

# PATÓGENOS FÚNGICOS CAUSANTES DE MICOSIS OPORTUNISTAS - I

---

CANDIDIASIS – CRIPTOCOCCUS –  
PNEUMOCYSTIS -

# Esta definición lleva implícito tres conceptos:

---

- 1 – Los hongos productores de micosis oportunistas, tienen una amplia distribución en la naturaleza y muchas veces pueden ser aislados en muestras de personas sanas .-
- 2 – Su aislamiento per se no implica diagnóstico seguro de enfermedad.-
- 3 - Causa principal que determina la enfermedad: es la disminución de las defensas del huésped.

# Criterios para el diagnóstico de esta enfermedad:

---

- 1 – Hallazgos repetidos del mismo hongo, en los exámenes directos de los materiales obtenidos de las lesiones con máxima asepsia.-
- 2 – Confirmación reiterada de su presencia en los cultivos.-
- 3 – Reconocimiento de factores predisponentes que faciliten la agresión del hongo.-
- 4 – Cuadro clínico compatible con el diagnóstico presentado.

# CANDIDIASIS INVASORA

---

# Principales grupos y/o factores predisponentes de Candidiasis invasiva.

- Neutropenia (> 7 días)
- Patologías oncohematológicas.
- Tumores sólidos.
- Pacientes en UTI o post – quirúrgicos.
- Cateterización intravenosa prolongada.
- DBT mellitus.
- Nutrición parenteral.
- Quemados.
- Neonatos.
- ATB o corticoides.

# MÉTODOS DIAGNÓSTICOS

## IDENTIFICACIÓN DE LEVADURAS

### CONVENCIONAL

- Características morfológica
- Características fisiológica y bioquímicas

### MOLECULAR-ADN

- Análisis de secuencias y otros métodos basados en ADN

### PROTEOMICA-MALDI-TOF

- Análisis de los perfil proteicos

# IDENTIFICACIÓN CONVENCIONAL

## Características morfológicas - Macromorfología

*Rhodotorula sp.*



Colonia cremosa pigmentada de color rosa o salmón

*Trichosporon sp.*



Colonia color crema, cerebriformes, generalmente secas.

*Cryptococcus sp.*



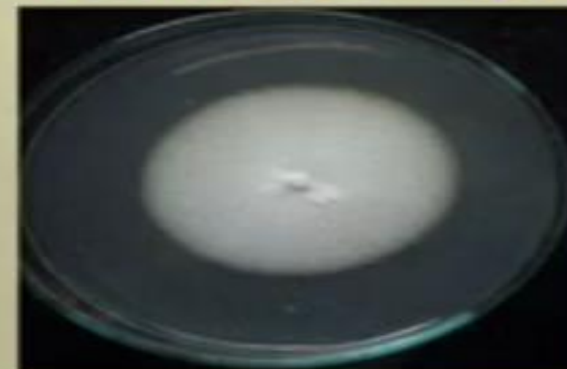
Colonia mucosa o cremosa de color crema

*Candida sp. y otros géneros*



Colonia cremosa de color blanco o crema

*Geotrichum sp.*



Colonia de color blanco, seca, plana, vellosa

# IDENTIFICACIÓN DE LEVADURAS

MICROMORFOLOGIA



## • IDENTIFICACIÓN PRESUNTIVA

CHROMagar candida

Formación de tubo germinativo

Formación de Clamidoconidias.

Prueba de ureasa.

Agar semillas de girasol.

Asimilación y fermentación de trehalosa

## • IDENTIFICACIÓN DEFINITIVA

◆ ID 32 C

◆ API 20 C

◆ VITEK

COMERCIALES

Pruebas de fermentación y asimilación  
de compuestos carbonados y  
nitrogenados

