

NTP 488: Calidad de aire interior: identificación de hongos

Qualité d'air intérieur: Identification des champignons
Indoor air quality: Identification of Fungi

Las NTP son guías de buenas prácticas. Sus indicaciones no son obligatorias salvo que estén recogidas en una disposición normativa vigente. A efectos de valorar la pertinencia de las recomendaciones contenidas en una NTP concreta es conveniente tener en cuenta su fecha de edición.

Redactores:

Maria del Carme Martí Solé
Lda. en Farmacia

Rosa M^a Alonso Espadalé
Lda. en Ciencias Biológicas

Angelina Constans Aubert
Ingeniero Técnico Químico

CENTRO NACIONAL DE CONDICIONES DE TRABAJO

Esta Nota Técnica complementa a las anteriores dedicadas a la calidad de aire interior desde el punto de vista microbiológico y en ella se describen los principales métodos para identificar los hongos presentes en determinados ambientes.

Introducción

El crecimiento de hongos en sistemas de aire acondicionado y edificios puede producir en sus habitantes determinadas patologías entre las que cabe destacar asma y alveolitis alérgicas. La contaminación ambiental por hongos en el interior de edificios, es debida básicamente a hongos filamentosos y levaduras.

Muchas especies de hongos se pueden diferenciar, identificar y clasificar según su morfología, estructura, mecanismo de formación y elementos formadores de las esporas. El conocimiento de estas características puede ser suficiente para identificar especies que pertenecen al grupo de los hongos filamentosos; sin embargo, cuando se trata de identificar especies pertenecientes al grupo de las levaduras es imprescindible la aplicación de pruebas bioquímicas.

En las NTP-299 y 335 se describen los métodos para la captación de hongos y esporas fúngicas así como su recuento e identificación por observación al microscopio óptico. Los que se describen en la presente NTP combinan la observación macroscópica y microscópica con pruebas bioquímicas.

Conceptos generales

Los hongos pueden ser unicelulares o pluricelulares. Las levaduras son hongos unicelulares con forma oval (5-30 μm), inmóviles y que se dividen por mecanismos diversos, especialmente por gemación. Deben considerarse como hongos que han perdido su forma filamentosos y se han convertido en organismos unicelulares.

La mayoría de los hongos, sin embargo, son pluricelulares o filamentosos y se caracterizan por estar constituidos por filamentos ramificados o hifas que se desarrollan y entrelazan formando el micelio. Existe un micelio vegetativo adosado a la superficie del sustrato (suelo, plantas, alimentos) y un micelio aéreo o reproductor, donde se forman las esporas (asexuales y sexuales).

Los hongos filamentosos y levaduras son en su mayoría saprófitos, hallándose libres en la naturaleza, especialmente en la materia orgánica en descomposición. Algunas especies son parásitas, formando parte de la flora normal del hombre, como por ejemplo *Candida albicans*, que es una levadura y puede comportarse como oportunista y resultar patógena cuando se produce una disminución en los mecanismos de resistencia del individuo. Otras especies de hongos pueden producir durante su desarrollo sustancias tóxicas o micotoxinas como, por ejemplo, las aflatoxinas producidas por *Aspergillus flavus*, que es un hongo filamentosos. Por otra parte, algunos hongos son difásicos, es decir, unas veces se comportan como hongos filamentosos y otras pueden comportarse como levaduras.

Las condiciones necesarias para que un hongo crezca en una superficie son: existencia de esporas, base nutriente, humedad y

temperatura entre 4 y 38 °C.

En la práctica, los hongos filamentosos y las levaduras también se diferencian en el laboratorio en dos grupos según el aspecto macroscópico de sus colonias: las levaduras forman colonias húmedas, cremosas, opacas o pastosas, y los hongos filamentosos producen colonias algodonosas, lanosas o pulverulentas.

Especies más comunes en aire interior

Las especies más comunes que se encuentran en aire interior son las reflejadas en la tabla 1, a partir de los resultados obtenidos en dos estudios diferentes (Health y Welfare, 1987 y Flanigan et al. 1993) publicados en Biocontaminants in Indoor Environment. Los hongos más comunes existentes en el polvo de origen doméstico pueden fácilmente pasar al aire; y si se dan las condiciones adecuadas para su desarrollo en cuanto a temperatura y humedad relativa, también pueden acantonarse en cualquier tipo de material (como alfombras, moquetas, empapelado de una pared, etc.) y crecer desmesuradamente, proyectando al ambiente un número elevado de esporas con el consiguiente riesgo para la salud.

