



Universidad de Buenos Aires

Facultad de Medicina

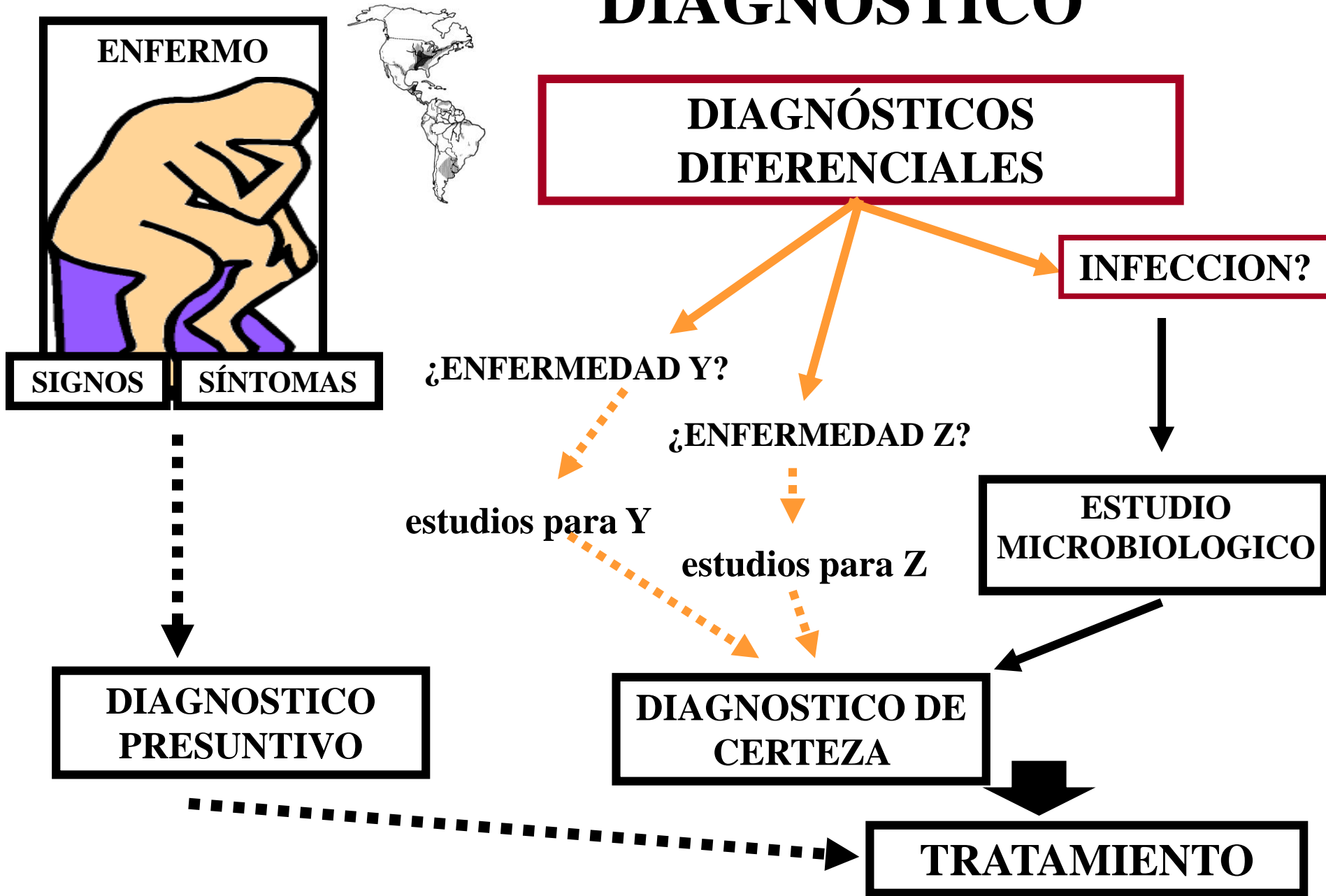
**Departamento de Microbiología, Parasitología
e Inmunología**

Diagnóstico micológico

Teórico N° 5

Dra. Maria Teresa Mujica

DIAGNÓSTICO



Diagnóstico Micológico

❖ Antecedentes epidemiológicos.

De importancia en el Dx. para dirigir al búsqueda de patógenos endémicos.

❖ Manifestaciones clínicas de los pacientes.

Permiten la: selección de la muestra.

transporte y conservación.

procesamiento/ diagnóstico.

❖ Pruebas de sensibilidad antifúngica (ATF).

Informan el comportamiento de una especie fúngica a un ATF in vitro.

DIAGNÓSTICO MICOLÓGICO

✓ DIRECTO

Examen microscópico (óptico, fluorescencia, contraste de fase)

Coloraciones: Gram Nicolle- Giemsa- Kinyoun-

Cultivos

Búsqueda de componentes estructurales de la célula fúngica

Biomarcadores- Ácidos nucleicos.

Espectrometría de masa (Maldi-tof, Bruker®)

✓ INDIRECTO

Búsqueda de anticuerpos específicos.

Intradermorreacciones (Mecanismo de hipersensibilidad tipo IV)

Clasificación de Enfermedades Fúngicas

SUPERFICIALES

- Dermatoficias
- Malasseziosis
- Piedra
- Candidiasis

SUBCUTANEAS

- Micetomas
- Esporotricosis
- Cromoblastomycosis
- Lobomycosis

SISTEMICAS ENDEMICAS

- Histoplasmosis
- Paracoccidioidomycosis
- Coccidioidomycosis
- Penicilliosis
- Blastomycosis

OPORTUNISTAS

- Aspergilosis
- Cigomycosis
- Candidiasis
- Criptococosis
- Hialohifomycosis
- Feohifomycosis
- Pneumocitosis

Diagnóstico micológico

- 1. Manifestaciones Clínica- Antecedentes epidemiológicos**
- 2. Toma de muestras**
- 3. Transporte y conservación**
- 4. Exámenes directos**
- 5. Cultivos**
- 6. Búsqueda de antígenos fúngicos.**
- 7. Detección de ácidos nucleídos**
- 8. Búsqueda de anticuerpos**
- 9. Interpretación de resultados**

Toma de muestra

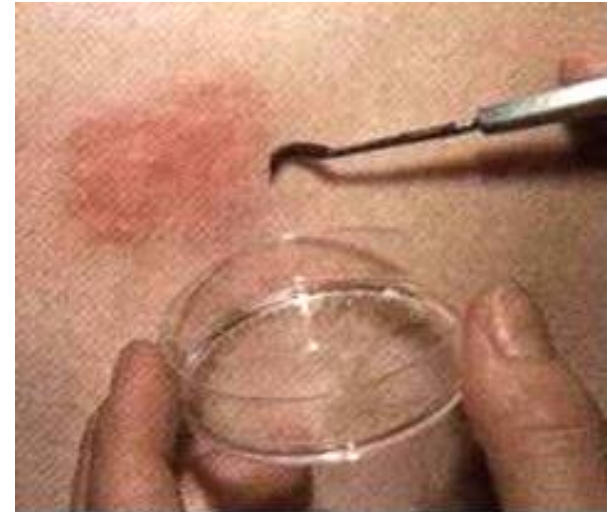
- 1. Conocer las características clínicas y evolutivas de las lesiones.**
- 2. Suspender la medicación antifúngica local y sistémica.**
- 3. Suspender el uso de cremas, talcos, etc.**
- 4. Evaluar el riesgo y la morbilidad asociada a la toma de muestras.**

TOMA DE MUESTRA

- ✓ **Raspado de piel**
- ✓ **Depilación de barba, bigote o pelos**
- ✓ **Corte de pelos**
- ✓ **Tela adhesiva transparente**
- ✓ **Hisopado (mucosas)**
- ✓ **Biopsias**
- ✓ **Punción aspiración de nódulos**
- ✓ **Escarificaciones cutáneas.**
- ✓ **LCR**
- ✓ **Esputo- LBA**
- ✓ **Sangre para hemocultivo.**
- ✓ **Suero para serología- búsqueda de antígenos**

