangre	
Biomarcadores	Antígeno galactomanano (GM)	Suero Dos muestras semanales	Tubo tapa amarilla (gel) <i>clob tube</i> Volumen: 2-4 ml	A 4 °C: ≤ 5 d; > 5 d: -70 °C
	(1-3) β-D-glucano	Sangre total Dos muestras semanales	Volumen: 2 ml	2-8 °C: < 6 h > 6 h: -20 °C
	Detección de antígeno de <i>Cryptococcus</i>	Látex en sangre, LCR, suero, orina y muestras respiratorias	Tubo rojo sin anticoagulante Volumen: 2-4 ml	A 4 °C: ≤ 5 d; > 5 d: -70 °C
Técnicas de sensibilidad antifúngica	Antifungigrama por CIM o E test	Cepa aislada	Placa de Petri o agar Sabouraud	T° ambiente: hasta una semana

Sensibilidad de hemocultivos para *Candida* es de 50-70%. Bact/ALERT es superior en la recuperación de *C. glabrata*. Sensibilidad de látex *Cryptococcus* cercana a 90%.

¹Nivel de requerimiento: deben estar disponibles en todos los hospitales que manejen estos pacientes. ²Si se sospecha de hongos filamentosos o dimórficos, es recomendable tomar hemocultivos en frascos de lisis centrifugación. (Contactar al laboratorio de microbiología por su disponibilidad). ³El volumen de sangre es la variable más importante en el rendimiento de cualquier hemocultivo. Una botella debe llevar un volumen máximo de 10 ml. ⁴Set de hemocultivos se refiere a dos botellas inoculadas con sangre obtenida desde la misma punción. En pacientes con catéter multilumen, idealmente tomar sangre de todos los lúmenes. Si no es posible, tomar muestras al lumen que más se emplea. ⁵Volumen de sangre recomendado para hemocultivos en niños:

Peso (kg)	Volemia total (ml)	Volumen de sangre recomendada para cultivo (ml)		Volumen total para cultivo (ml)	% de volemia
		Cultivo N° 1	Cultivo N° 2		
≤ 1	50-99	2 (frasco amarillo)		2	4
1,1-2	100-200	2 (frasco amarillo)	2 (frasco amarillo)	4	4
2,1-12	> 200	3-4 (frasco amarillo)	3-4 (frasco amarillo)	6-8	3
> 12-40	> 800	10 (frasco verde)	10 (frasco verde)	20	2,5
> 40	> 2.500	10-20 (1-2 frascos verde)	10-20 (1-2 frascos verde)	40	< 2

Diagnóstico de infecciones virales en el torrente sanguíneo¹

Agente	Técnicas diagnósticas	Muestra	Toma de muestra	Transporte
Citomegalovirus	RPC cuantitativa ² automatizado y ajustada con estándares de OMS	Plasma o sangre total, esta última es más sensible pero menos específica ³	Tubo con anticoagulante (EDTA) (tapa lila, tamaño adulto o pediátrico)	El plasma separado se puede transportar a 4 °C - 8 °C: < 3 días
Citomegalovirus genotipificación UL97 ⁴	Búsqueda del gen UL97 asociado a resistencia de CMV a ganciclovir	Sangre	Tubo con anticoagulante (EDTA). Tubo adulto o pediátrico	A 4 °C - 8 °C: < 3 días
Virus de Epstein Barr	RPC cualitativa/cuantitativa	Sangre	Tubo con anticoagulante (EDTA), tapa lila. Vol: 1-3 cc	A 4 °C - 8 °C: < 3 días
Adenovirus	RPC cualitativa/cuantitativa	Sangre	Tubo con anticoagulante (EDTA), tapa lila. Vol: 1-3 cc	A 4 °C - 8 °C: < 3 días



Virus BK	RPC cualitativa/cuantitativa	Sangre	Tubo con anticoagulante (EDTA), tapa lila. Vol: 1-3 cc	A 4 °C - 8 °C: < 3 días
Parvovirus B19	RPC cualitativa/cuantitativa	Sangre	Tubo con anticoagulante (EDTA), tapa lila. Vol: 1-3 cc	A 4 °C - 8 °C: < 3 días

¹Nivel de requerimiento: Cualquiera de estos exámenes tiene un nivel de requerimiento intermedio, es decir puede ser realizado en cada institución o puede ser enviado a un centro de referencia para su procesamiento. ²Valores de referencia: Depende del ensayo utilizado, lo importante es comparar valores con una misma técnica y observar los cambios de logaritmo de la cuantificación de las cargas virales. Por ejemplo, para los ensayos de RPC cuantificada de CMV un cambio significativo es de 0,75 log. ³La decisión de la muestra depende de cada centro, lo importante es que los pacientes se controlen siempre con la misma muestra y técnica. ⁴Debe solicitarse si la carga viral no desciende después de dos semanas de tratamiento antiviral bien llevado. UL97 es la mutación más frecuentemente encontrada asociada a resistencia a ganciclovir.

Diagnóstico de infecciones parasitarias en el torrente sanguíneo ¹				
Sospecha de parasitemia	Técnicas diagnósticas	Muestra	Toma de muestra	Transporte
<i>Plasmodium</i> spp	Frotis directo, gota gruesa IFI y ELISA plasmodium lactato deshidrogenasa (pLDH) <i>Histidin rich protein 2</i> (HRP2)	Sangre total	Tubo con EDTA (tubo de Coulter, tapa morada) o heparina (tapa verde) o sangre capilar obtenida en el laboratorio mediante punción del pulpejo del dedo	< 30 min, T° ambiente
	RPC	Sangre total	Tubo tapa lila con anticoagulante (EDTA)	A 4 °C: < 2-3 días
<i>Trypanosoma cruzi</i>	Frotis	Sangre total	Tubo con anticoagulante (2 ml)	A 4 °C: < 2 días ¹
	Gota gruesa	Sangre total	Tubo sin anticoagulante tomada por punción venosa o digital. 3 a 4 gotas por preparación. Vol: min. 2 ml	A 4 °C: < 2 días
	IFI, ELISA Western Blot	Suero, plasma	Tubo con anticoagulante (EDTA) Volumen: RN 2- 3 ml < 10 años: 5 ml. Adulto: 7-10 ml	A 4 °C: < 2 días
	RPC	Sangre total	Tubo con anticoagulante (EDTA) (tapa lila). Volumen: 2 ml	A 4 °C: < 2 días Protegido de la luz

¹Nivel de requerimiento: Puede ser enviado a centro de referencia. Instituto de Salud Pública. Transporte en tubo plástico con tapa hermética, con las medidas necesarias de bioseguridad

Tabla 2. Métodos de laboratorio para el diagnóstico de infecciones del sistema nervioso central (SNC)

Meningitis/meningoencefalitis bacteriana o fúngica ¹				
Agente	Técnicas diagnósticas	Muestra	Toma de muestra	Transporte
Bacterias	Tinción de Gram	LCR	Volumen mínimo 1 ml	De inmediato t° ambiente
	Cultivo corriente Detección de antígenos bacterianos (látex)	LCR	Recipiente estéril hermético Volumen mínimo 1 ml Recipiente estéril	De inmediato t° ambiente
Micobacterias	Baciloscopia Cultivo de Koch	LCR	Volumen mínimo 1 ml Tubo estéril hermético	De inmediato t° ambiente protegido de la luz
	Cultivo acelerado de micobacterias		Frasco estéril o frasco especial disponible en el laboratorio, previa preparación de la muestra (para tejido)	
	RPC tiempo real <i>Mycobacterium tuberculosis</i> con detección de resistencia a rifampicina		LCR para técnicas moleculares	
Hongos				
<i>Cryptococcus neoformans</i>	Tinta china	LCR	Volumen mínimo: 1 ml Tubo estéril hermético	Medidas necesarias de bioseguridad
	Detección de antígenos			T° a 4 °C

¹Nivel de requerimiento: deben estar disponibles en cada institución que maneje estos pacientes. Cultivo acelerado de micobacterias: Se requiere sistema automatizado de hemocultivos.