Tabla 1. Hongos comunes en polvo doméstico

- Cladosporium sp. (*C. cladosporoides*, *C. herbarum*, y/o *C. sphaerospermum*) (>80% de muestras)*
- Penicillium sp. (80% de muestras) (20%-30% de muestras)
- Sistotema brinkmannii (>70% de muestras)
- Levaduras rosas y blancas (>79% de muestras)
- Botrytis cinérea (>50% de muestras)
- Aspergillus sp. (*A. fumigatus*, *A. niger*, *A. ochroaceus*, *A. oryzae*, *A. versicolor*, y/o *A. glaucus*) (37% de muestras)
- Paecilomyces variotii
- Stachybotrys atra
- Phoma sp
- Aureobasidium pullulans (20%30% de muestras)
- Alternaria alternata
- Epicoccum purpurascens (20%-30% de muestras)
- Geotrichum candidum (20%-30% de muestras)
- Ulocladium sp. (*U. chartarum* y/o *U. consortiale*) (20%30% de muestras)
- Trichoderma viride
- Trichoderma harzianum
- Mucor sp

* Frecuencia en forma de percentil de muestra en que se encuentra cada una de estas especies.

Efectos sobre la salud

Los hongos a través de sus esporas, micotoxinas y por la emisión de VOC (compuestos volátiles orgánicos), pueden causar diferentes tipos de enfermedades o alteraciones de la salud:

- Enfermedad infecciosa o patogénica: aspergilosis (por exposición a *Aspergillus fumigatus*), histoplasmosis (por *Histoplasma*), criptococosis (por *Cryptococcus*) y coccidiomicosis (por *Coccidioides*)
- Reacciones alérgicas, como rinitis y asma
- Neumonitis por hipersensibilidad
- Cáncer debido a micotoxinas carcinogénicas
- Desórdenes inmunológicos por micotoxinas inmunosupresivas
- Reacciones tóxicas por micotoxinas
- Reacciones de inflamación debidas al β -1,3-glucano, compuesto de la pared celular de los hongos
- Irritación debida a VOC fúngicos como por ejemplo alcohol
- Síndrome del edificio enfermo

Principales métodos de identificación de hongos filamentosos

La identificación de los hongos filamentosos se basa en el examen macroscópico de la colonia y en sus características microscópicas. Semejanzas macroscópicas como la forma de la colonia, el color de la superficie, la textura y la producción de pigmentos son muy útiles para la identificación.

En general, la morfología microscópica de los hongos es estable y presenta pocas variaciones. La identificación definitiva se basa en la forma característica, método de producción y ordenamiento de las esporas, siendo también importante conocer el tamaño y la disposición de las hifas.

La preparación del material para la observación microscópica puede realizarse en fresco, con cinta de celofán adhesiva o mediante cultivo sobre portaobjetos.

Preparación en fresco

Se realiza empleando el procedimiento descrito a continuación:

1. Seleccionar una colonia aislada.
2. Calentar a la llama el alambre de un asa de siembra, y doblar de forma que se convierta en un objeto cortante.
3. Con la ayuda del asa, extraer un fragmento triangular de la colonia que contenga además un poco de agar en la parte inferior.
4. Depositar el fragmento extraído sobre un portaobjetos en el cual, previamente, se ha depositado una gota de azul de lactofenol.
5. Cubrir con un portaobjetos y presionar suavemente para dispersar la colonia y el agar; de esta forma, la muestra está disponible para su observación al microscopio.

Este procedimiento es el que utilizan la mayoría de los laboratorios, ya que las muestras se preparan con facilidad y rapidez y además permite identificar muchas de las especies de hongos más habituales. El mayor inconveniente de la observación en fresco es que se puede alterar el ordenamiento característico de las esporas al presionar con el cubreobjetos, por lo que este procedimiento no es válido en los casos en que es necesario conocer la disposición de las esporas.



Fig. 1: Preparación en fresco

Preparación con cinta de celofán adhesiva

El procedimiento se lleva a cabo como sigue :

1. Apoyar el lado engomado de un trozo de cinta adhesiva transparente sobre la superficie de una colonia.
2. Colocar la cinta bien extendida sobre una gota de azul de lactofenol o azul de anilina colocada, a su vez, sobre un portaobjetos.
3. Observar al microscopio para conocer la forma y ordenamiento característico de las esporas.

Este método puede considerarse como el más simple, económico y adecuado para la identificación de hongos, recomendable para los laboratorios microbiológicos de cualquier nivel.

La preparación de la cinta transparente permite observar al microscopio como se desarrolla el microorganismo en el cultivo. Generalmente las esporas se mantienen intactas y la identificación se realiza con facilidad.