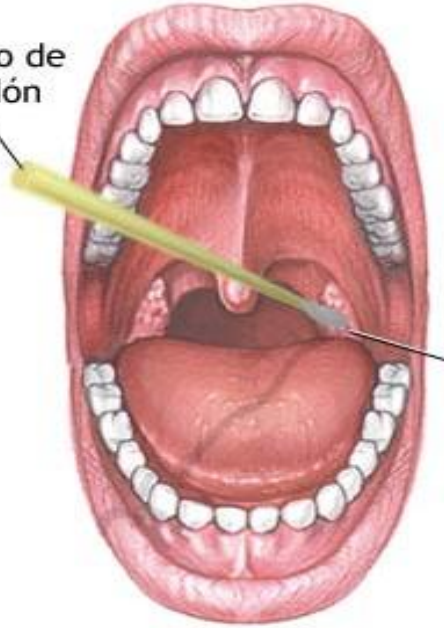
Raspado

uñas
piel lisa
cuero cabelludo
intertrigos



Hisopado

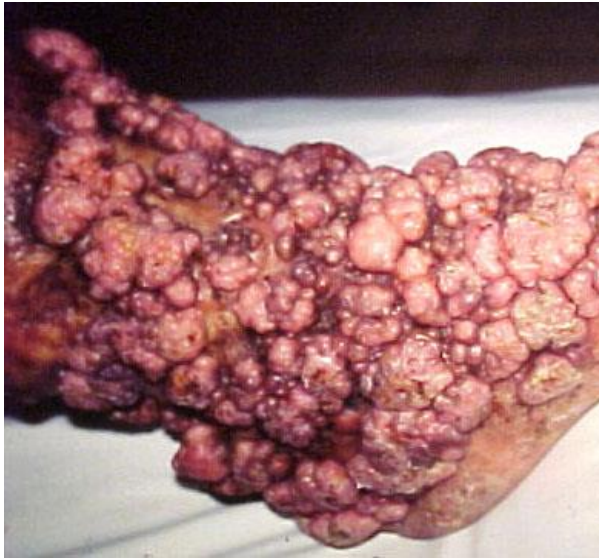
Palillo de algodón



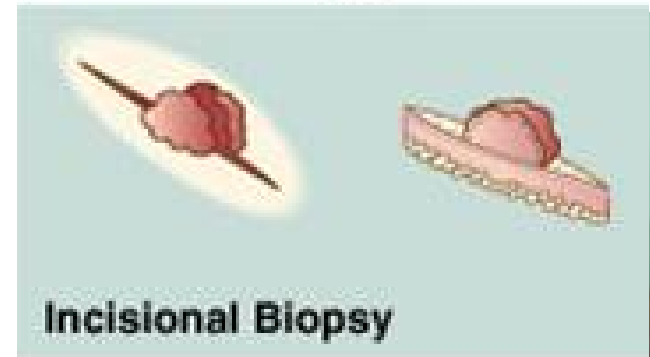
Depilado

tinea capitis





- ✓ **Biopsias**
- ✓ **Punción aspiración de nódulos**
- ✓ **Escarificaciones cutáneas.**



Muestra representativa



CONCEPTOS BASICOS PARA LA TOMA DE MUESTRA

- ❖ **Elegir el material que mejor represente el proceso infeccioso.**
- ❖ **Tomar la muestra en el momento adecuado y en lo posible antes de que el paciente reciba antimicrobianos.**
- ❖ **Obtener la muestra evitando contaminarla con la biota normal del paciente.**
- ❖ **Tamaño de la muestra adecuado.**
- ❖ **Evitar el agregado de ATB que inhiban el desarrollo.**
- ❖ **Utilizar un recipiente estéril y adecuado para su conservación y transporte**
- ❖ **Identificar la muestra correctamente.**
- ❖ **Enviar al laboratorio lo más rápidamente posible.**

Transporte y conservación de la muestra

- ✓ **Entre dos portaobjetos previamente flameados.**
- ✓ **Placa de Petri estéril.**
- ✓ **En tubo con solución fisiológica.**
- ✓ **Biopsias: frasco estéril – frasco con formol al 10%.**

- ✓ **Micosis superficiales, Conservar a temperatura ambiente en lugar seco- TA.**
- ✓ **Micosis por implantación traumática – Micosis Sistémicas a 4 °C.**
- ✓ **La sangre para hemocultivos debe ser sembrada en los medios de cultivos inmediatamente de venopuncion, al lado del paciente y se deben incubar a 35/37°C**
- ✓ **En hongos con micelio continuo procesar rápido (por la autolisis de los micelios). Orden de los *Mucorales*.**

Examen directo I

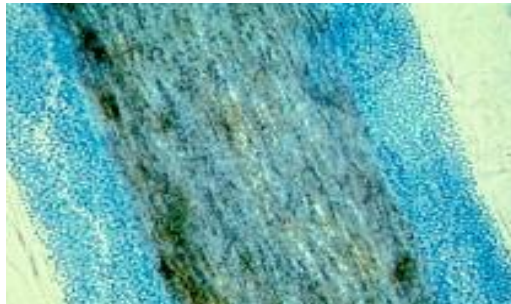
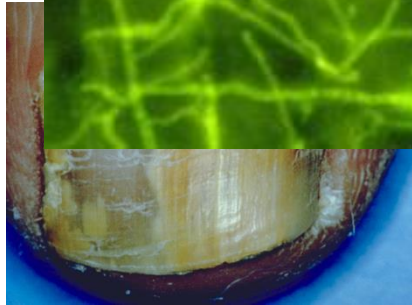
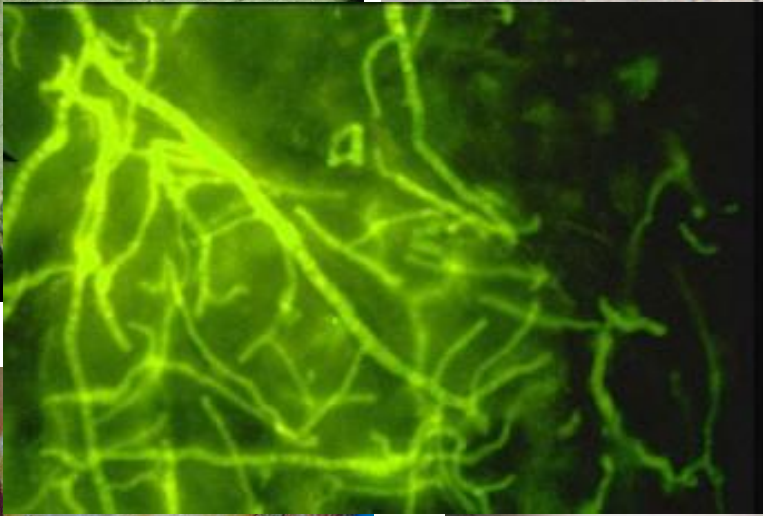
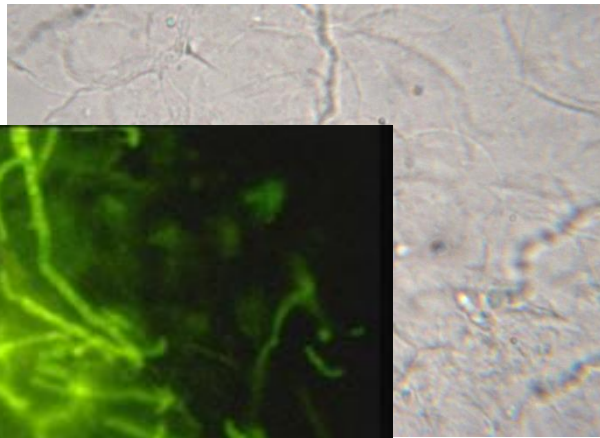
Al estado fresco:

- ✓ En los materiales fluidos poner una gota entre porta y cubreobjetos.**
- ✓ En escamas o cualquier material córneo requiera la ruptura de la queratina digestión con KOH al 40 % p/v.**
- ✓ En caso de levaduras capsuladas utilizar tinción con tinta china.**

Examen directo II

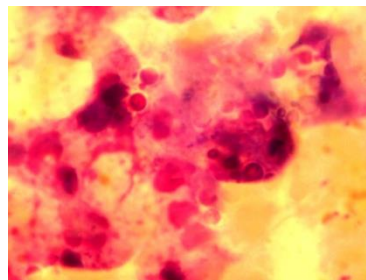
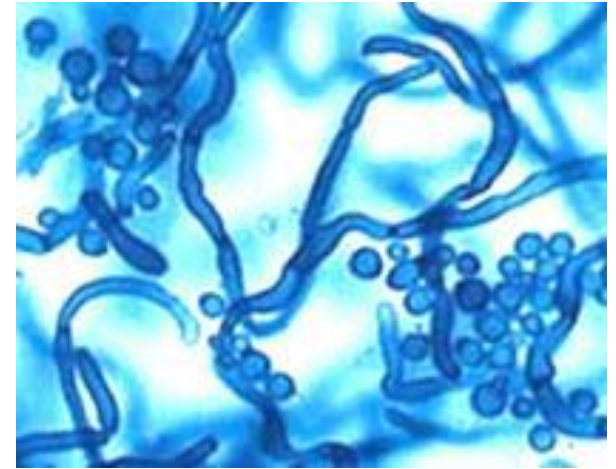
Coloraciones: permiten conocer las características tintoriales y la ubicación del microorganismo en la célula del hospedero.

- **Giemsa: permite observar la morfología celular: tiñe la levaduras y; las forma tróficas y quísticas de *P. jirovecii*.**
- **Coloraciones argénticas tiñe los talos.**
- **Hacer tinciones para Gram, ZN y Kinyoun permite conocer la asociación con otros microorganismos.**
- **Los colorantes fluorescentes (blanco de calcofluor) aumentan la sensibilidad de los exámenes observadas con técnicas al estado fresco.**