Meningoencefalitis de causa viral¹

Agente	Técnicas diagnósticas	Muestra	Toma de muestra	Transporte
Virus herpes simplex (VHS)*, enterovirus*, parechovirus*, virus varicela zoster*, citomegalovirus*, virus de Epstein Barr*, virus JC, herpes humano tipo 6 (VHH-6)	RPC en tiempo real	LCR	Tubo estéril con anticoagulante (EDTA) Tubo con medio de transporte universal (MTU) 1 ml	A 4 °C: 2-3 días
Coriomeningitis linfocítica (CML)	Detección de anticuerpos (IgM/IgG)	Suero	Tubo sin anticoagulante	T° ambiente de inmediato

¹Nivel de requerimiento: Cualquiera de estos exámenes tiene un nivel de requerimiento intermedio pudiendo ser enviado a un centro de referencia para su procesamiento.

*Observaciones: El diagnóstico de CMV, EBV, VZV y enterovirus se puede potenciar con la búsqueda del virus en sangre o plasma dependiendo del virus a estudiar.

Meningoencefalitis de causa parasitaria¹

Agente	Técnicas diagnósticas	Muestra	Toma de muestra	Transporte
<i>Acanthamoeba</i> spp	Aislamiento Cultivo Inmunofluorescencia (IFD) RPC	LCR Punción de absceso Biopsia de tejido cerebral	Siembra inmediata en agar no nutritivo con <i>Escherichia coli</i> Frasco estéril, tapa hermética	De inmediato T° ambiente A 4 °C: < 2 h
<i>Naegleria fowleri</i>	Biopsia Cultivo LCR RPC	LCR Punción de absceso Biopsia, LCR, tejido cerebral	Tejido cerebral Siembra inmediata en agar no nutritivo con <i>E. coli</i> Frasco estéril, tapa hermética	De inmediato T° ambiente A 4 °C: < 2 h
<i>Balamuthia mandrillaris</i>	Biopsia	Tejido	Frasco estéril tapa hermética	De inmediato T° ambiente
<i>Toxoplasma gondii</i>	Reacción de Sabin-Feldman Enzimo inmuno fluorescencia (ELFA) ELISA RPC	Suero LCR Punción de absceso Biopsia de tejido cerebral Sangre total LCR	Tubo sin anticoagulante Frasco estéril, tapa hermética Tubo con anticoagulante (EDTA) Frasco estéril, tapa hermética	T° ambiente: < 5 días A 4 °C: < 3 días

¹Nivel de requerimiento: Puede ser enviado a centro de referencia. Instituto de Salud Pública. Recomendación: contactar urgentemente con el responsable del laboratorio previo a toma de muestra.

Lesiones focales cerebrales¹

Agentes etiológicos	Técnicas diagnósticas	Muestras	Toma de muestra	Transporte
Bacterias	Tinción de Gram Cultivo corriente	Biopsia cerebral	Recipiente estéril sin preservantes, sólo solución salina fisiológica estéril	De inmediato T° ambiente
Hongos	Tinción calcoflúor-tinta china Cultivo hongos	Biopsia cerebral	Recipiente estéril sin preservantes, sólo solución salina fisiológica estéril	De inmediato T° ambiente
Virus	RPC	Biopsia cerebral	Recipiente estéril, refrigerada	A 4 °C: <2 h
Parásitos				
Cisticercosis	ELISA WB RPC Biopsia	Sangre, suero, tejido cerebral	Recipiente estéril sin preservantes, sólo solución salina fisiológica estéril	De inmediato T° ambiente
<i>Toxoplasma gondii</i>	RPC	Aspirado de tejido/absceso o biopsia	Recipiente estéril sin preservantes, sólo solución salina fisiológica estéril	De inmediato T° ambiente
Micobacterias	Baciloscopia Cultivo de Koch Cultivo acelerado de micobacterias RPC IGRAS (<i>Interferón gamma release assays</i>) Elispot/QuantiFERON	Biopsia cerebral Biopsia cerebral Sangre Sangre	Recipiente estéril sólo SF estéril, protegido de la luz Frasco seco y estéril, con solución salina fisiológica Recipiente estéril sin preservantes. Transporte Tres tubos con heparina de litio (adulto: 5 ml niños: 2 ml) 1 ml de sangre en tubo QuantiFERON	De inmediato Se puede refrigerar a 4 °C De inmediato 4 °C: > 1 h De inmediato > 1 h: 4 °C A 4 °C: > 1 h T° ambiente: < 16 h A 4 °C: > 16 h

¹Nivel de requerimiento: en cada institución o centro de referencia. Se recomienda separar en el procedimiento las muestras a enviar a los laboratorios microbiológicos de las que se procesarán en Anatomía Patológica.



Tabla 3. Métodos de laboratorio para el diagnóstico de infecciones del tracto respiratorio

Infecciones del tracto respiratorio superior				
Faringoamigdalitis ¹				
Agentes etiológicos	Técnicas diagnósticas	Muestras	Toma de muestra	Transporte
Bacterias				
Bacterias	Tinción de Gram Cultivo corriente Inmunocromatografía	Secreción faríngea Secreción faríngea	Tórula de algodón y medio de transporte Stuart Tórula de rayón tubo estéril	T° ambiente: < 1 h T° ambiente: < 1 h
Virus				
Adenovirus	RPC ² IFD	Hisopado faríngeo Aspirado nasofaríngeo	Tubo de polipropileno con PBS Tórula nasofaríngea en medio de transporte universal para virus o PBS	De inmediato: a 4 °C
Virus de Epstein Barr	VCA IgM ³	Suero	Tubo sin anticoagulante	T° ambiente: < 3 h
Enterovirus	RPC	Hisopado faríngeo o nasofaríngeo	Medio de transporte universal para virus o PBS	De inmediato a 4 °C (2-3 días)
¹ Nivel de requerimiento: debe estar disponible en cada institución o centro de referencia. ² Adenovirus: Preferir RPC por su mejor sensibilidad. ³ VCA IgM VEB: Considerar en la interpretación que la ausencia de IgM positiva no descarta el diagnóstico en un paciente con inmunosupresión.				
Sinusitis ¹				
Agentes etiológicos	Técnicas diagnósticas	Muestras	Toma de muestra	Transporte
Bacterias	Tinción de Gram Cultivo corriente	Muestra ideal: punción de seno paranasal Secreción nasal mediante rinoscopia ²	Secreción en tubo estéril Tórula fina de rayón en la zona del meato	De inmediato, T° ambiente De inmediato, T° ambiente
Hongos	Tinción de calcoflúor-KOH; Cultivo	Aspirado por punción/biopsia/tejido	Contenedor aeróbico estéril. Tapa rosca	De inmediato, T° ambiente
Virus				
VRS, ADV, influenza A/B, parainfluenza, rinovirus, metapneumovirus, coronavirus	RPC multiplex Inmunofluorescencia (IFD)	Aspirado sinusal hisopado nasal o nasofaríngeo	Medio de transporte universal-PBS	De inmediato a 4 °C
¹ Nivel de requerimiento: debe estar disponible en cada institución o centro de referencia. ² El estudio de secreción nasal mediante torulado simple, no es útil para diagnóstico etiológico de sinusitis. Útil sólo para estudio de portación de patógenos. La toma de muestra con rinoscopia, realizada por ORL, debe intentar obtener la muestra directamente con tórula fina de rayón desde la zona de meato donde se produce la descarga de la secreción. No tocar paredes de las fosas nasales al retirar la tórula.				
Infecciones del tracto respiratorio inferior: Neumonía (patrón focal)				
Bacterias y hongos ¹				
Agentes etiológicos	Técnicas diagnósticas	Muestras	Toma de muestra	Transporte
Bacterias	Tinción de Gram y cultivo	Expectoración Aspirado endotraqueal Lavado bronquio-alveolar (LBA)	Recipiente estéril, boca ancha y cierre hermético No diluir muestra. Recipiente estéril Solución salina fisiológica área alveolar. Recipiente estéril	De inmediato T° ambiente
	Antígeno urinario de <i>Legionella</i> sp	Orina 2° chorro Ideal primera orina de la mañana	Frasco con tapa hermética, mínimo 2 ml	De inmediato T° ambiente
	Antígeno urinario de <i>S. pneumoniae</i>	Orina 2° chorro	Frasco con tapa hermética, min 2 ml	De inmediato T° ambiente