REFERENCIA



# *Candida spp.*

Cultivo 24 - 48 h  
25-28 °C  
Agar Sabouraud



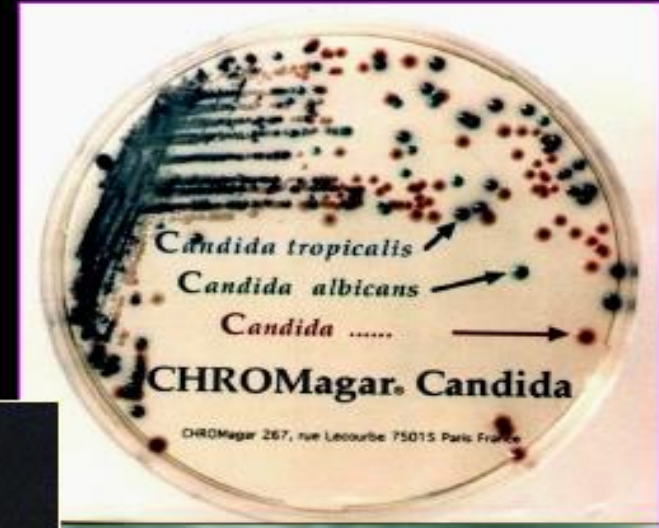
*Candida krusei*



*Candida albicans*

otras

*Candida tropicalis*



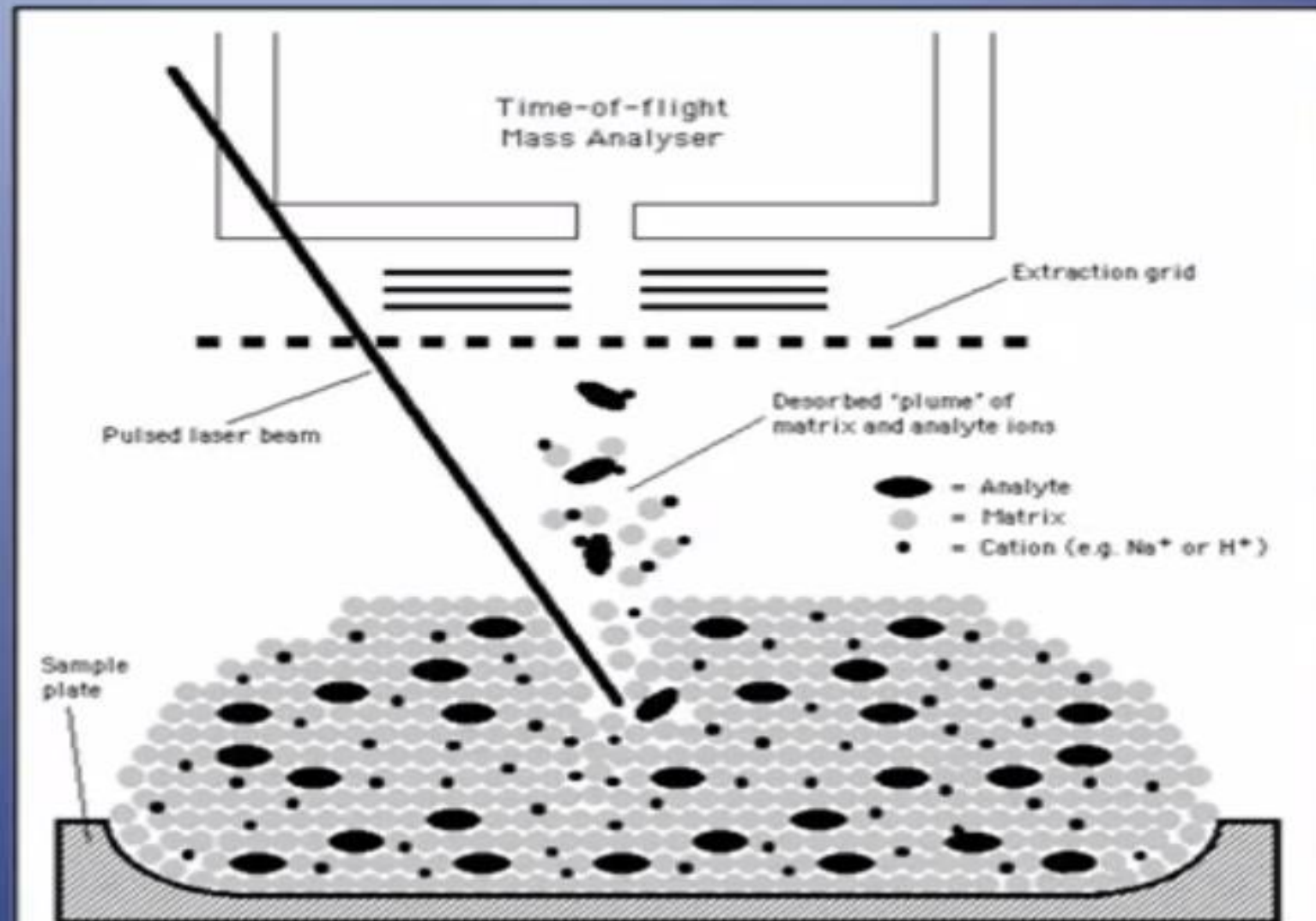
Cultivo de 24  
h 25 - 28 °C

# IDENTIFICACIÓN MOLECULAR BASADA EN ADN

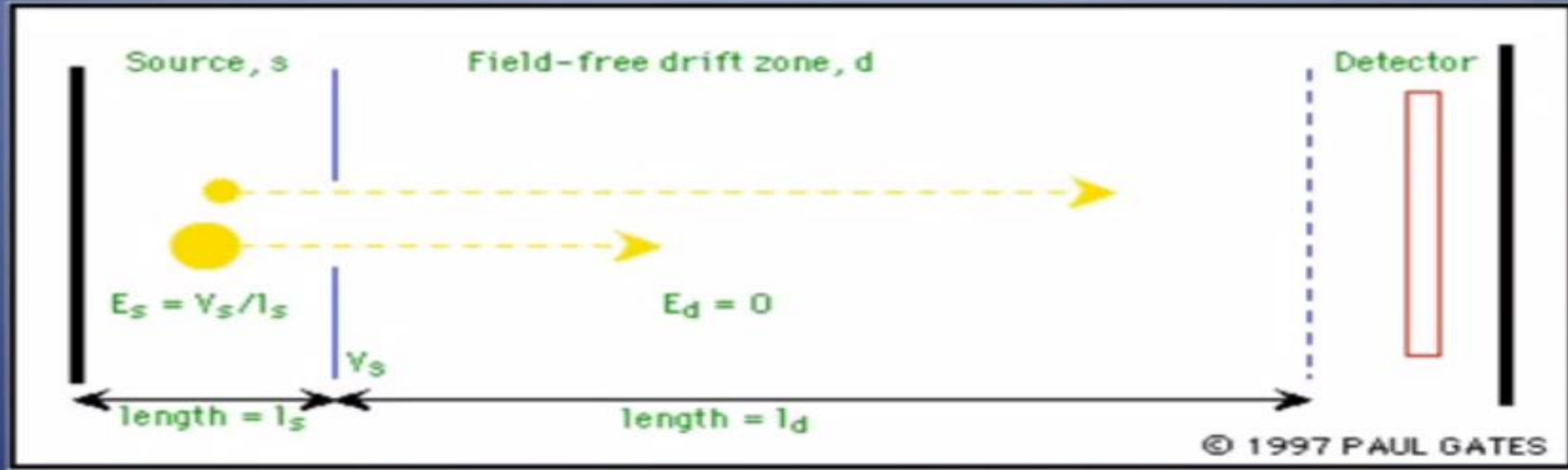
- PCR CON PRIMERS ESPECÍFICOS
- PCR-RFLP
- PCR-SECUENCIACIÓN CON PRIMERS PANFÚNICOS

# Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization (MALDI)

Se generan iones simples cargados a partir del bombardeo con un láser de los cristales formados por las moléculas analito y un exceso de moléculas ácidas (matriz) que absorben la energía del láser. Permite ionizar y vaporizar biomoléculas grandes, no volátiles, como proteínas enteras. Luego, los iones son acelerados por un campo eléctrico.



# Analizador de Tiempo de Vuelo (*Time-of-flight TOF*)



Las moléculas se desplazan a una velocidad que depende de su masa/carga hasta llegar al detector. Cuando la carga siempre es 1, las moléculas se desplazan proporcional a su masa, moléculas más pequeñas llegan antes al detector que moléculas más grandes.

# Ventajas MALDI-TOF

- Rápido
- Reproducible
- Fácil de usar
- Se puede usar para un amplia variedad de cultivos de microorganismos (bacterias y hongos)
- Aplicable a laboratorios clínicos

## **Tener en cuenta:**

- Es importante tener una buena base de datos para comparación de perfiles. Se obtienen mejores resultados con base de datos in-house
- Cambios en los protocolos pueden generar cambios en los perfiles

# Complejo *Candida albicans*

## (*C. albicans* / *C. dubliniensis* / *C. africana*?)

*C. dubliniensis* fue descrita por Sullivan et al 1995 basado en la clasificación realizada por DNA fingerprinting, RAPD, PFGE y secuenciación del LSU del ADN ribosomal