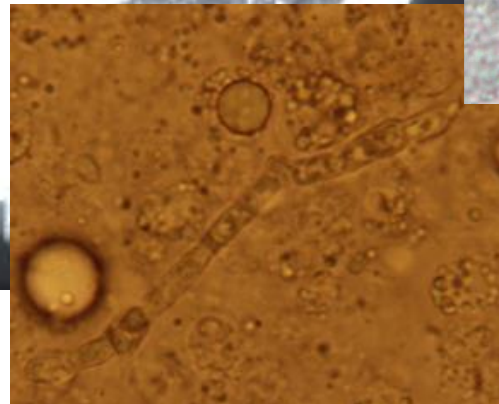
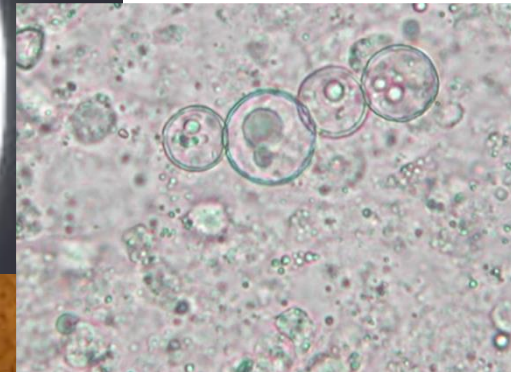
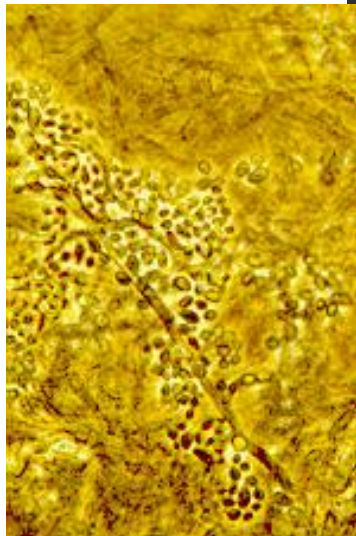
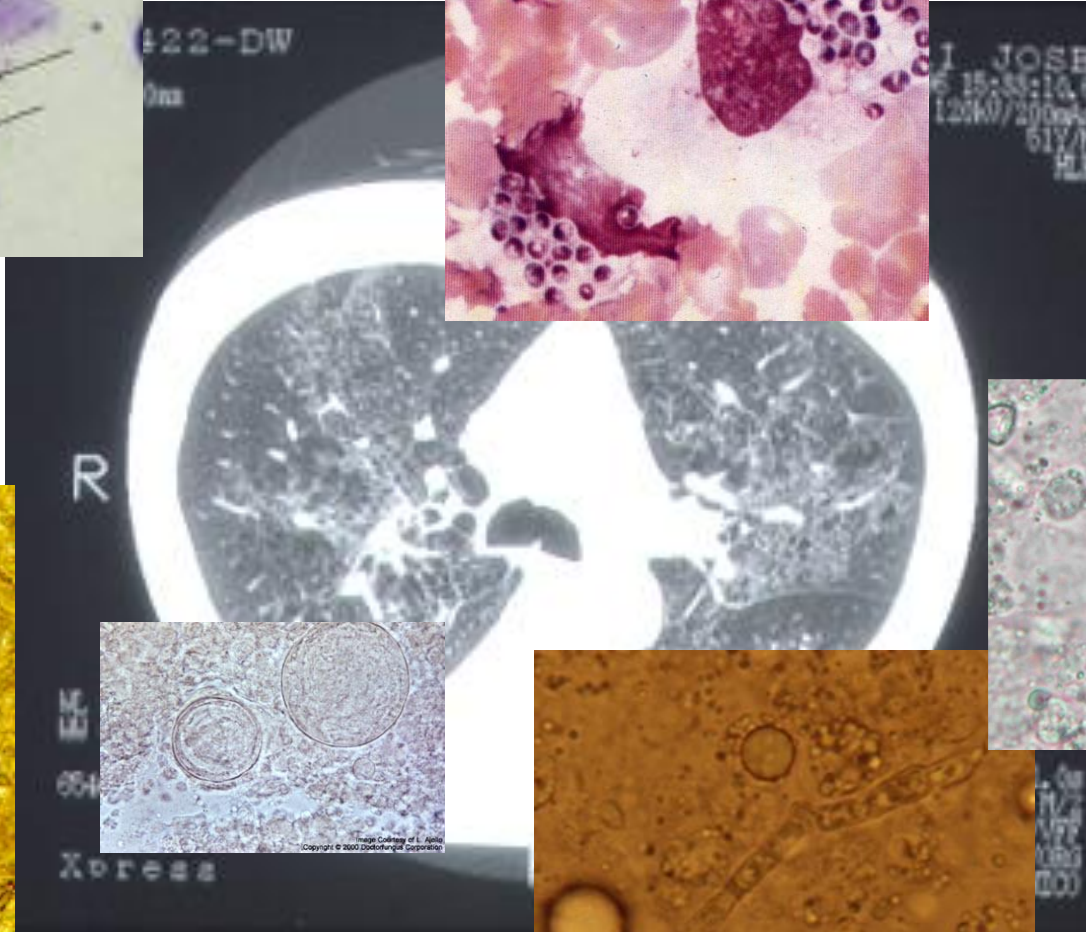
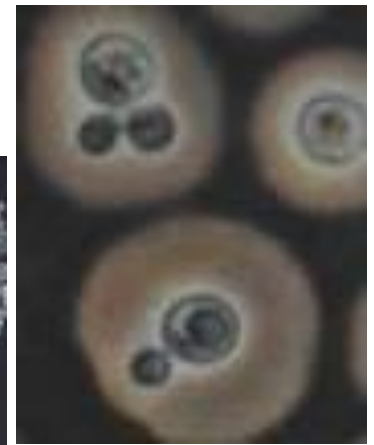
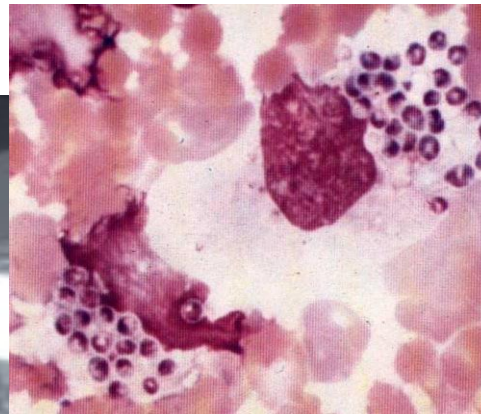
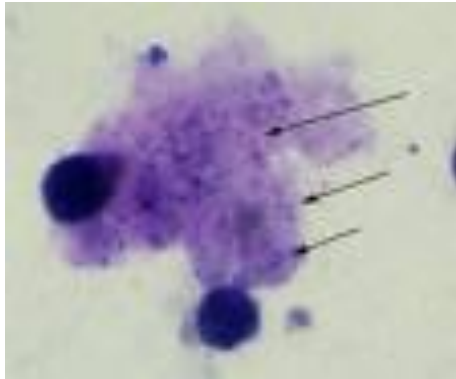


queratólisis punctata
Nocardia minutissima

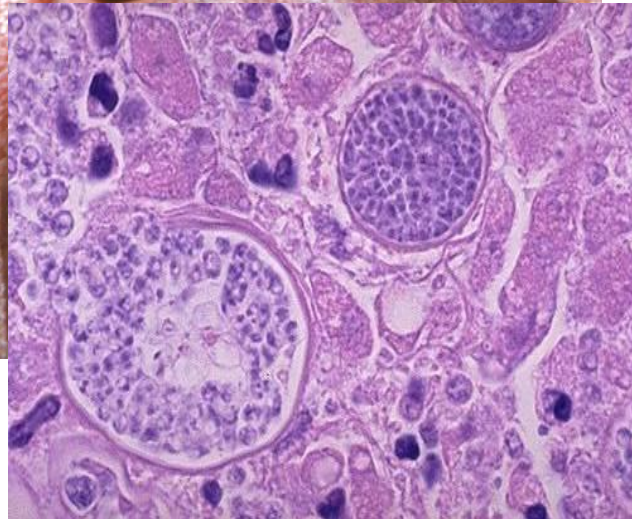
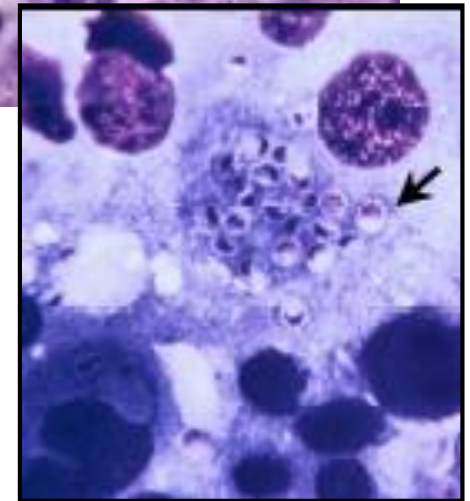
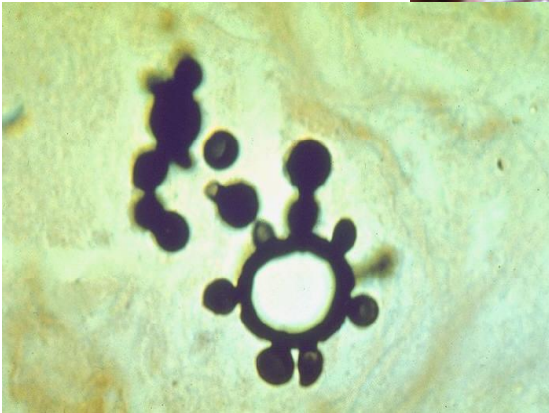
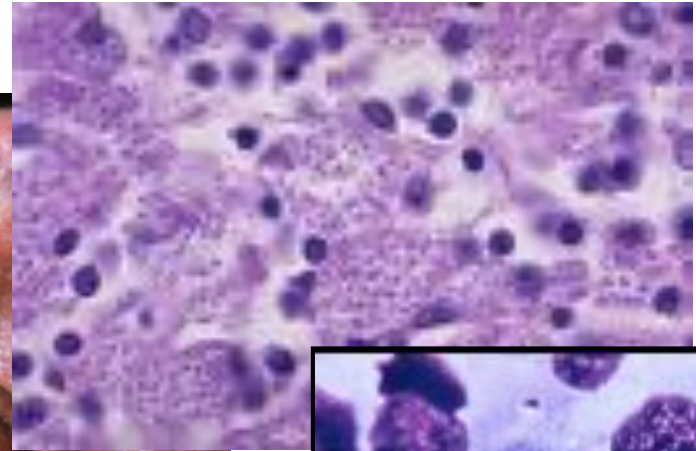
Examen directo