Hongos

<i>Pneumocystis jirovecii</i>	IFD	Expectoración, esputo inducido o LBA	Tubo estéril (estándar de oro por sobre las tinciones)	Tº ambiente: < 2 h 4 ºC: si > 2 h a 7 días	
	RPC	Sangre LBA Aspirado endotraqueal nasofaríngeo gárgara o expectoración inducida	Tubo con anticoagulante (EDTA) 3 ml Tubo estéril con medio UTM	4 ºC: > 2 h a 3 días	
	Tinciones citológicas	LBA	Tubo tapa rosca estéril	Tº ambiente: > 2 h a 14 días	
	Histología	Tejido/biopsia	Contenedor con formalina (5 ml)	Si > 2 h a 14 días Tº ambiente	
<i>Aspergillus spp</i>	Tinción KOH con calcoflúor; otras tinciones para hongos	Aspirado endotraqueal	Tubo estéril con tapa rosca	Tº ambiente: < 2 h 4 ºC: 2-24 h	
	Cultivo hongos	LBA, muestras con cepillo protegido	Tubo estéril con tapa rosca	Tº ambiente: < 2 h	
	Histología	Tejido pulmonar	Contenedor con formalina	Tº ambiente: < 2 h	
	Galactomanano	Suero, LBA	Tubo estéril	4 ºC: ≤ 5 d; > 5 d: -70 ºC	
	β-D glucano	Suero, LBA	Tubo o frasco estéril	Tº ambiente: < 2 h; 4 ºC: > 2–24 h	
	RPC	LBA	Frasco estéril con tapa rosca	Tº ambiente: < 2 h	
	<i>Cryptococcus neoformans</i>	Calcoflúor-KOH u otra tinción para hongos Cultivo para hongos	Esputo expectorado o inducido, LBA	Tubo estéril con tapa rosca	Tº ambiente: < 2 h 4 ºC > 2-24 h
		Test de antígeno	Suero, 1 ml	Tubo estéril (3 ml)	Tº ambiente: < 1 h 4ºC: > 2-24 h
Histología		Tejido/biopsia	Frasco con formalina	Tº ambiente: antes de 2 h, 4 ºC: > 2-24 h	
<i>Fusarium spp</i>	Calcoflúor-KOH u otra tinción para hongos Cultivo para hongos	Esputo expectorado, esputo inducido	Tubo estéril	Tº ambiente, antes de 2 h, 4ºC > 2-24 h	
	Histología	LBA		Tº ambiente: < 2 h	
	Tinciones específicas	Tejido pulmonar	Frasco con formalina	4 ºC: si 2-14 d	
	Hemocultivo para hongos	Sangre	Frasco de hemocultivo aeróbico o tubo de lisis-centrifugación	Tº ambiente: < 4 h	
	Agentes de mucormicosis: <i>Rhizopus</i> , <i>Mucor</i> , <i>Absidia spp</i>	Calcoflúor-KOH u otra tinción para hongos Cultivo para hongos	Esputo expectorado, esputo inducido LBA, tejido pulmonar	Tubo estéril con tapa rosca	Tº ambiente: < 2 h 4 ºC: > 2-24 h
		<i>Pseudoallescheria boydii</i>	Cultivo para hongos	Esputo inducido LBA, tejido pulmonar	Tubo estéril con tapa rosca
<i>Histoplasma capsulatum</i>	Calcoflúor-KOH u otra tinción para hongos	Esputo expectorado	Tubo estéril con tapa rosca	Tº ambiente: < 2 h 4 ºC: > 2-24 h	
	Cultivo para hongos	LBA, tejido pulmonar	Tubo estéril con tapa rosca	Tº ambiente: < 2 h	
	Hemocultivos para hongos	Sangre	Frasco de hemocultivo aeróbico o tubo de lisis-centrifugación	Tº ambiente: < 2 h	
	Test de antígeno	Suero, orina, LBA, líquido pleural	Tubo estéril con tapa rosca (2 ml)	Tº ambiente: 4 h	
	Serología	Suero	Tubo sin anticoagulante (3-5 ml)	Tº ambiente: 2 días; 4 ºC: 2-14 días	



<i>Coccidioides</i> spp	Calcoflúor-KOH Cultivo para hongos	Espujo expectorado o inducido, LBA, tejido pulmonar	Tubo estéril	T° ambiente: < 2 h
	IgM e IgG	Suero	Tubo sin anticoagulante (3-5 ml)	T° ambiente: 2 d; 4 °C: 2-14 d
Otros hongos endémicos	Calcoflúor-KOH u otra tinción para hongos	Espujo, espujo inducido LBA, tejido pulmonar	Tubo estéril tapa rosca	T° ambiente: < 2 h 4 °C: > 2-24 h
	Test de antígeno (<i>Blastomyces</i>)	Suero Orina, LBA, líquido pleural	Tubo sin anticoagulante tapa rosca Contenedor estéril	T° ambiente: 2 d a 4 °C: 2-14 d

¹Nivel de requerimiento: en consideración a la frecuencia e importancia de un rápido diagnóstico diferencial es aconsejable tener disponibilidad de la mayor parte de los ensayos en cada institución y enviar a un centro de referencia aquellos que sean de incidencia menor. Comentarios: Bacterias: Obtener en forma ideal la primera expectoración de la mañana, previo enjuague bucal con agua y retiro de prótesis si existe. Nebulizar y aplicar KNT en caso de no conseguir secreciones. Gram directo orienta a la calidad de la muestra: Células epiteliales < 10/campo y PMN > 25/campo con predominio de una morfología bacteriana, es una buena muestra. Ag urinarios: Ideal primera orina de la mañana por mayor concentración de antígenos bacterianos. Antígeno urinario de *S. pneumoniae* tiene falsos positivos, con mayor frecuencia, en niños por alta tasa de colonización. Antígeno urinario de *Legionella* sólo detecta *Legionella pneumophila* serotipo 1. Hongos: El hallazgo de hongos filamentosos en pacientes con infección fúngica invasora o neutropenia febril debe sugerir el compromiso pulmonar por estos agentes. El hallazgo de levaduras debe interpretarse como contaminante de la microbiota normal hasta que se demuestre una enfermedad invasora. Virus: La interpretación de resultados de RPC únicos o múltiples debe considerar el diagnóstico de base del paciente, dado que, en pacientes inmunocomprometidos, la excreción viral puede ser prolongada.