	<i>C. albicans</i>	<i>C. dubliniensis</i>
Crecimiento a 45°C	Variable	-
CHROMagar	Verde	Verde oscuro
Clamiconidias (Agar harina de maíz)	+	+ (agrupadas en tripletes)
API 20C: • $\alpha$ -methyl-D-glucosido • Xilosa	Variable Variable	- -
Agar tabaco	Colonia crema con escasos o ningún clamidoconidia	Colonia marrón con abundantes clamidoconidias

**Table 1**  
Proposed phenotypic scheme for presumptive identification of cryptic *Candida* species.

CHROMagar <i>Candida</i>				GT	CHL	PM	Species
Dark green	Light green	Pink	White				
	+			+	+	+	<i>C. albicans</i>
+				+	+	+	<i>C. dubliniensis</i>
+				-	-	+	<i>C. dubliniensis</i> group I <sup>a</sup>
	+			-	-	+	<i>C. dubliniensis</i> group I <sup>a</sup>
	+			+	-	+	<i>C. africana</i>
		+		+	+	+	<i>C. dubliniensis</i> group II <sup>a</sup>
		+		-	-	-	<i>C. glabrata</i>
			+	-	-	-	<i>C. nivariensis</i> / <i>C. braccarensis</i>
			+	-	-	+	<i>C. parapsilosis</i> complex
		+		-	-	+	<i>C. orthopsilosis</i> <sup>b</sup>

GT = germ-tube formation in fetal bovine serum; CHL = chlamydospore production on corn-meal-agar plus 1% Tween 80; PM = pseudomycelium.

<sup>a</sup> Albaina et al. (2015).

<sup>b</sup> Robl et al. (2014).

Criseo et al 2015

La identificación convencional no permite distinguirlas de manera certera.

La identificación molecular puede realizarse por RAPD, PCR-RFLP, PCR multiplex y por secuenciación de la región D1/D2 del 26S o de las regiones ITSs. *C. africana* es difícil de separar aún por secuenciación.

La identificación por MALDI-TOF permite distinguir *C. albicans* de *C. dubliniensis* pero no puede diferenciar *C. albicans* de *C. africana*.

# CANDIDA EN ORINA

Recogida por punción

**LEVADURAS EN EL EXAMEN DIRECTO Y EN EL CULTIVO**

**Candidiasis diseminada**

**Candidiasis profunda localizada**

Recogida por cateterización

**RECUENTOS DE LEVADURAS  $\geq 10.000$  UFC/ ml**

**Existe correlación clínica (tiempo de colocación de la sonda, tipo de sonda, internación en terapia intensiva).**

¿Infección urinaria? **Confirmar**



# CANDIDA EN MATERIALES DE ORIGEN RESPIRATORIO

**Esputo**

**Biopsias**

**BAL**

LEVADURAS EN EL EXAMEN DIRECTO Y EN EL CULTIVO

RECUENTOS DE LEVADURAS  $\geq 100.000$  UFC/ ml

**Candidiasis pulmonar**

**Diagnóstico presuntivo  
Candidiasis pulmonar**

**Confirmación por biopsia**





# CANDIDA HOSPEDEROS INMUNOCOMPETENTES

\* 15 UFC/ ml  
(Maki)-  
1000 UFC/ ml  
(Brun-Buisson)

## Puerta de entrada

Sonda

Catéter

Orina por punción

Catéter positivo \*

Retrocultivo positivo  
Hemocultivo negativo

Levaduras en el  
examen directo y  
en el cultivo

Colonización del  
catéter

Retirar el  
catéter

Hemocultivo

Infección de vías urinarias  
superiores (vejiga y/o riñón)

Negativo

Positivo

Colonización

Diseminación

MEDIANTE TÉCNICAS  
MICROBIOLOGICAS  
INDEPENDIENTES DEL CULTIVO

## DIAGNÓSTICO MICOLÓGICO

NUEVAS METODOLOGÍAS

✓ BIOMARCADORES: ANTÍGENOS  
✓ GALACTOMANANO, ELISA

✓ (1 → 3) - β - D - GLUCANOS

TÉCNICAS MOLECULARES: PCR

# Criptococcus

# Epidemiología

- ❖ *C. neoformans* es ubicuo.
- ❖ Produce infecciones humanas en todo el planeta.
- ❖ La mayoría de las criptococosis se observan en pacientes con SIDA o en receptores de trasplantes (déficit de inmunidad celular adaptativa)