Examen directo

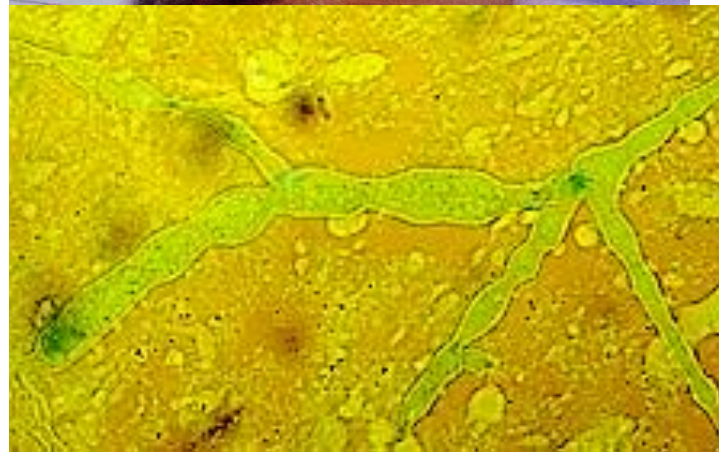


Examen directo





Examen directo



Examen directo

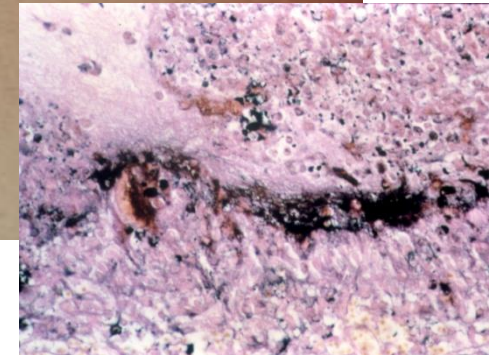
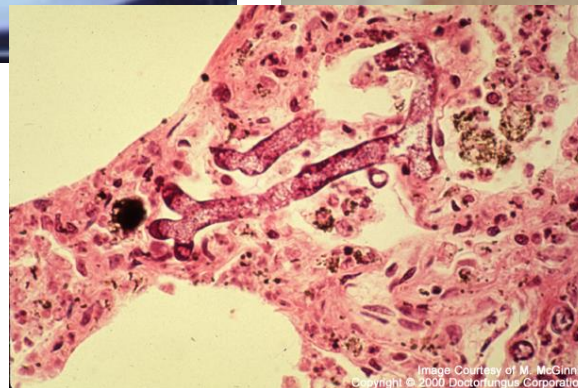
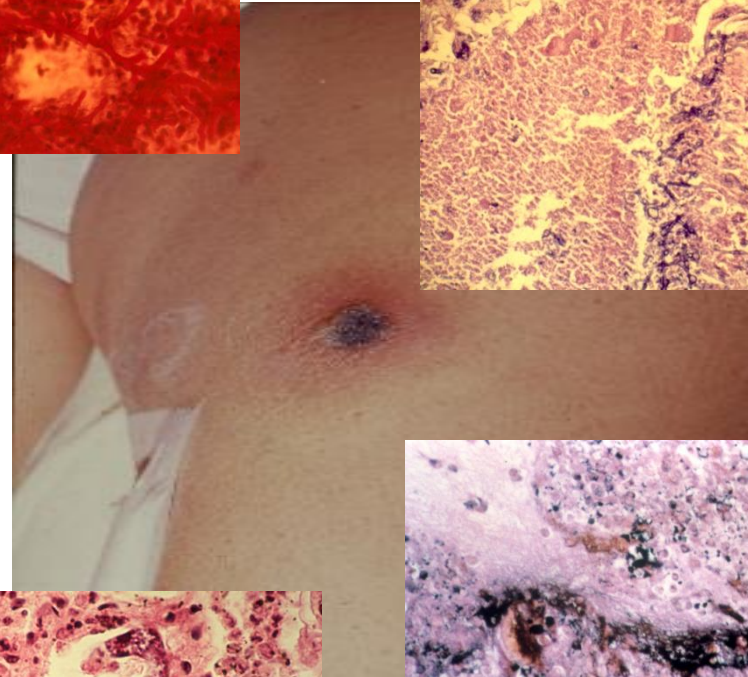
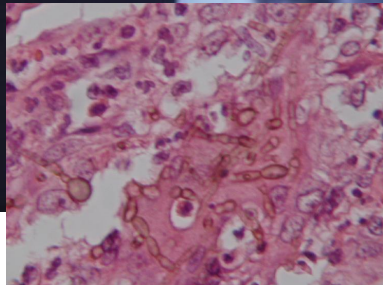
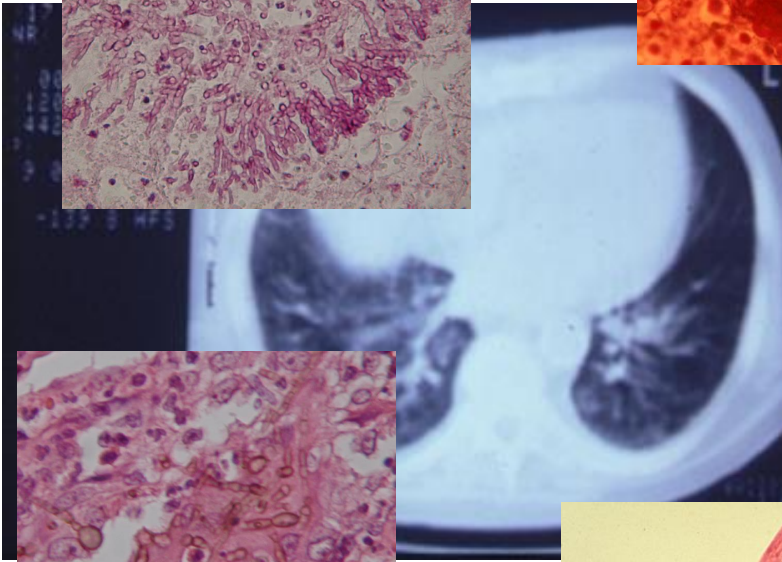
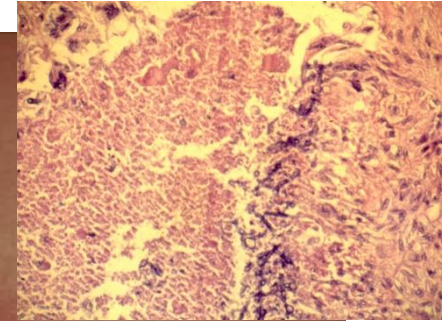
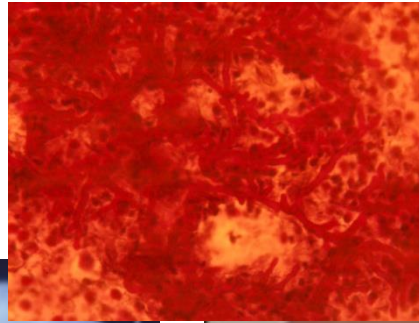
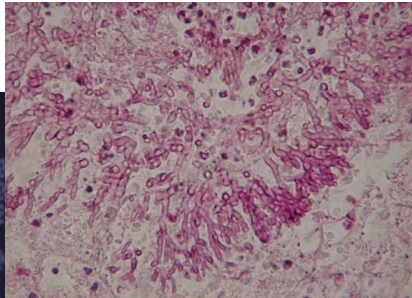


Image Courtesy of M. McGinnis
Copyright © 2000 DoctorTungus Corporation

EXÁMENES DIRECTOS III

Examen en fresco o con coloraciones

- ❖ Permite reconocer la presencia de elementos fúngicos (levaduras- micelios; hialinos-pigmentados; tabicados-cenocíticos).
- ❖ Observar la presencias de diferentes estructuras células esclerotales- granos- levaduras multibrotantes, esferas con endosporos para un **Dx presuntivo**.
- ❖ Elegir el antifúngico correspondiente.
- ❖ Baja sensibilidad.
- ❖ Buena especificidad dependiendo del conocimiento del origen de la muestra y, del estado y antecedentes del paciente.

Estudios histopatológicos

Permiten Observar:

➤ La morfología de la célula fúngica.

➤ La invasión tisular.

➤ Presencia de trombos fúngicos.

➤ La H&E evidencia la respuesta del hospedero

➤ PAS y Grocott aumentan la sensibilidad.