Neumonía (patrón focal)

Parásitos y micobacterias¹

Agentes etiológicos	Técnicas diagnósticas	Muestras	Toma de muestra	Transporte
Parásitos <i>Echinococcus granulosus</i>	Estudio macroscópico y microscópico del quiste	Vómita, material quirúrgico de quiste, biopsia pulmonar	Frasco estéril tapa rosca	T° ambiente: < 2 h a 4 °C: 3 d
	Hemaglutinación indirecta (HAI), IFI, ELISA, WB, RPC	Sangre, suero	Tubo sin anticoagulante	T° ambiente: < 2 h a 4 °C: 3 d
Micobacterias	Baciloscopia	Expectoración	Tres muestras protegidas de la luz	T° ambiente: < 2 h, puede refrigerarse a 4 °C
	Cultivo de Koch	Aspirado endotraqueal (AET) cuantitativo, LBA	Recipiente estéril solución salina fisiológica estéril, protegido de la luz	T° ambiente: < 2 h; a 4 °C: 3
	Cultivo acelerado de micobacterias	Expectoración AET cuantitativo LBA	Frasco seco y estéril, con solución salina fisiológica, protegidas de la luz	De inmediato, T° ambiente: puede refrigerarse a 4 °C
	RPC	Expectoración AET cuantitativo LBA	Frasco seco y estéril, con solución salina fisiológica	T° ambiente: < 2 h > 2 h, 4 °C
	IGRAS: (<i>Interferon gama release assay</i>)	Sangre total	Tres tubos de con heparina de litio (adulto: 5 ml niños: 2 ml) (Elispot)	Refrigerar a 4 °C
	(Elispot/QuantiFERON)		1 ml tubo QuantiFERON	T° ambiente, a 4 °C: < 16 h

¹Nivel de requerimiento: debe estar disponible en cada institución o centro de referencia.

Neumonitis (patrón intersticial-difuso)

Bacterias, micobacterias, hongos¹

Agentes etiológicos	Técnicas diagnósticas	Muestras	Toma de muestra	Transporte
Bacterias	Tinción de Gram Cultivo corriente	Expectoración	Recipiente estéril, boca ancha y cierre hermético	De inmediato T° ambiental
		Calidad de la muestra: células epiteliales < 10 x campo y PMN > 25 x campo		
		Secreción traqueal LBA	No diluir muestra. Recipiente estéril Solución salina fisiológica Recipiente estéril	



	Serología de <i>Chlamydia</i> Detección de IgG e IgM <i>Chlamydia pneumoniae</i> , <i>C. psittaci</i> , <i>C. trachomatis</i>	Sangre (suero)	Tubo sin anticoagulante	T° ambiente: < 3 h
	Serología <i>Mycoplasma pneumoniae</i> IgG e IgM	Sangre (suero)	Tubo sin anticoagulante	T° ambiente: < 3 h
Micobacterias	Baciloscopia Cultivo de Koch	Expectoración	Recipiente estéril, boca ancha y cierre hermético	De inmediato T° ambiente
		AET cuantitativo	No diluir la muestra. Recipiente estéril	
		LBA	Solución salina fisiológica área alveolar. Recipiente estéril	1 h a 21 °C < 1 días a 4 °C
Hongos				
<i>Pneumocystis jirovecii</i>	IFD RPC	Expectoración, esputo inducido o LBA, gárgaras	Tubo estéril	T° ambiente: < 2 h a 4 °C: > 2 h a 7 días
	Histología Tinciones citológicas	LBA, tejido	Contenedor con formalina si se transportará de 2 h a 14 días	
<i>Aspergillus</i> spp	Tinción KOH con calcoflúor Cultivo de hongos	AET-LBA, muestras con cepillo protegido	Tubo estéril AET-LBA, muestras con cepillo protegido	T° ambiente: < 2 h a 4 °C: > 2-24 h
	Histologia	Biopsia: tejido pulmonar	Frasco con formalina	T° ambiente: < 2 h a 4 °C: > 2-24 h
	Galactomanano	LBA, solución salina fisiológica	Tubo estéril	A 4 °C: ≤ 5 d -70 °C: > 5 d
<i>Cryptococcus neoformans</i>	β-D glucano	Suero LBA	Tubo sin anticoagulante Frasco estéril	T° ambiente: < 2 h a 4 °C: > 2 h-24 h
	Tinción KOH con calcoflúor Cultivo de hongos	AET-LBA, muestras con cepillo protegido Solución salina fisiológica (1 ml)	Tubo estéril	T° ambiente: < 2 h a 4 °C: > 2 h-7 d
	Test de antígeno para <i>Cryptococcus</i> sp		Tubo estéril	T° ambiente: < 2 h a 4 °C: > 2-24 h
	Histología: tinción	Biopsia: tejido pulmonar	Frasco con formalina	T° ambiente: < 2 h a 4 °C: > 2-24 h
<i>Fusarium</i> spp	Hemocultivo	Sangre	Frasco de hemocultivo aeróbico o tubo de lisis-centrifugación	T° ambiente: < 4 h
	Calcoflúor-KOH u otra tinción para hongos Cultivo para hongos	Aspirado endotraqueal LBA, muestras con cepillo protegido	Tubo estéril	T° ambiente: < 2 h a 4 °C: > 2-24 h
	Histología: tinción	Biopsia: tejido pulmonar	Frasco con formalina	T° ambiente: 2-14 d
Agentes de mucormicosis: <i>Rhizopus</i> , <i>Mucor</i> , <i>Absidia</i> spp	Tinción KOH con calcoflúor; Cultivo de hongos	AET-LBA, muestras con cepillo protegido	Tubo estéril	T° ambiente: < 2 h
	Histología: tinción	Biopsia: tejido pulmonar	Recipiente con formalina	T° ambiente: entre 2-14 d
<i>Histoplasma capsulatum</i>	Tinción de calcoflúor-KOH Cultivo para hongos	Esputo inducido, AET-LBA, Tejido pulmonar	Tubo estéril	T° ambiente: < 2 h a 4 °C: > 2-24 h
	Hemocultivos	Sangre	Frasco de cultivo aeróbico o tubo de lisis-centrifugación	T° ambiente: < 4 h
	Test de antígeno	Suero, orina, LBA, líquido pleural	Clot tube	T° ambiente: < 2 d a 4 °C: > 2-14 días
<i>Coccidioides</i> spp	Tinción calcoflúor - KOH Cultivo para hongos	Esputo expectorado o inducido LBA, Tejido	Tubo estéril	T° ambiente: de inmediato
	IgM e IgG	Suero	Tubo sin anticoagulante	T° ambiente: 2 días a 4 °C: 2-14 d



Otros hongos endémicos	Tinción de calcoflúor-KOH Cultivo hongos	Espujo expectorado o inducido Tejido pulmonar, suero, orina, LBA, Líquido pleural	Tubo estéril	T° ambiente: < 2 h a 4 °C: > 2-24 h
	Antígeno (<i>Blastomyces</i>)	Sangre (suero)	Tubo sin anticoagulante	T° ambiente: 2 días a 4 °C: 2-14 d

Nivel de requerimiento: en consideración a la frecuencia e importancia de un rápido diagnóstico diferencial es aconsejable tener disponibilidad de la mayor parte de los ensayos en cada institución y enviar a un centro de referencia aquellos que sean de incidencia menor.