# **CRIPTOCOCOSIS**



**PAPULAS**



# PROCESAMIENTO DE LCR/ OTROS LÍQUIDOS DE PUNCIÓN

## Características del LCR en Criptococosis

- Cristal de roca
- Hipoglucorraquia
- Hiperproteíorraquia
- Pleocitos linfocitaria



2000-3000 r.p.m.  
10-15 minutos



Sedimento



Sobrenadante



Ex. directo  
y  
cultivo

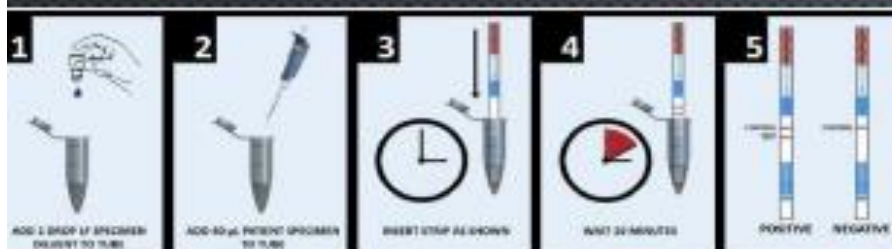


Inmunodiagnóstico

# INMUNODIAGNOSTICO

## DETECCIÓN DE ANTÍGENO CAPSULAR DE *CRYPTOCOCCUS*

S



### Inmunocromatografía

- ❖ Rápida y fácil de leer
- ❖ Mejor para pruebas cualitativas
- ❖ Mayor costo
- ❖ Se puede usar en LCR, suero, orina



LFA: cryptococcal antigen lateral flow assay

Sobrenadante del LCR

### LFA CrAg Performance Summary

- Serum:
  - Sensitivity: Median 100% (96.6%-100%)
  - Specificity: Median 98.0% (95.4%-100%)
- CSF:
  - Sensitivity: Median 100% (96.2%-100%)
  - Specificity: Median 96.4% (93.5%-100%)
- Plasma:
  - Sensitivity: Median 100% (98.5%-100%)
  - Specificity: Median 95.8% (91.5%-100%)
- Urine:
  - Sensitivity: Median 98.0% (70.3-99%)
  - Specificity: Median 98.3% (98.3%-98.3%)

## Ex. Directo

## Cryptococcosis meningea



**-TINTA CHINA**



sedimento

Igual vol. de Tch y agua destilada  
Azida sodica 1:1000 (conservante)  
Tween 80 al 0,5%(dispersante)

### **-CULTIVO:**

Sab miel con ATB  
(Agar semilla girasol)

### **-INCUBACIÓN:**

a 28°C y 35-37°C

De 24 h a 3-4 semanas



**Sensibilidad:**

**50-60% en HIV-**

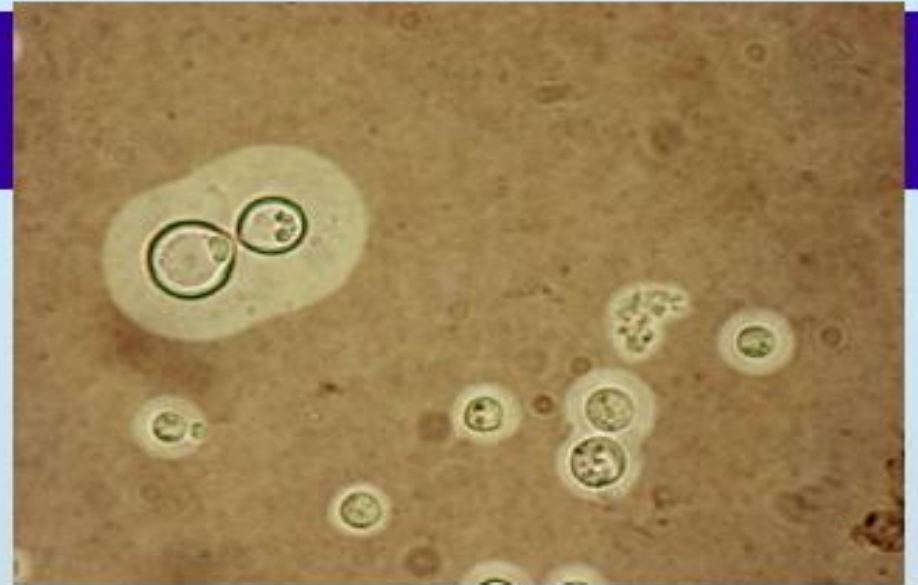
**80% en HIV+**

**Depende del  
volumen enviado**



**si vemos**

Informamos: **Levaduras  
capsuladas compatibles con  
*Cryptococcus neoformans***



**SIEMPRE ES PATOGNOMÓNICO Y DEBE SER  
INFORMADO A LA BREVEDAD**

# Caso Clínico N° 1

---

Paciente de sexo femenino de 44 años de edad con diagnóstico de Arteritis de Takayasu de 16 años de evolución.