➤ Fontana Masson (detecta melanina)

➤ Alcian blue	}	Cápsula
➤ Mucicarmina		

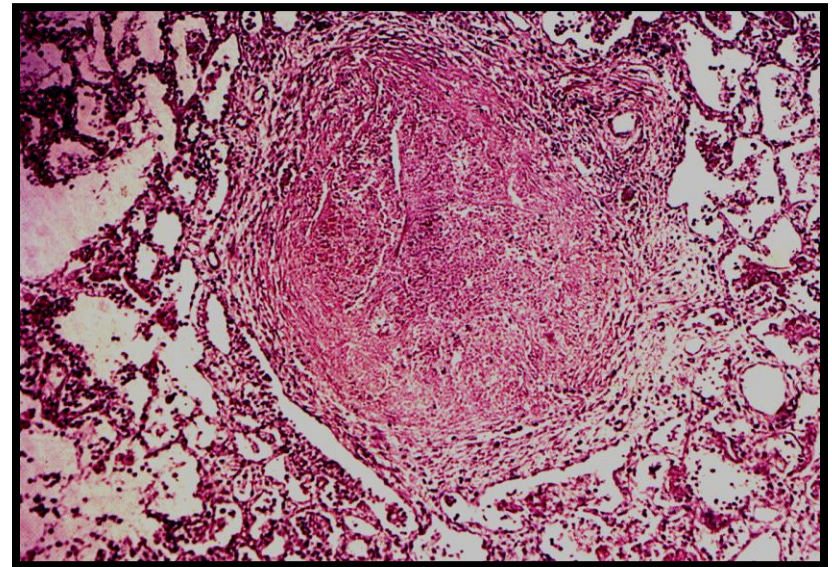
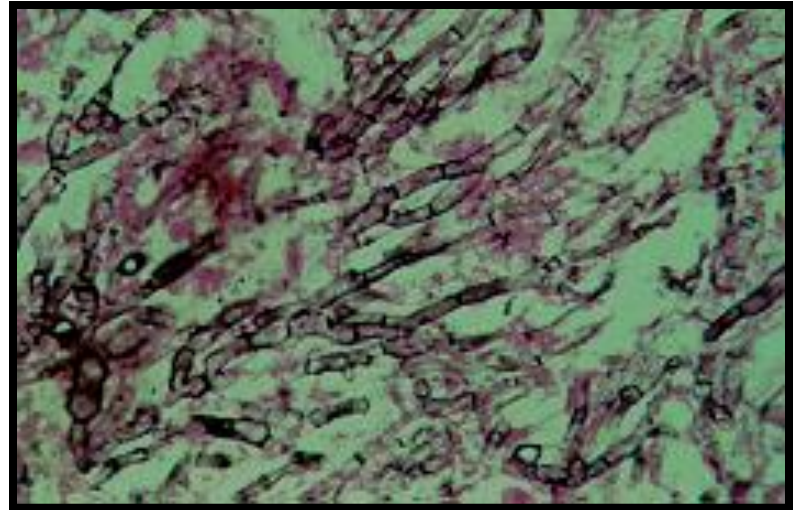
➤ Los métodos inmunohistoquímicos.

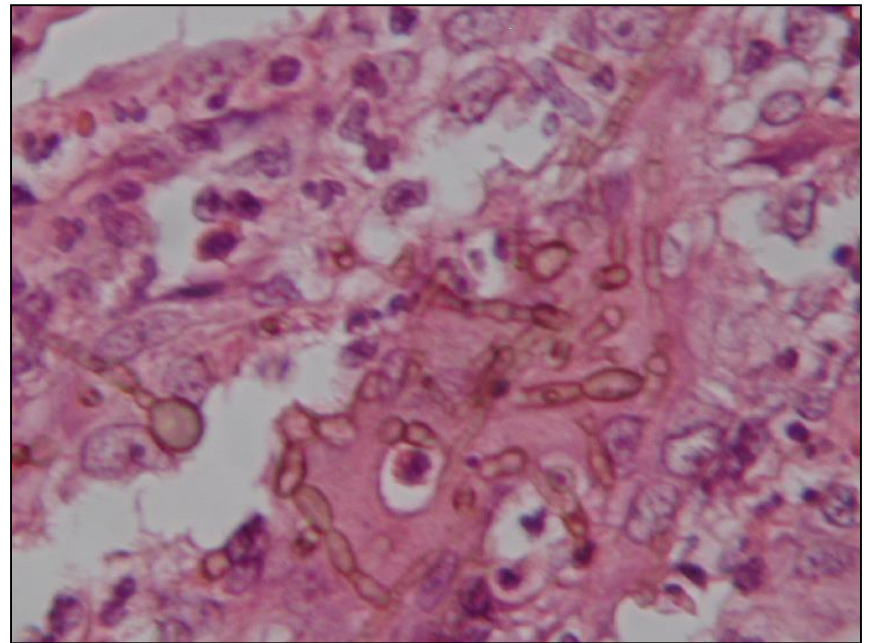
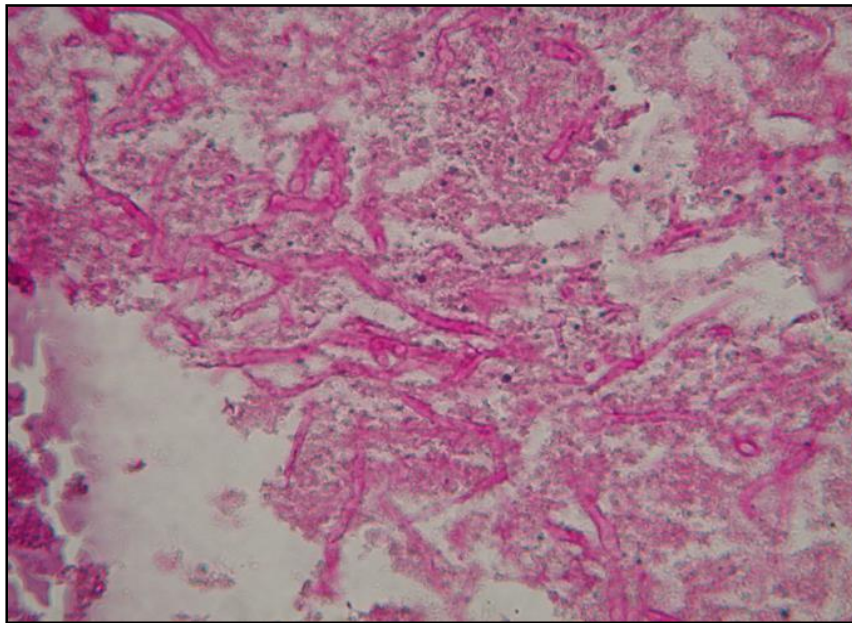
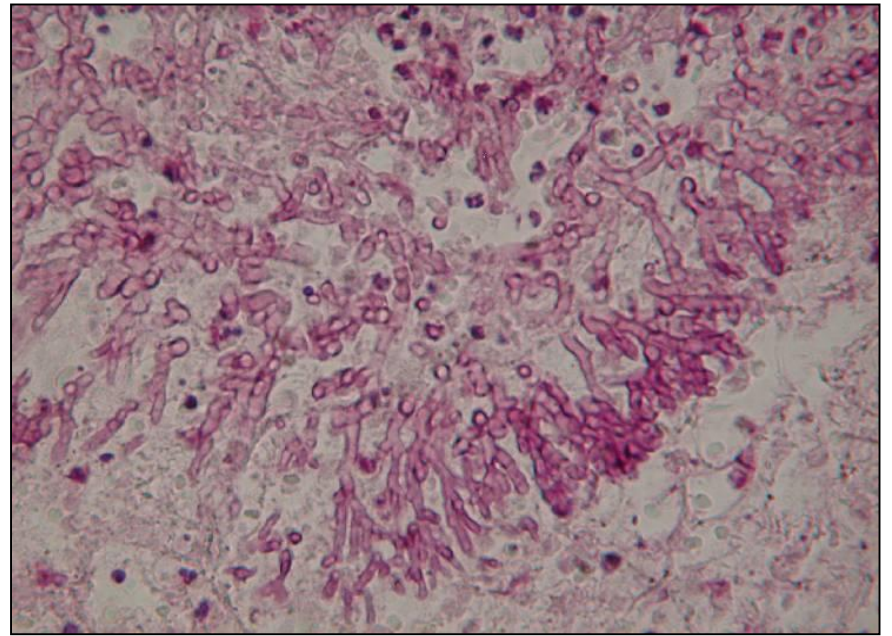
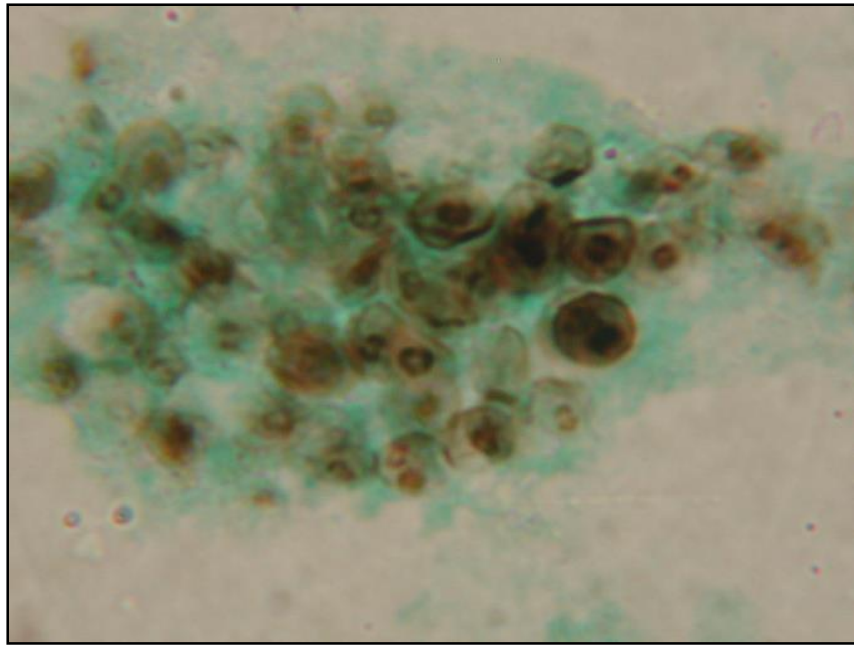
➤ Métodos moleculares: hibridación *in situ*.

Mayor sensibilidad y especificidad (en algunos casos la identificación en género y especie).