Tabla 4. Métodos de laboratorio para el diagnóstico de infecciones del tracto digestivo

Úlceras esofágicas ¹				
Agentes etiológicos	Técnicas diagnósticas	Muestras	Toma de muestra	Transporte
Bacterias	Tinción de Gram Cultivo	Biopsia de la lesión	Recipiente estéril, tapa hermética con solución salina fisiológica estéril	De inmediato T° ambiente
Virus Virus herpes simplex Citomegalovirus	RPC-TR, cultivo viral	Biopsia de tejido	Medio de transporte universal viral	A 4 °C: < 3 días
Hongos <i>Candida</i> spp	Tinción de calcoflúor-KOH Cultivo hongos	Tórula/biopsia de la lesión	Recipiente estéril, tapa hermética con solución salina fisiológica estéril	De inmediato T° ambiente
	RPC	Tórula/biopsia de la lesión	Recipiente estéril, tapa hermética con solución salina fisiológica estéril	A 4-8 °C: < 3 d
	Histología	Biopsia de la lesión	Recipiente con formalina	T° ambiente
Micobacterias	Histología, inmunohistoquímica	Biopsia de la lesión	Recipiente con formalina	T° ambiente
	RPC	Biopsia de la lesión	Frasco estéril, seco	T° ambiente: < 2 h a 4 °C: > 2 h

¹Nivel de requerimiento: deben estar disponibles en cada institución o con derivación rápida a un centro de referencia.

Síndrome diarreico agudo ¹				
Agentes etiológicos	Técnicas diagnósticas	Muestras	Toma de muestra	Transporte
Bacterias	Coprocultivo	Deposiciones	Recipiente limpio o tórula rectal Elegir zona con pus o sangre para observar al microscopio	De inmediato
<i>Salmonella</i> spp, <i>Shigella</i> spp, <i>Yersinia</i> spp, <i>Campylobacter</i> spp, <i>Vibrio</i> spp, <i>Aeromonas</i> spp, <i>Plesiomonas</i> spp, <i>Escherichia coli</i> diarreogénicas	RPC (por ej.: <i>Filmarray-Biofire</i>)*		Recipiente estéril o en medio <i>Cary Blair</i>	
<i>Campylobacter</i> spp	Tinción de Hucker Detección de Shiga-toxina	Deposiciones Deposiciones	Recipiente estéril o en medio <i>Cary Blair</i> Recipiente estéril	De inmediato De inmediato
<i>Clostridioides difficile</i>	Detección de toxina A/B y glu- tamato deshidrogenasa (GDH)	Deposiciones líquidas	Recipiente estéril hermético	De inmediato
	RPC	Deposiciones líquidas	Recipiente estéril hermético	A 4 °C: 2 días
Rotavirus, adenovirus entérico, norovirus, astrovirus	RPC Inmunocromatografía	Deposición	Frasco limpio hermético	De inmediato

¹Nivel de requerimiento: deben estar disponibles en cada institución, pudiendo derivar a un centro de referencia los ensayos de biología molecular. *Determina los siguientes microorganismos: Bacterias: *E. coli* enterotoxigénica, *E. coli* enteropatogénica, *E. coli* enteroagregativa, *E. coli* productora de toxina tipo Shiga stx1/stx2 (incluida la identificación específica del serogrupo O157), *Shigella-E. coli* enteroinvasora-Salmonella, *Campylobacter* (*jejuni/coli/upsaliensis*), *Vibrio* (*parahaemolyticus/vulnificus/cholerae*) con identificación específica de *V. cholerae*-Y. enterocolitica, *Plesiomonas shigelloides*, *C. difficile* (toxinas A/B), Parásitos: *Cryptosporidium*, *Cyclospora cayentanensis*, *E. histolytica*, *G. lamblia*, Virus: adenovirus F40/41, astrovirus, norovirus GI/GII, rotavirus A, sapovirus (genogrupos I, II, III y IV).



Estudio de parasitosis intestinal en diarrea aguda¹

Agentes etiológicos	Técnicas diagnósticas	Muestras	Toma de muestra	Transporte
<i>Entamoeba histolytica</i>	Tinción Giemsa-tricrómica	Deposición (5 g)	Parasitológico seriado (PSD) con fijador PAF, SAF o PBA	T° ambiente: < 24 h
	HAI, ELISA, IFI	Suero	Tubo sin anticoagulante	
	RPC	Tejido		
<i>Blastocystis hominis</i>	Tinción Giemsa-tricrómica, hematoxilina férrica	Deposición	Parasitológico seriado (PSD) con fijador PAF, SAF o PBA	T° ambiente: < 24 h
<i>Giardia lamblia</i>	Ac monoclonales, IFI, RPC,	Deposición	Parasitológico seriado (PSD) con fijador PAF, SAF o PBA	T° ambiente: < 24 h
	Inmunocromatografía	Líquido duodenal	Tubo con anticoagulante 10 cc	T° ambiente: < 4 h
<i>Strongyloides stercoralis</i>	Método Baermann-Moraes	Deposición	PSD con fijador PAF, SAF o PBA, coproparasitológico	T° ambiente: < 24 h
	Cultivo en placa de agar no nutritivo con <i>Escherichia coli</i>			
	Enterotest, ELISA, WB	Líquido duodenal	Tubo con anticoagulante 10 cc	T° ambiente: < 4 h
<i>Cryptosporidium</i> spp	RPC	Sangre	Suero en tubo con EDTA	T° ambiente: < 4 h
	Tinción de Ziehl Neelsen, Kinyoun, safranina y tricrómica	Deposición	PSD método de concentración	T° ambiente: < 24 h
<i>Cyclospora</i> spp	Técnica de Richter	Biopsia intestinal		
	IFD, ELISA, inmunocromatografía, RPC cultivo			
<i>Cyclospora</i> spp	Tinción de Ziehl Neelsen, Kinyoun, fucsina básica y safranina, fluorescencia bajo luz UV	Deposición	PSD método de concentración	T° ambiente: < 24 h
<i>Cystoisospora</i> spp	Tinción de Ziehl Neelsen Kinyoun, y safranina	Deposición	10 muestras PSD método de concentración	T° ambiente: < 24 h
	IFI, técnica de flotación, RPC	Biopsia intestino delgado		
<i>Microsporidia</i> spp	Tinción cromotropo 2R, Kinyoun	Deposición	PSD método de concentración	T° ambiente: < 24 h
	Calcoflúor, IFD	Biopsia		
<i>Schistosoma</i> spp	Sedimentación espontánea en deposiciones	Deposición	PSD con fijador PAF	T° ambiente: < 24 h
	Coproparasitológico de Kato-Katz, IFI, ELISA, WB,	Sangre	Tubo con anticoagulante (EDTA), suero	T° ambiente: < 4 h
	Biopsia	Biopsia de recto	Tubo hermético estéril	T° ambiente: < 24 h

¹Nivel de requerimiento: pueden ser enviados a centro de referencia como ISP.



Tabla 5. Métodos de laboratorio para el diagnóstico de infecciones del tracto urinario

Cistitis y pielonefritis ¹				
Agentes etiológicos	Técnicas diagnósticas	Muestras	Toma de muestra	Transporte
Bacterias	Orina completa Urocultivo	Segundo chorro	Previo aseo genital Ideal: primera orina de la mañana Si hay sonda Foley <i>in situ</i> : desinfectar una zona y puncionar. No pinzar la sonda	T° ambiente: < 2 h A 4 °C: < 24 h
Hongos <i>Candida</i> spp	Tinción de calcoflúor Cultivo de hongos	Urocultivo	Orina de 2° chorro	T° ambiente: < 1 día
	Hemocultivos	Sangre	Frasco de hemocultivo	T° ambiente: < 1 h
	RPC	Sangre	Tubo con anticoagulante (EDTA)	A 4 °C: < 3 días
Virus* ADV BK	RPC	Orina Sangre	Frasco estéril Tubo con anticoagulante	A 4 °C: < 3 días A 4 °C: < 3 días

¹Nivel de requerimiento: técnicas para diagnóstico de bacterias y hongos deben estar disponibles en cada institución. Técnicas de diagnóstico virológico pueden ser derivadas a centro de referencia. Comentarios: No forzar la diuresis con ingesta de líquidos pues diluye la muestra. Indicar siempre en la solicitud el método de obtención de la muestra de orina para el correcto procesamiento de esta: 2° chorro, desde sonda Foley. Si la sonda Foley lleva más de 7 días, tomar la muestra habiendo cambiado previamente la sonda. La toma de cultivos desde la sonda Foley puede generar colonización de ésta en pocas horas. *La pesquisa del genoma viral en orina para ambos virus debe complementarse con un examen de RPC en sangre en pacientes con TPH.