Suboclusión de arteria subclavia izquierda y oclusión completa de arteria vertebral derecha. Tratamiento Prednisona 40 mg día y Ciclofosfamida 150mg día vía oral. Luego sin controles por ocho años

Angiorresonancia: oclusión total de arteria subclavia izquierda; se coloca by-pass carotideo-subclavio izquierdo en mayo 2009. Reinicia ciclofosfamida VO que luego abandona.

Año 2011: nuevo control con reactantes de fase aguda acelerados por lo que reinicia ciclofosfamida VO.

Año 2012: sigue con reactantes de fase aguda acelerados, se asume como refractaria a ciclofosfamida por lo que se suspende e inicia Metotrexato 20 mg/ semana intramuscular

# Caso Clínico N° 1

Enero 2013: suspende Metotrexato por decisión propia, reiniciando en marzo 2013.

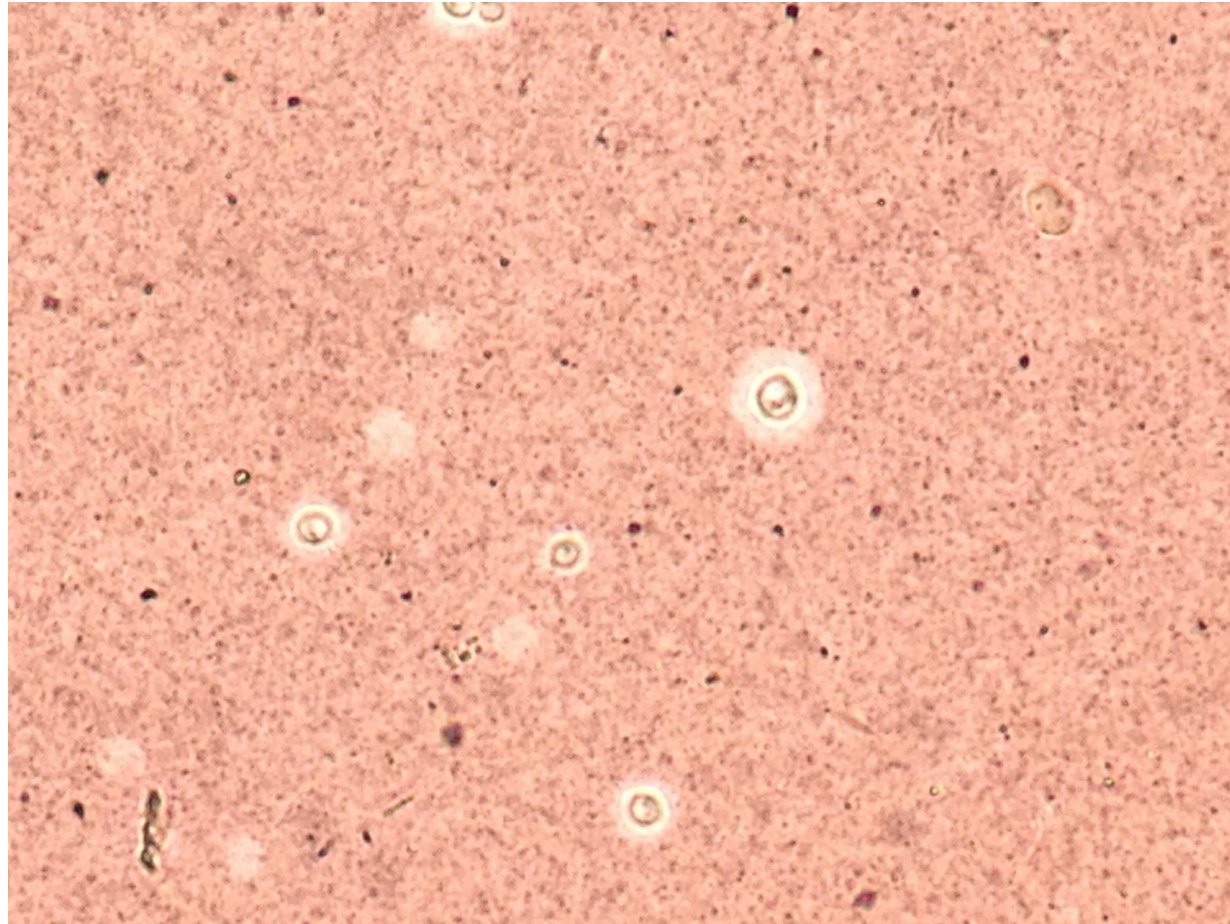
Agosto 2013: estenosis de arterias renales por angiorresonancia por lo que inicia Meprednisona 40 mg/ día y Ciclofosfamida 1 gr/ mes endovenoso (6 meses).