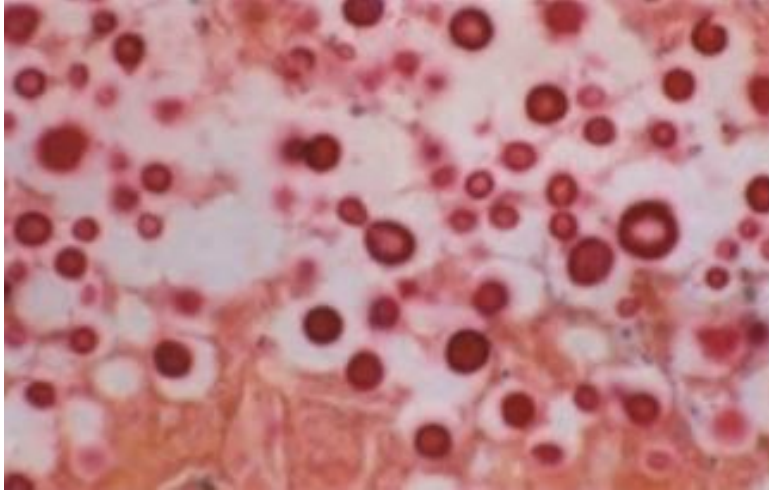
Estudios histopatológicos

- La observación de hongos en tejidos con coloraciones especiales, PAS y Grocott.
- Permiten ver la forma tisulares y estudiar el tipo de reacción inflamatoria.
- Su tiempo de procesamiento puede variar de 24 a 72 horas.
- Está en desarrollo promisorio la identificación de género y/o especie por PCR y anticuerpos específicos.





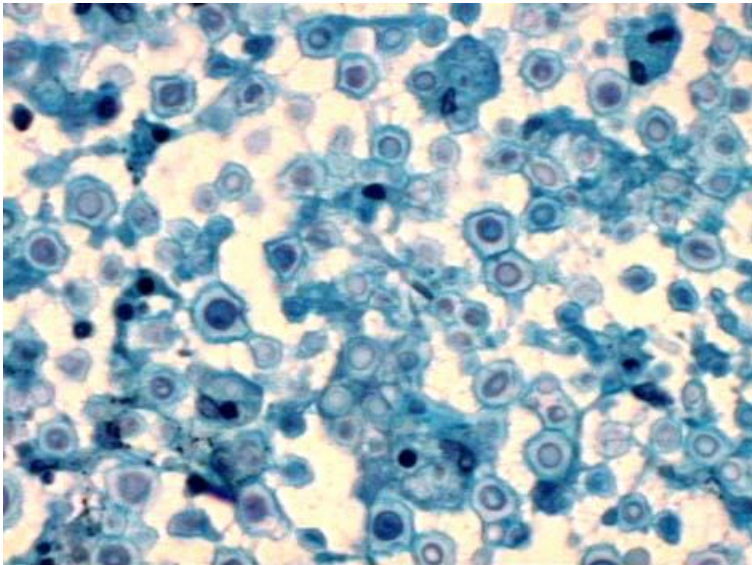
Coloraciones Histopatológicas



➤ **Mucicarmina**



➤ **Fontana Masson (detecta melanina)**



➤ **Alcian blue**

Cultivos I

❖ Sembrar entre 4 y 6 tubos por material

❖ Incubar a 28 °C o 28 y 37°C dependiendo del material y la especie fúngica.

➤ 2 - 3 semanas a 25-28°C para dermatofitos.

➤ 1 semana a 35°C para *Malassezia* spp. y *Candida* spp.

➤ En materiales profundos no descartar hasta 30 días.

Cultivos II

Los hongos se pueden identificar por

- **Morfología**
- **Pruebas bioquímicas**
- **Producción de exoantígenos.**
- **Caracterización de sus espectro de proteínas por espectrometría de masa (MALDI-TOF MS).**
- **Estudio de sus ácidos nucleicos por PCR-secuenciación.** Grupos de especies con morfología similar o las pruebas bioquímicas (concepto filogenético de especies) .

Diagnóstico micológico

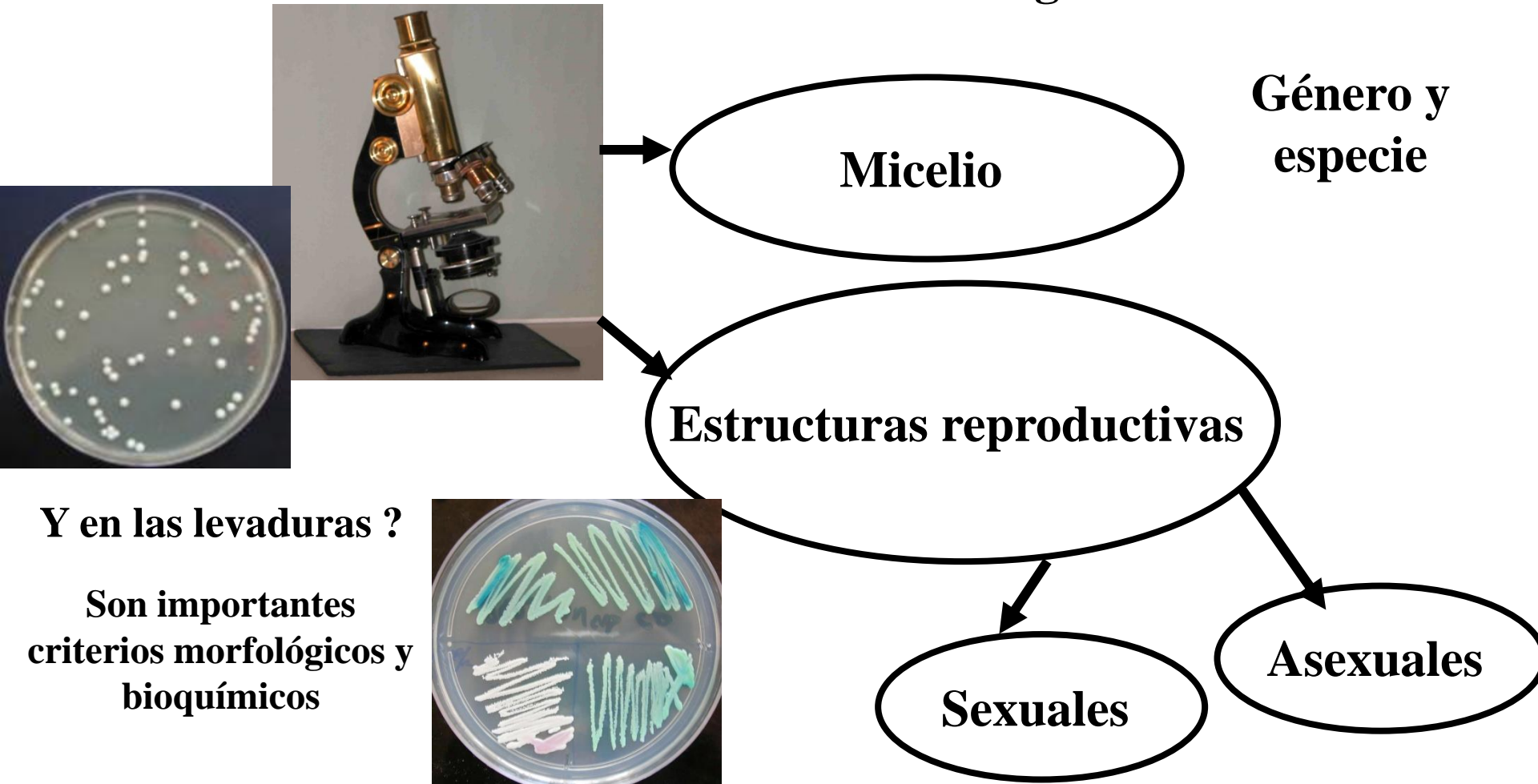
Hemocultivos

- Los métodos automatizados y de lisis-centrifugación son mas sensibles en los casos de histoplasmosis diseminadas.
- El aislamiento de hongos levaduriformes tiene un alto VPP.
- La sensibilidad es variable.
- Son positivos en mas del 60% de los pacientes con fusariosis.
- El hallazgo de *Aspergillus spp.* y otros hongos ambientales se deben interpretar con la clínica y el aislamiento en otros materiales.



Concepto morfológico o fenotípico de la especie

¿ Como se identifican los hongos en el laboratorio de microbiología ?



Y en las levaduras ?

Son importantes
criterios morfológicos y
bioquímicos



Ej. *Ajellomyces capsulatus* - *Histoplasma capsulatum*

International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants (Melbourne Code)

**Adopted by the Eighteenth International Botanical
Congress Melbourne, Australia, July 2011**

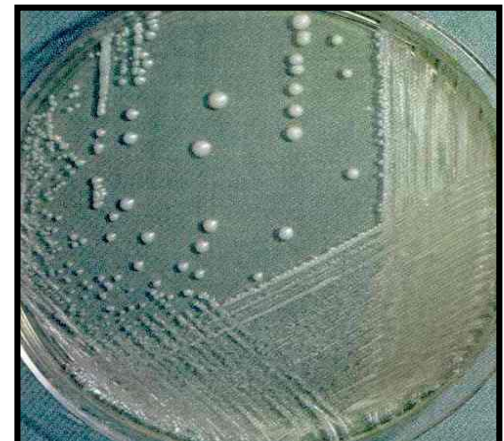
Art 59

2013 Un solo nombre para cada hongo ??

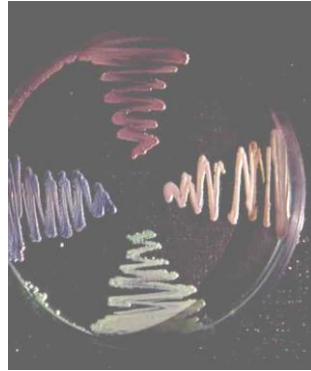
**Las reglas actuales solo permiten que los hongos
tengan un único nombre (anamorfo o teleomorfo)
con prioridad: el mas antiguo
el mas usado clínicamente (por la comunidad
científica)**