Tabla 6. Métodos de laboratorio para el diagnóstico de infección de piel y tejidos blandos¹

Agentes etiológicos	Técnicas diagnósticas	Muestras	Toma de muestra	Transporte
Bacterias	Tinción de Gram y cultivo corriente	Secreción Trozo de tejido (biopsia cutánea) Tórula (ver comentarios)	Jeringa Frasco hermético estéril con solución salina fisiológica estéril En medio Stuart	T° ambiente: < 1 h
Hongos <i>Scedosporium</i> spp <i>Pseudoallescheria</i> spp <i>Exophiala</i> spp <i>Cladosporium</i> spp <i>Phialophora</i> spp <i>Alternaria</i> spp <i>Biolaris</i> spp	Cultivo hongos Tinción KOH Histopatología	Tejido/biopsia/aspirado Biopsia tejido	Tubo estéril en condiciones aeróbicas Recipiente con formalina	T° ambiente: < 2 h T° ambiente: 2 h-24 h
Hongos dimórficos <i>Histoplasma capsulatum</i> <i>Blastomyces dermatitidis</i> <i>Coccidioides immitis</i> ²	Antígeno urinario (<i>Histoplasma</i> ; <i>Blastomyces</i>) IgM (ELISA o IMDF), IgG (FC) Hemocultivo Prueba de intradermo-reacción con coccidioidina (IDC) Histopatología	Orina Suero Sangre: 2 sets Inoculación en piel Tejido/biopsia/aspirado	Recipiente limpio hermético Tubo estéril sin anticoagulante Frasco de hemocultivo Frasco estéril hermético	T° ambiente: < 2 h De inmediato T° ambiente De inmediato T° ambiente T° ambiente: < 2 h



<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	Cultivo, tinción de hidróxido de potasio, calcoflúor, IF	Espudo, LBA, costras, úlceras, nódulo linfático, LCR o biopsias y tejido	Frasco estéril hermético	Tº ambiente: 2 h-24 h
	Hemocultivo	Sangre: dos sets	Frasco de hemocultivo	De inmediato Tº ambiente
	IgM, IgG (ID), (FC) y ELISA	Sangre	Clot tube, con anticoagulante (EDTA)	Tº ambiente: a 4 °C: > 2 h
	Histología	Tejido/biopsia/aspirado	Recipiente con formalina	Tº ambiente: < 24 h
<i>Penicillium marneffe</i>	Cultivo, tinción	Tejido, biopsia, aspirado, sangre	Recipiente estéril hermético	De inmediato Tº ambiente
	Antígeno en orina (ELISA)	Orina	Frasco limpio hermético	De inmediato Tº ambiente
	Detección de antígenos (ELISA) RPC	Tejido, biopsia, aspirado	Recipiente estéril hermético	A 4 °C: > 2 h-3 días
	Histología	Tejido, biopsia, aspirado	Recipiente con formalina	Tº ambiente: < 24 h
<i>Sporotrix schenckii</i>	Cultivo	Lesión, nódulo cutáneo, LBA, tejidos, LCR	Frasco estéril hermético	De inmediato Tº ambiente,
	IgM, IgG (aglutinación IMDF)	Suero	Clot tube, con anticoagulante (EDTA)	Tº ambiente A 4 °C: > 2 h-24 h
	Prueba de intradermoreacción con coccidioidina (IDC)	Piel	Induración de 5 mm > 24 h	
	Histopatología	Tejido, biopsia, aspirado	Frasco estéril hermético	Tº ambiente: < 2 h
<i>Candida</i> spp	Cultivo hongos. Tinción	Tejido, biopsia, aspirado, orina	Frasco estéril hermético	Tº ambiente: < 2 h
	Hemocultivo Ag/Ac Cándida	Sangre	Frasco hemocultivos	Tº ambiente: < 2 h
	β-D-glucano RPC	Sangre	Tubo con anticoagulante (EDTA)	A 4 °C: < 3 días
	Histología	Tejido/biopsia	Recipiente con formalina	Tº ambiente: < 24 h
<i>Cryptococcus neoformans</i>	Tinta china, látex, Hemocultivo	Sangre; 2 sets	Botellas de hemocultivo o con lisis centrifugación	Tº ambiente: < 2 h
	Cultivo, tinción	Tejido, biopsia, aspirado, secreción, LCR	Recipiente estéril hermético	Tº ambiente De inmediato
	Histopatología	Tejido, biopsia, aspirado	Contenedor con formalina	Tº ambiente: 2 h-24 h
<i>Trichosporon</i> spp <i>Geotrichum</i> spp <i>Malassezia</i> spp	Histopatología	Tejido, biopsia, aspirado	Contenedor con formalina	Tº ambiente: 2 h-24 h
<i>Fusarium</i> spp	Hemocultivos	Sangre; 2 sets (sólo <i>Fusarium</i>)	Frasco hemocultivos	Tº ambiente De inmediato
	Cultivo, tinción	Tejido, biopsia, aspirado, secreción, LCR	Recipiente estéril hermético	Tº ambiente De inmediato
	Histopatología	Tejido, biopsia, aspirado	Contenedor con formalina	Tº ambiente: 2 h-24 h
Agentes de mucormicosis	Cultivo, tinción	Tejido, biopsia, aspirado, secreción	Recipiente estéril hermético	Tº ambiente De inmediato
	Histopatología	Tejido, biopsia, aspirado	Contenedor con formalina	Tº ambiente: 2 h-24 h
Virus VHS 1-2, VZV, enterovirus	RPC IFD	Lesión de piel, biopsia de piel	Escoger la lesión más nueva en evolución Raspado de la base de la lesión vesicular o úlcera	De inmediato A 4 °C: < 2 h

¹Nivel de requerimiento: debe estar disponible en cada institución y los ensayos de mayor complejidad derivados a un centro de referencia. Comentarios: La muestra de mejor rendimiento es aquella que corresponde a un fragmento de tejido. Las muestras de menor rendimiento son los torulados, por lo que se recomienda poner la tórula en medio de transporte Stuart. Las características clínicas pueden orientar en la solicitud del mejor análisis; sin embargo, en inmunosupresión los cuadros clínicos clásicos pueden modificarse. ²*Coccidioides* spp. es un hongo potencialmente letal y de manejo riesgoso para el laboratorio. Las AC forman aerosoles infectantes muy fácilmente; por ello, los cultivos deben ser manejados dentro de una campana de flujo laminar con presión negativa, con nivel de bioseguridad estricto 2 con prácticas de 3.