Una de las desventajas de este método es que si la cinta transparente no se presiona con suficiente firmeza sobre la superficie de la colonia, la muestra no es adecuada, ya que al no quedar bien adherida la cinta, las esporas o las hifas no se pueden identificar.

En los casos en que mediante este método no se observen esporas deberá realizarse la preparación en fresco.

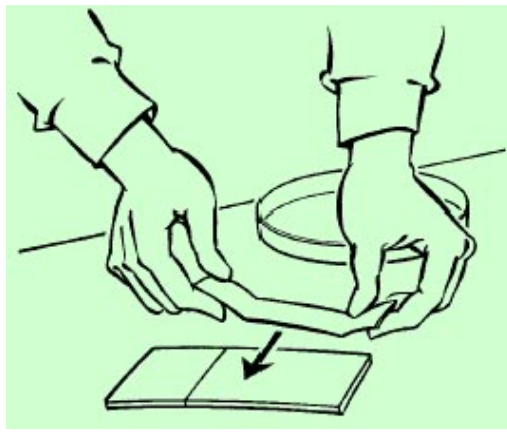


Fig. 2: Preparación con cinta de celofán adhesiva

Cultivo sobre portaobjetos

Se realiza empleando el procedimiento descrito a continuación:

1. Cortar un bloque pequeño de un medio sólido adecuado (agar), que ha sido vertido en una cápsula de Petri, hasta una altura de 2 cm. El bloque puede cortarse con la ayuda de un bisturí estéril o con un tubo de ensayo estéril sin reborde (lo que permite obtener un taco redondo).
2. Colocar un portaobjetos estéril sobre una capa de agar al 2% contenida en una cápsula de Petri.
3. Colocar el bloque de agar sobre el portaobjetos.
4. Con una asa de siembra cuyo alambre ha sido doblado en ángulo recto, inocular los cuatro cuadrantes del taco con el microorganismo a identificar.
5. Colocar un cubreobjetos estéril sobre la superficie del bloque de agar.
6. Tapar la cápsula de Petri que contiene el cultivo e incubar a 30° C.
7. Finalizado el período de incubación, retirar el cubreobjetos (este proceso debe realizarse en una cabina de seguridad biológica), y colocarlo en un portaobjetos que contenga azul de lactofenol o azul de anilina.
8. La observación al microscopio permite distinguir la forma y disposición de las esporas.
9. Si con este proceso no ha sido posible la identificación, el resto del cultivo puede ser usado más adelante si se continúa incubando. Entonces se retira el bloque de agar y se agrega una gota de azul de lactofenol o azul de anilina sobre la zona del cultivo y se coloca un cubreobjetos sobre ella. Es recomendable realizar dos cultivos sobre el mismo portaobjetos de modo que si en uno no se pueden observar las características microscópicas puede disponerse del segundo después de un período adicional de incubación.

Este método permite la observación microscópica del hongo mientras se desarrolla directamente debajo del cubreobjetos, de forma que las características microscópicas se distinguen con facilidad, las estructuras se mantienen intactas y puede observarse un gran número de áreas representativas.

No deben realizarse cultivos en portaobjetos de hongos de crecimiento lento que pueden ser patógenos dimorfos, como *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces derma titidis*, *Coccidioides immitis*, *Paracoccidioides brasiliensis* o *Sporothrix schenckii*.



Fig. 3: Cultivo sobre portaobjetos

Principales métodos de identificación de levaduras

Se requiere una combinación de pruebas bioquímicas y morfológicas para identificar las levaduras. En las características morfológicas debe incluirse el color de las colonias, la medida y la forma de las células, la presencia de cápsula, la producción de hifas o pseudohifas, y la producción de clamidiosporas. Las pruebas bioquímicas incluyen la asimilación y fermentación de azúcares y la asimilación de nitrato.

Muchas levaduras asociadas con infecciones humanas pueden ser identificadas usando alguno de los test comerciales que existen basados en la asimilación de azúcares. No obstante, es importante recordar que el examen morfológico es esencial para evitar confusión entre microorganismos con perfiles bioquímicos idénticos. En consecuencia, hay un número de pruebas simples para la identificación presuntiva de algunas de las levaduras más importantes. Éstas incluyen la prueba del tubo germinativo para la identificación rápida de *Candida albicans* y la prueba de la ureasa para *Cryptococcus neoformans*, que se describen más adelante.

Si la prueba del tubo germinativo es positiva, el organismo es *Candida albicans*. Si se observa una cápsula puede hacer pensar que el organismo es *Cryptococcus neoformans*. La prueba de la ureasa es útil para la identificación de este organismo, pero debe complementarse con otras pruebas adicionales. Si no se produce germinación en el tubo y no se observa la presencia de cápsula, deben efectuarse otras pruebas bioquímicas y morfológicas.