Diciembre 2013: descende dosis de Meprednisona a 20/mg día.

Datos de Laboratorio Enero 2014: GB 4.500 (80/2/0/16/2), **Hto 31%** **HB 9,7mg/dl** plaquetas 180.000 **VSG + 120 mm** Urea 0,43 gr/l Creatinina 1,16 mg/dl Ionograma 135/3,9/106 **PCRva 60 mg/l** **LDH 673 U/L** GOT 18 UI/L GPT 37 UI/l **Gama-GT 151 UI/L** Fal 71 UI/. Bb total 0,13 mg/dl

En enero 2014 la paciente presenta un cuadro meníngeo por lo que se decide realizar una punción de LCR.

# Caso Clínico N° 1: Tinta China



## Caso Clínico N° 1: Pruebas bioquímicas e identificación

---

Urea : Positiva

Agar semilla de girasol

Crecimiento a 28°C y 37°C

Vitek

Detección de Antígeno capsular y cuantificación

***Criptococcus albidus***

# NEUMOCISTOSIS

Agente causal: género *Pneumocystis*

Incorporado al Reino Fungi.

Se trata de organismos incultivables, eucariotas ubicados inicialmente entre los protozoarios.-

Cada especie animal se infecta de una determinada especie, para los seres humanos, el agente etiológico se llama ***Pneumocystis jiroveci.-***

La fuente de infección no es bien conocida, se sospecha que es interhumana.

La portación de *P. jiroveci* no es prolongada, y las personas se infectarían en un lapso próximo a los episodios agudos de neumocistosis.-

El *P. jiroveci* puede invadir distintos órganos y tejidos, provocando infecciones diseminadas, por lo general se presenta como una neumopatía aguda grave

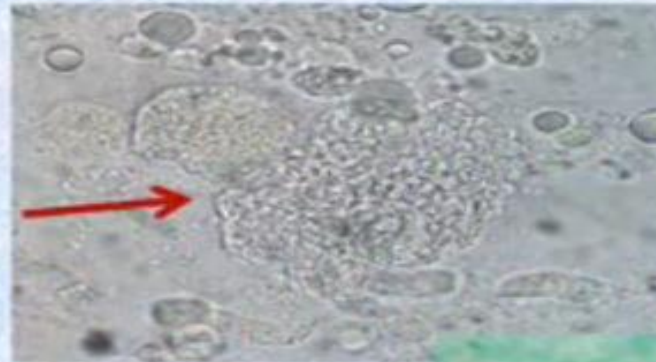
Distribución mundial. Afecta a individuos inmunodeprimidos, prematuros y niños desnutridos