Tabla 7. Métodos de laboratorio para el diagnóstico de infecciones oculares¹

Queratitis				
Agentes etiológicos	Técnicas diagnósticas	Muestras	Toma de muestra	Transporte
Bacterias	Tinción de Gram Cultivo corriente	Secreción conjuntival	Tórula fina desde ángulo externo al interno del ojo; ambos ojos	De inmediato T° ambiente
	Cultivo: siembra directa en cuña en placas de agar sangre, chocolate y McConkey	Raspado corneal	Procedimiento quirúrgico	De inmediato T° ambiente
Virus				
Virus herpes simplex	RPC, IFD, cultivo viral	Hisopado corneal	Tórula en medio de transporte viral	De inmediato a 4 °C
Adenovirus	RPC	Hisopado conjuntival	Tórula en medio de transporte viral	De inmediato a 4 °C
Parásitos				
<i>Acanthamoeba</i> spp	Calcoflúor, tinción Giemsa, Inmunoperoxidasa, cultivo	Raspado o hisopado corneal	Cultivo de lente de contacto en agar no nutritivo con <i>Escherichia coli</i>	De inmediato T° ambiente
Endoftalmitis				
Agentes etiológicos	Técnicas diagnósticas	Muestras	Toma de muestra	Transporte
Bacterias	Tinción de Gram Cultivo corriente	Líquido intraocular	Tórula de rayón con medio de transporte Stuart	De inmediato T° ambiente
Hongos	Tinción KOH, calcoflúor Cultivo	Líquido intraocular	Recipiente estéril hermético, tórula	De inmediato T° ambiente
Virus				
Citomegalovirus (Retinitis)	RPC	Humor vítreo	Medio de transporte viral o tubo estéril	De inmediato refrigerado a 4 °C

¹Nivel de requerimiento: debe estar disponible en cada institución y los ensayos de mayor complejidad serán enviados a centro de referencia. Comentarios: las muestras más invasoras deben ser tomadas por oftalmólogo en pabellón, ideal aspirar con jeringa.

Tabla 8. Métodos de laboratorio para el cribado de algunas enfermedades infecciosas de importancia en trasplante precursores hematopoyéticos^{1 (25,26)}

Agente etiológico	Estudio del donante (vivo o cadáver)	Estudio del receptor	Muestra	Comentarios
Bacterias				
<i>Treponema pallidum</i>	RPR (VDRL)	RPR (VDRL)	Suero Tubo sin anticoagulante	
Virus				
CMV, VEB, VZV, VHS 1-2, VHH6, HTLV 1, VIH	IgG, IgM	IgG, M	Suero Tubo sin anticoagulante	Disponible en la mayoría de los centros hospitalarios e ISP
Hepatitis B	HBsAg, anti-core HB	HBsAg, anti-core HB	Suero Tubo sin anticoagulante	Disponible en bancos de sangre e ISP
Hepatitis C	Anti-HepC	Anti-HepC	Suero Tubo sin anticoagulante	Disponible en bancos de sangre e ISP
VIH	ELISA VIH	ELISA VIH	Sangre Tubo con anticoagulante	Usar ensayo de 4ª generación
Parásitos				
<i>Toxoplasma gondii</i>	Reacción de Sabin-Feldman Serología (ELFA) o (ELISA)	Reacción de Sabin-Feldman Serología (ELFA) o (ELISA)	Suero Sangre con anticoagulante (EDTA)	Donante cadáver: serología en líquido pericárdico IFI, ELISA
<i>Trypanosoma cruzi</i>	IFI RPC RPC IFI ELISA	IFI RPC RPC IFI ELISA	Suero Sangre con anticoagulante (EDTA)	Donante cadáver: serología o RPC en líquido pericárdico IFI, ELISA, RPC

¹Nivel de requerimiento: deben estar disponibles en los centros que manejen estos pacientes.


Tabla 9. Métodos morfológicos, inmunohistoquímicos, ultraestructurales y moleculares disponibles en el diagnóstico de enfermedades infecciosas
Técnicas morfológicas diferenciales

Tinción de Gram para tejidos	Aporta en diagnóstico diferencial de Eubacterias, Actinomycetales, hongos y algunos protozoos, y tinción de Jiménez para <i>Chlamydia</i> sp, rickettsia y <i>Legionella</i> sp
Técnicas ácido-alcohol resistentes	Tinciones de fucsina por ej.: ácido: Ziehl-Neelsen, Kinyoun para micobacterias, <i>Nocardia</i> sp, <i>Legionella</i> sp, esporas micóticas, criptosporidios, microsporidios, algunas estructuras parasitarias y tinción con auramina-rodamina para micobacterias
Técnicas de azul	Giemsa, May-Grunwald, Wright, etc., para visualizar protozoos intracelulares y tisulares, <i>Pneumocystis</i> sp, <i>Ehrlichia</i> sp y <i>Anaplasma</i> sp
Técnicas para material viral	Feulgen (ADN viral) Floxi-na-tartracina de Lendrum (inclusiones virales) Orceína de Shikata (hepatitis B)
Técnicas de hematoxilina modificada	Hematoxilina férrica de Heidenhain* Hematoxilina ácida fosfotúngstica de Mallory* *Huevos de helmintos, trofozoitos, amebas
Inmunohistoquímica	Priones (proteínas infectantes) Virus (ADN y ARN) Bacterias (<i>Helicobacter pylori</i> , micobacterias, <i>Chlamydia</i> sp, <i>Bartonella</i> sp, <i>Treponema</i> sp, etc.). Hongos (<i>Candida</i> spp, <i>Aspergillus</i> spp, <i>Pneumocystis</i> spp, etc.). Protozoos (<i>Toxoplasma</i> sp)
Técnicas ultraestructurales	Infecciones virales sin y con cuerpos de inclusión Infecciones por <i>Mycoplasma</i> sp, <i>Chlamydia</i> sp, rickettsias, <i>Ehrlichia</i> sp y <i>Anaplasma</i> sp Infecciones bacterianas: enfermedad de Whipple y malacoplaquia Infecciones protozoarias: microsporidiosis
Técnicas de biología molecular	Micobacterias, <i>Bartonella</i> sp, infección bacteriana general, <i>Corynebacterium</i> sp, infección fúngica, virus de Epstein-Barr

Referencias bibliográficas

- 1.- Miller J M, Binnicker M J, Campbell S, Carroll K C, Chapin K C, Gilligan P H, et al. A guide to utilization of the microbiology laboratory for diagnosis of infectious diseases: 2018 Update by the Infectious Diseases Society of America and the American Society for Microbiology. Clin Infect Dis. 2018 Jun 28. DOI: 10.1093/cid/ciy381.
- 2.- Patel R. MALDI-TOF MS for the diagnosis of infectious diseases. Clin Chemistry 2015; 61: 100-11. doi: 10.1373/clinchem.2014.221770
- 3.- Payne M, Champagne S, Lowe C, Leung V, Hinch M, Romney M G. Evaluation of the FilmArray blood culture identification panel compared to direct MALDI-TOF MS identification for rapid identification of pathogens. J Med Microbiol. 2018; 67: 1253-6. DOI: 10.1099/jmm.0.000802.
- 4.- De Pauw B, Walsh T J, Donnelly P, Stevens D A, Edwards J E, Calandra T, et al. Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. Clin Infect Dis 2008; 46: 1813-21. DOI: 10.1086/588660.
- 5.- Ambasta A, Carson J, Church D L. The use of biomarkers and molecular methods for the earlier diagnosis of invasive aspergillosis in immunocompromised patients. Med Mycol 2015; 53: 531-57. DOI: 10.1093/mmy/myv026.
- 6.- Lehrnbecher T, Robinson P D, Fisher B T, Castagnola E, Groll A H, Steinbach W J, et al. Galactomannan, Beta-D-Glucan and PCR-based assays for the diagnosis of invasive fungal disease in pediatric cancer and hematopoietic stem cell transplantation: a systematic review and meta-analysis. Clin Infect Dis. 2016; 63: 1340-8. DOI: 10.1093/cid/ciw592.
- 7.- Nucci M, Nouér S A, Cappone D, Anaissie E. Early diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis in hematologic patients: an opportunity to improve the outcome. Haematologica. 2013; 98: 1657-60. DOI: 10.3324/haematol.2013.094359.
- 8.- Aguado J M, Vázquez L, Fernández-Ruiz M, Villaescusa T, Ruiz-Camps I, Barba P, et al. Serum galactomannan versus a combination of galactomannan and polymerase chain reaction-based *Aspergillus* DNA detection for early therapy of invasive aspergillosis in high-risk hematological patients: a randomized controlled trial. Clin Infect Dis 2015; 60: 405-14. DOI: 10.1093/cid/ciu833.
- 9.- Maertens J, Maertens V, Theunissen K, Meersseman W, Meersseman P, Meers S, et al. Bronchoalveolar lavage fluid galactomannan for the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis in patients with hematologic diseases. Clin Infect Dis 2009; 49: 1688-93. doi: 10.1086/647935.
- 10.- He S, Hang J P, Zhang L, Wang F, Zhang D C, Gong F H. A systematic review and meta-analysis of diagnostic accuracy of serum 1,3-beta-d-glucan for invasive fungal infection: Focus on cutoff levels. J Microbiol Immunol Infect. 2015; 48: 351-61. DOI: 10.1016/j.jmii.2014.06.009.
- 11.- Zou M, Tang L, Zhao S, Zhao Z, Chen L, Chen P, et al. Systematic review and