Actualmente existen en el mercado sistemas estandarizados de identificación (kits) para conocer el perfil bioquímico de las levaduras. Estos kits permiten una identificación más rápida de las levaduras aisladas que los métodos clásicos de asimilación y fermentación. La ventaja más importante es que estos sistemas proporcionan una identificación que surge de una base de datos sobre miles de biotipos de levaduras, que incluyen diversas variaciones y patrones de utilización de sustratos.

Prueba del tubo germinativo

Se realiza de acuerdo con el siguiente procedimiento:

1. Suspender un inóculo muy pequeño de células de la levadura obtenidas a partir de una colonia aislada en 0,5 ml de suero de oveja (o de suero humano, procedente de un individuo sano).
2. Incubar los tubos a 35-37° C, no superando las 3 horas.
3. Después de la incubación, tomar una gota de la suspensión y colocarla sobre un portaobjetos. Observar con el microscopio a poco aumento la presencia de tubos germinativos. Un tubo germinativo se define como un apéndice con la mitad de ancho y 3 a 4 veces el largo de la célula de la cual emerge. En la mayor parte de los casos no existe constricción en el origen del tubo germinativo.

Producción de cápsula

El procedimiento se desarrolla del siguiente modo:

1. Tomar una pequeña cantidad del inóculo suspendiéndola en una gota de una solución acuosa de tinta India al 50% en un portaobjetos.
2. Observar al microscopio la presencia de la cápsula, que se distingue como un halo claro alrededor de las células.

Prueba selectiva rápida para ureasa

Se realiza según el siguiente procedimiento:

1. Pasar un hisopo de algodón impregnado con un sustrato con urea deshidratado sobre la superficie de dos o tres colonias, de modo que la punta se cubra con el microorganismo.
2. Colocar el hisopo con la levadura dentro de un tubo que contenga 3 gotas de cloruro de benzalconio al 1% (pH 4,86 ±0,01) y rotar con firmeza contra el fondo para poner en contacto los microorganismos con las fibras de algodón.
3. Tapar el tubo e incubar a 45°C durante 30 minutos.
4. Examinar a los 10, 15, 20 y 30 minutos para detectar un cambio de color de amarillo a púrpura. Un color rojo a púrpura indica producción de ureasa.

Medidas de prevención

Todos los trabajos realizados para la identificación o el cultivo de los hongos deben efectuarse en las condiciones adecuadas para no contaminar ni el laboratorio donde se realizan los análisis ni al personal que los manipula.

Todos los cultivos de hongos filamentosos han de ser manipulados en el interior de una cabina de seguridad biológica clase II, sin excepciones. Es permisible el manejo de los cultivos de levaduras en la mesa del laboratorio pero deben ser tratados como material infeccioso. Siempre que sea posible, se utilizarán asas de siembra de un solo uso y cuando esto no sea posible se recurrirá a la utilización de un incinerador o la llama de un mechero para la descontaminación del asa. Los cultivos de hongos deben ser sellados

con cinta adhesiva para evitar la contaminación del laboratorio y deben ser esterilizados en el autoclave o bien eliminarlos en los recipientes adecuados para residuos sanitarios grupo III o de riesgo.

Si los hongos se manipulan tomando las precauciones habituales de seguridad y observando con cuidado unas buenas prácticas de laboratorio cabe esperar muy pocos problemas relacionados con la contaminación del laboratorio o del personal.

Bibliografía

(1) CAMPBELL CK., et al

Identification of Pathogenic Fungi

Public Health Laboratory Service. London, 1996

(2) DAGMAR SCHMIDT, E.

Biocontaminants in Indoor Environments

Cutter Information Corp. USA, Arlington, 1994

(3) INEGOLD, S., BARON, E.

Diagnóstico Microbiológico (Bayley/Scott)

Ed. Médica Panamericana, 7ª Edición, Buenos Aires, 1989

(4) INSTITUTO NACIONAL DE SEGURIDAD E HIGIENE EN EL TRABAJO

Notas Técnicas de Prevención (299, 335, 351)

INSHT, Barcelona, 1998

(5) SAMSON, R.B. et al

Health Implications of Fungi in Indoor Environments

Editorial DOYMA, Barcelona, 1992

(6) WALD, P.H., STAVE, G.M.

Physical and Biological Hazards of the Workplace

Van Nostrand Reinhold, New York, 1994

(7) REAL DECRETO 664/1997 de 125 (M. de la Presidencia, B.O.E. 2451997).

Sobre la protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos durante el trabajo.