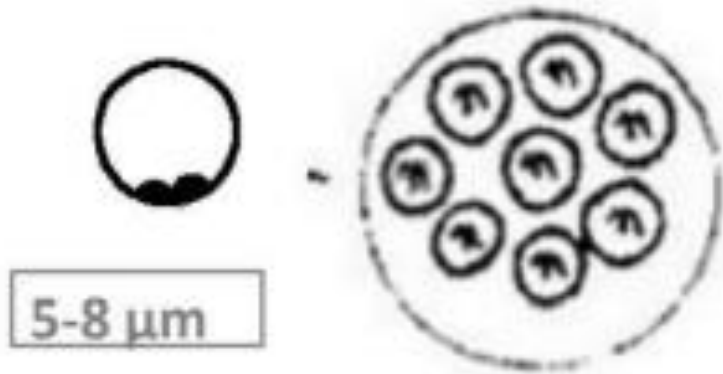
# Diagnóstico

**Gold standard** para el diagnóstico de PjP es la observación microscópica del microorganismo:

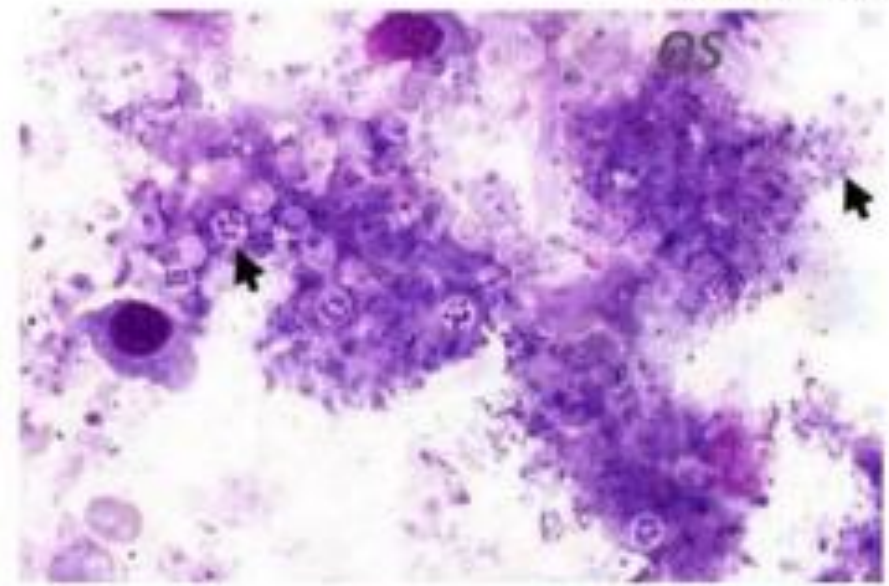
- **Directo del material**
- **Grocott y Gomori** (quiste)
- **Azul de O-toluidina** (quiste)
- **Gram Weigert** (quiste y trofozoito)
- **Giemsa** (trofozoito)
- **Técnicas de fluorescencia:**
  - Blanco de calcoflúor**  
(detecta quistes)
  - Inmunofluorescencia directa**  
con anticuerpos monoclonales  
(detecta quistes y trofozoitos).



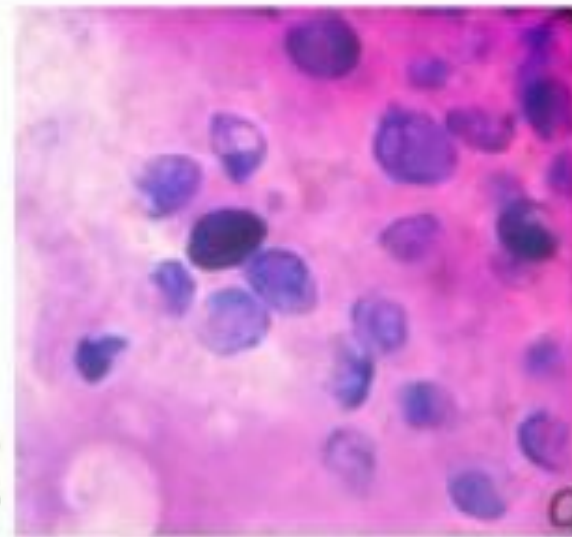
*Pneumocystis jirovecii*



GIEMSA

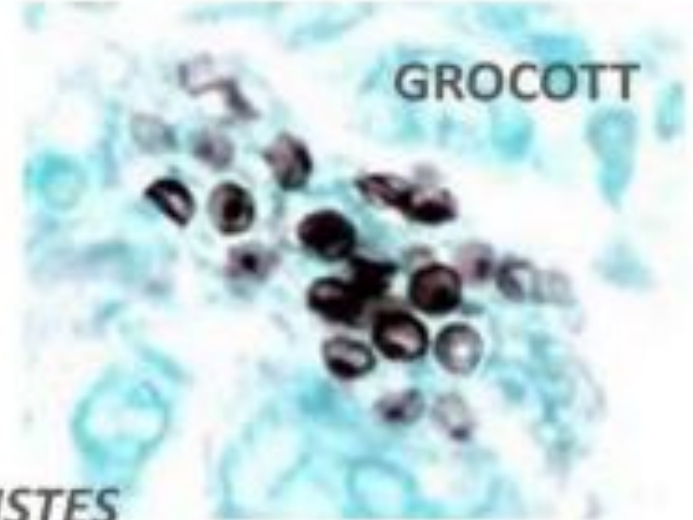


GRAM-WEIGERT



QUISTES

GROCOTT



MUCHAS GRACIAS

---