- meta-analysis of detecting galactomannan in bronchoalveolar lavage fluid for diagnosing invasive aspergillosis. *PloS One* 2012; 7: e43347. DOI: 10.1371/journal.pone.0043347.
- 12.- Pascual A, Calandra T, Bolay S, Buclin T, Bille J, Marchetti O. Voriconazole therapeutic drug monitoring in patients with invasive mycoses improves efficacy and safety outcomes. *Clin Infect Dis*. 2008; 46: 201-11. DOI: 10.1086/524669.
- 13.- Silva F, Navea D, Salas C, Torres J P, Catalán P, Morales J. Análisis de concentraciones plasmáticas de voriconazol y su perfil de seguridad en pacientes oncológicos pediátricos. *Rev Chilena Infectol* 2016; 33: 127-34. <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182016000200001>.
- 14.- Karthaus M, Lehrmbecher T, Lipp H-P, Kluge S, Buchheidt D. Therapeutic drug monitoring in the treatment of invasive aspergillosis with voriconazole in cancer patients-an evidence-based approach. *Ann Hematol* 2015; 94: 547-560. doi: 10.1007/s00277-015-2333-z.
- 15.- Fazekas T, Eickhoff P, Rauch M, Verdianz M, Attarbaschi A, Dworzak M, et al. Prevalence and clinical course of viral upper respiratory tract infections in immunocompromised pediatric patients with malignancies or after hematopoietic stem cell transplantation. *J Pediatric Hematology/Oncology* 34 (6): 442-9. DOI: 10.1097/MPH.0b013e3182580bc8.
- 16.- Hirsch H H, Randhawa P. BK polyomavirus in solid organ transplantation. *Am J Transplant*. 2013; 13 Suppl 4: 179-88. DOI: 10.1111/ajt.12110.
- 17.- Ison M G, Hayden F G. Viral infections in immunocompromised patients: what's new with respiratory viruses? *Curr Opin Infect Dis* 2002;15: 355-67. PMID: 12130931.
- 18.- Smith T F, Espy M J, Mandrekar J, Jones M F, Cockerill F R, Patel R. Quantitative real-time polymerase chain reaction for evaluating DNAemia due to cytomegalovirus, Epstein-Barr virus, and BK virus in solid-organ transplant recipients. *Clin Infect Dis* 2007; 45: 1056-61. DOI: 10.1086/521909.
- 19.- Marchesi F, Pimpinelli F, Ensoli F, Mengarelli A. Cytomegalovirus infection in hematologic malignancy settings other than the allogeneic transplant. *Hematol Oncol* 2018; 36: 381-91. DOI: 10.1002/hon.2453.
- 20.- Hayden R T, Sun Y, Tang L, Procop G W, Hillyard D R, Pinsky B A, et al. Progress in quantitative viral load testing: variability and impact of the WHO Quantitative International Standards. *J Clin Microbiol* 2017; 55: 423-30. DOI: 10.1128/JCM.02044-16.
- 21.- Lion T. Adenovirus infections in immunocompetent and immunocompromised patients. *Clin Microbiol Rev*. 2014;27: 441-62. DOI: 10.1128/CMR.00116-13.
- 22.- Hopkins H, Kambale W, Kamya M R, Staedke S G, Dorsey G, Rosenthal P J. Comparison of HRP2- and pLDH-based rapid diagnostic tests for malaria with longitudinal follow-up in Kampala, Uganda. *Am J Trop Med Hyg* 2007;76: 1092-7. PMID: 17556616.
- 23.- Johnston S P, Ballard M M, Beach M J, Causer L, Wilkins P P. Evaluation of three commercial assays for detection of Giardia and Cryptosporidium organisms in fecal specimens. *J Clin Microbiol* 2003; 41 (2): 623-6. PMID: 149727.
- 24.- Wong S S, Fung K S, Chau S, Poon R W, Wong S C, Yuen K Y. Molecular diagnosis in clinical parasitology: when and why? *Exp Biol Med* (Maywood) 2014; 239: 1443-60. PMID: 24668556.
- 25.- Fishman J A, Greenwald M A, Grossi P A. Transmission of infection with human allografts: essential considerations in donor screening. *Clin Infect Dis* 2012; 55: 720-7. DOI: 10.1093/cid/cis519.
- 26.- Schaffner A. Pretransplant evaluation for infections in donors and recipients of solid organs. *Clin Infect Dis* 2001; 33 Suppl 1: S9-14. DOI: 10.1086/32089.
- 27.- Derouin F, Pelloux H. Prevention of toxoplasmosis in transplant patients. *Clin Microbiol Infect*. 2008;14: 1089-101. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2008.02091.x.
- 28.- Eyzaguirre E, Haque A K. Application of immunohistochemistry to infections. *Arch Pathol Lab Med*. 2008; 132: 424-31. [http://www.archivesofpathology.org/doi/pdf/10.1043/1543-2165\(2008\)132%5B424:AOIT%5D2.0.CO%3B2](http://www.archivesofpathology.org/doi/pdf/10.1043/1543-2165(2008)132%5B424:AOIT%5D2.0.CO%3B2).
- 29.- Tenover F C. DNA hybridization techniques and their application to the diagnosis of infectious diseases. *Infect Dis Clin North Am* 1993; 7: 171-81. PMID: 834516.
- 30.- Kradin R. *Diagnostic Pathology of Infectious Disease*. 2nd edition. Elsevier Philadelphia, 2017.
- 31.- Procop G W, Wilson M. Infectious disease pathology. *Clin Infect Dis* 2001; 32: 1589-601. DOI: 10.1086/320537.
- 32.- Lass-Flörl C. Zygomycosis: conventional laboratory diagnosis. *Clin Microbiol Infect*. 2009; 15 Suppl 5: 60-5. doi: 10.1111/j.1469-0691.2009.02999.x.
- 33.- Guarner J. Incorporating pathology in the practice of infectious disease: myths and reality. *Clin Infect Dis*. 2014; 59: 1133-41. doi: 10.1093/cid/ciu469.
- 34.- Grogan T, Reinhardt K, Jaramillo M, Lee D. An update on "special stain" histochemistry with emphasis on automation. *Adv Anat Pathol* 2000; 7: 110-22. PMID: 10721418.