Para hongos levaduriformes géneros *Candida* y *Trichosporon*

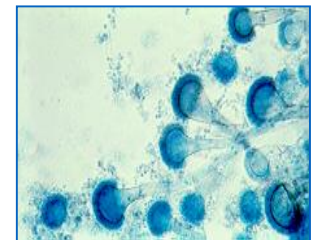
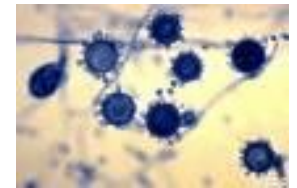
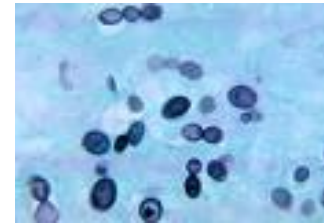
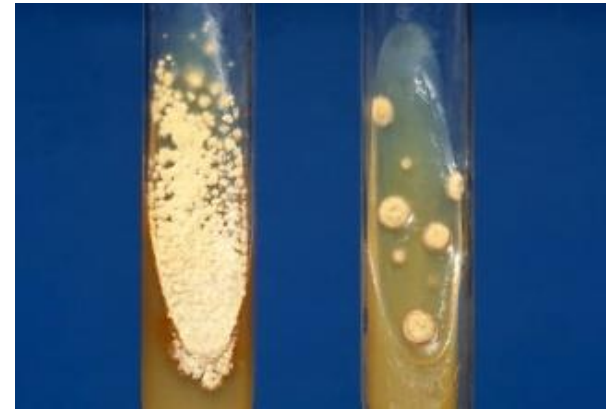
- El aislamiento primario lleva 24 a 48 hs.
- El uso de medios cromogénicos permite conocer ciertas especie en forma precoz y detectar a las infecciones mixtas al sembrar la muestra clínica.
- La identificación requiere de pruebas bioquímicas que tardan 24 a 72 hs.
- Son métodos comerciales



Concepto morfológico de especie



Cultivos



Concepto filogenético de especie

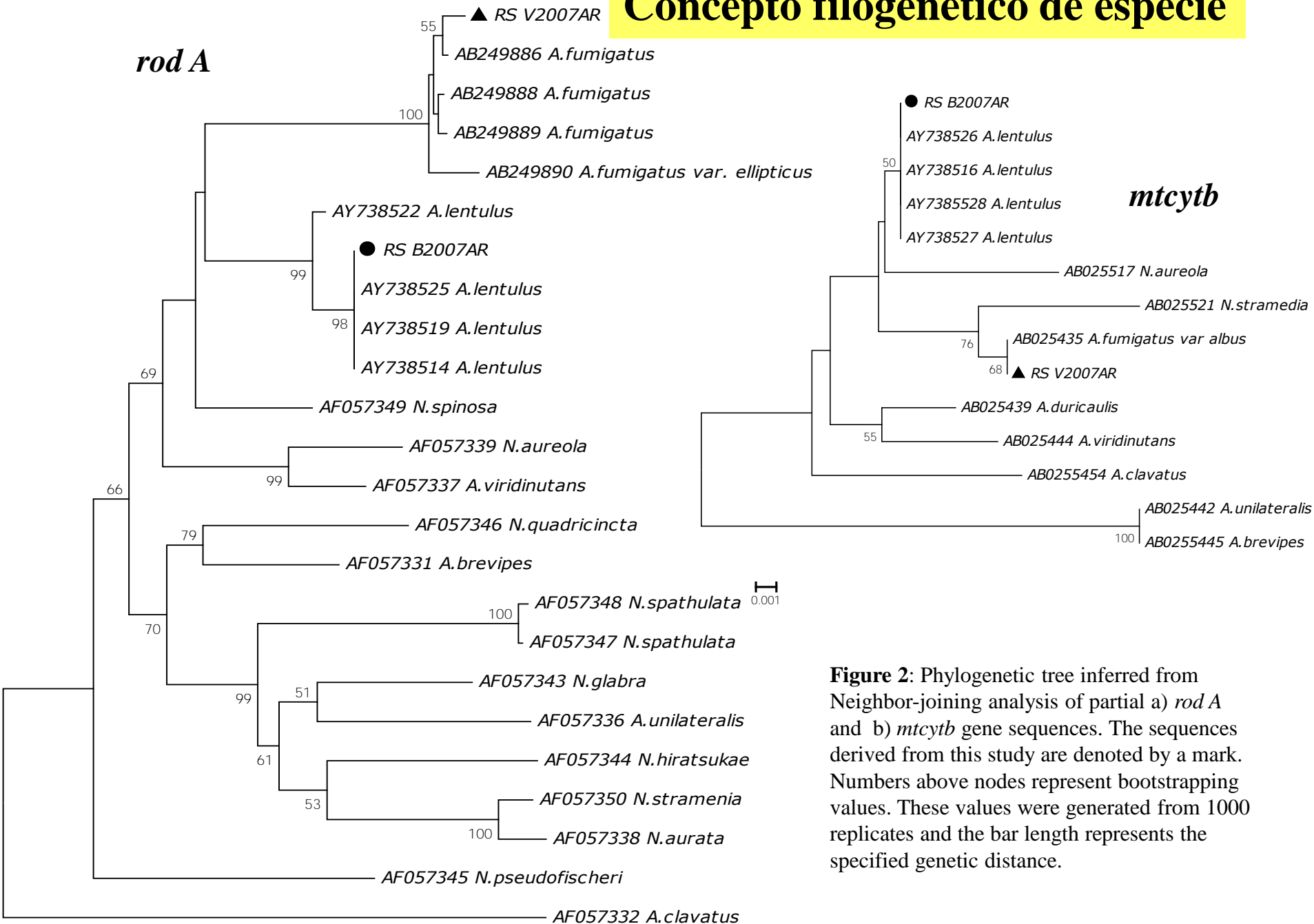
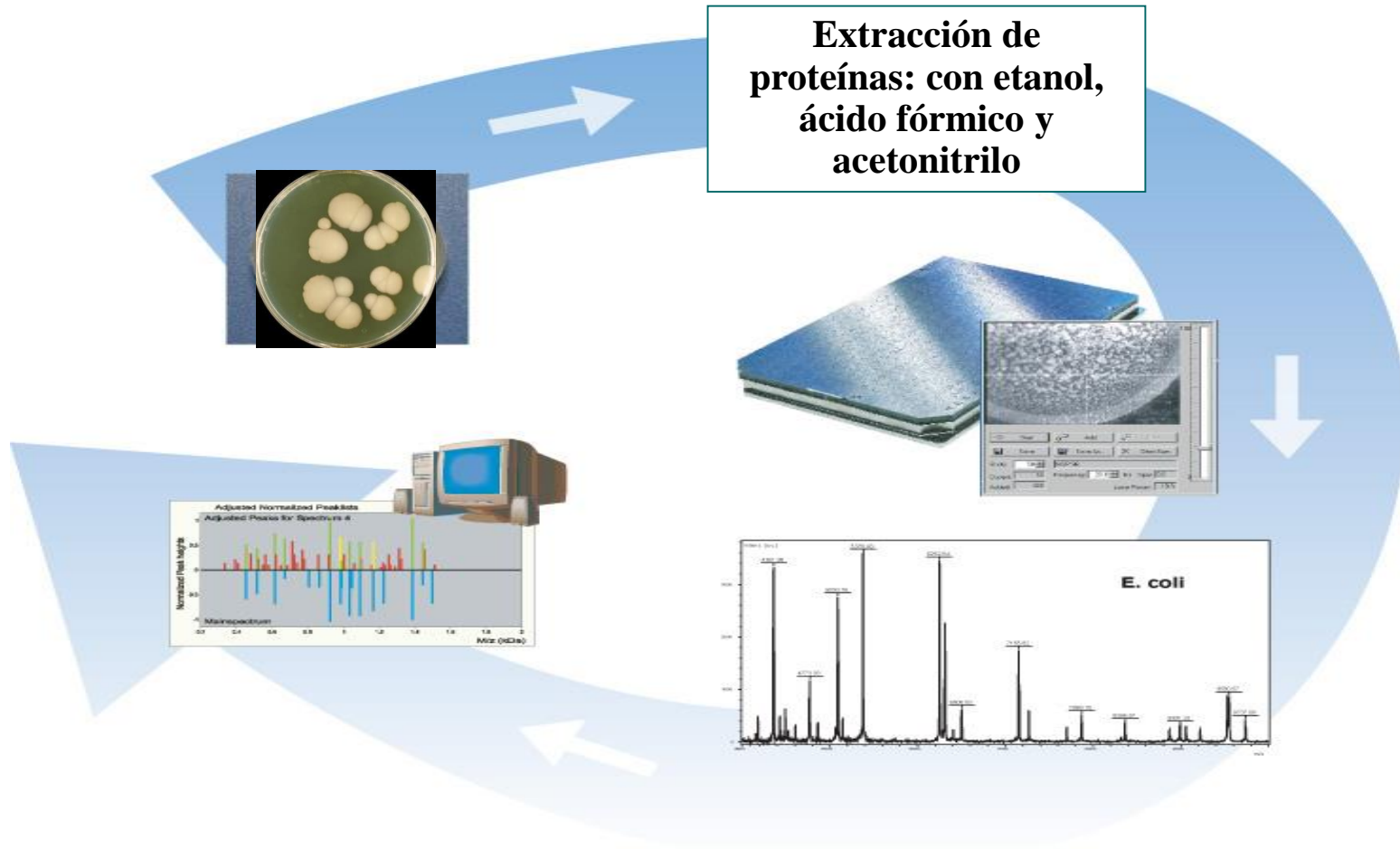


Figure 2: Phylogenetic tree inferred from Neighbor-joining analysis of partial a) *rod A* and b) *mtcytb* gene sequences. The sequences derived from this study are denoted by a mark. Numbers above nodes represent bootstrapping values. These values were generated from 1000 replicates and the bar length represents the specified genetic distance.

Espectrometría de masas *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time Of Flight Mass Spectrometry* (MALDI-TOF MS) (Bruker®)



Cultivos II

Permite

- El aislamiento del agente etiológico.
- La identificación -Concepto morfológico típico de la especie.
- La identificación molecular -Concepto filogenético de especie.
- Estudios de sensibilidad a los antifúngicos.
- Caracterizar cepas en caso de brotes intrahospitalarios- infecciones familiares- transmisión vertical (mediante técnicas moleculares PCR)- adoptar medidas de control.
- La epidemiología de la enfermedad y de la resistencia.

Dx. de certeza

Detección de ácidos nucleicos

- Técnicas no estandarizadas
- PCR para la detección de hongos (pan-fúngico)
- Detección de ac. nucleicos en diversos materiales para: MSE, *Aspergillus*, *P. jirovecii*, etc.
- PCR- real time para aspergilosis



Detección de componentes estructurales de la célula fúngica (antígenos)– BIOMARCADORES

❖ **Galactomananos en suero, LBA y LCR para *Aspergillus*.**

❖ **β (1-3) glucanos pan-fúngico.** No útil en infecciones por hongos de micelios continuos y *Cryptococcus neoformans*.

❖ **Glucuronoxilomanano (GXM) para *Cyptococcus***

❖ **Resultados rápidos (hs).**

❖ **Requiere de equipamientos y de kits.**

❖ **Sensibilidad y especificidad dependiente de la determinación. VPN**

❖ **Permiten adoptar conductas terapéuticas**

Métodos indirectos

Detección de anticuerpos: detección de IgG e IgM

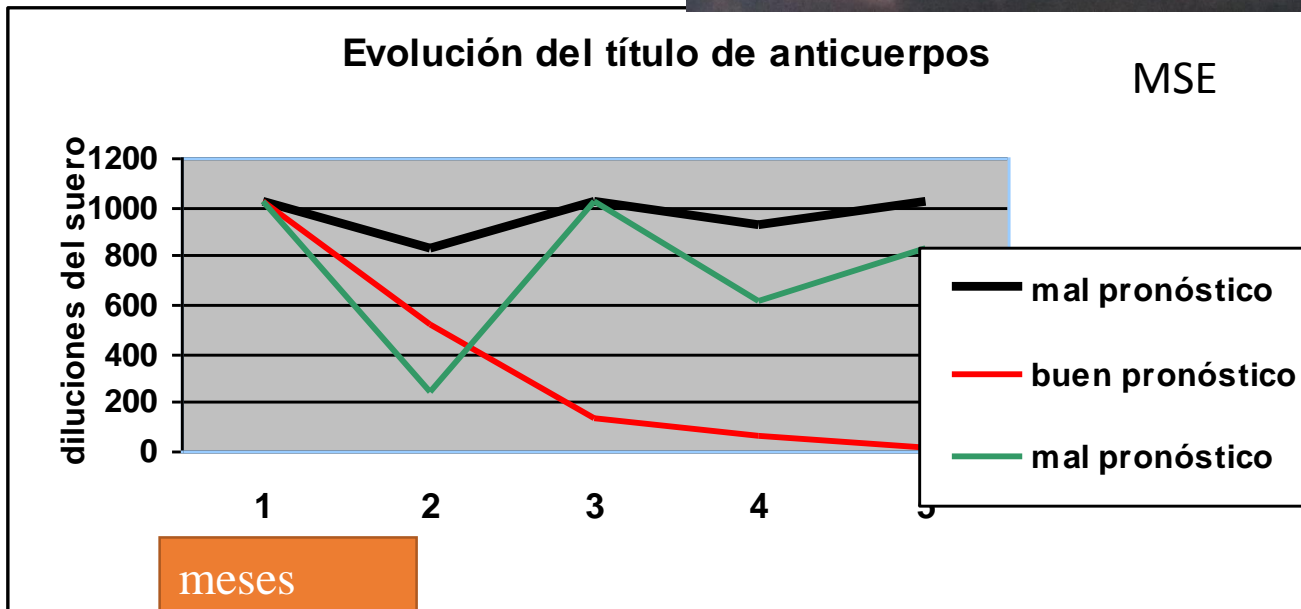
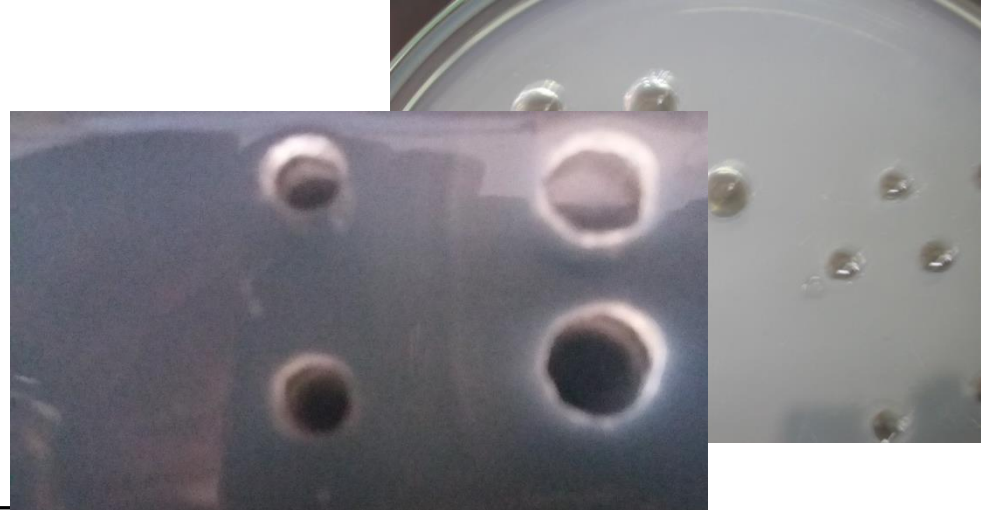
- **Útiles en micosis sistémicas endémicas.**
- **Las técnicas de precipitación son cuali-cuantitativas. Baja sensibilidad alta especificidad.**
- **Las de ELISA son presentan mayor sensibilidad y la especificidad depende de los antígenos que se utilizan.**

Detección de IgE específica para *Aspergillus* por RIA o ELISA

- **Su presencia diagnostica la aspergilosis broncopulmonar alérgica. Su cuantificación es fundamental para el seguimiento de la misma.**

Métodos indirectos

❖ Detectan IgM e IgG
Inmunodifusión- CIE
Elisa



Útiles en individuos
inmunocompetentes
para adoptar
conductas
terapéuticas

❖ Detección de IgE específica para *Aspergillus* por RIA o ELISA: importante a la hora de Dx. Aspergilosis Broncopulmonar Alérgica (ABPA) y para su seguimiento.

Interpretación de los resultados

- **Correlacionar con la clínica-factores de riesgo- epidemiología.**
- **Aislamiento por cultivos de hongos con examen microscópico directo negativo - Correlacionar con la clínica.**
- **El aislamiento de *A. fumigatus* y *A. flavus* de muestras respiratorias tiene VPP en pacientes neutropénicos.**
- **El aislamiento de hongos del género *Candida* solo tiene valor diagnóstico si el aislamiento proviene de sitio estéril.**
- **Observación de hongos con micelio cenocítico- Adoptar conductas urgentes por el carácter agudo y con desenlace fatal de estas infecciones .**

**Un diagnóstico micológico precoz
posibilitará un uso racional de los
antifúngicos y limitará el desarrollo de
la resistencia.**

CONCLUSIONES FINALES

El diagnóstico micológico clásico es aun hoy la forma mas segura de confirmar la enfermedad fúngica e identificar al agente etiológico.

La recuperación por cultivo del hongo permite:

- Elegir el tratamiento mas adecuado de acuerdo a su género y especie.**
- Estudiar la sensibilidad a los antifúngicos.**
- Caracterizar a las cepas por estudios moleculares y su implicancia en brotes intrahospitalarios.**
- Establecer medidas de control.**

Conclusiones Finales

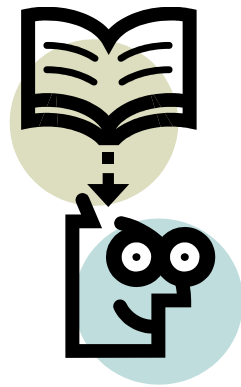
Detección de bio-marcadores

- La búsqueda de antígenos capsulares (GXM) de *C. neoformans* es diagnóstico (S y E alta)
- La cuantificación de galactomananos de *Aspergillus* en pacientes oncohematológicos son útiles para su estratificación.
- La detección de β 1-3 glucanos es útil como prueba pan fúngica, excepto en infecciones por hongos de micelios continuos y levaduras capsuladas.
- Búsqueda de anticuerpos
- La detección de anticuerpos en pacientes “inmunocompetentes” útil en la toma de conductas terapéuticas.

Conclusiones Finales

Las técnicas moleculares son aun hoy promisorias:

- **No están estandarizadas.**
- **La utilidad es variable en los hospederos inmunocomprometidos.**
- **Son útiles en la caracterización de brotes ante infecciones intrahospitalarias.**



Muchas Gracias