

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

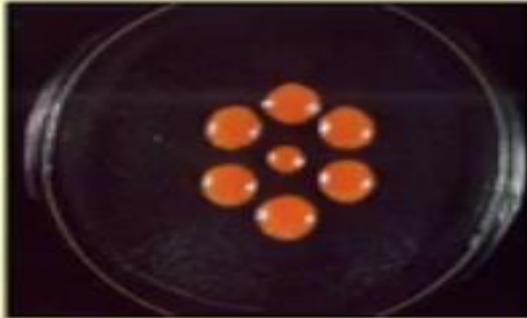
PROTEOMICA-MALDI-TOF

- Análisis de los perfil proteicos

IDENTIFICACIÓN CONVENCIONAL

Características morfológicas - Macromorfología

Rhodotorula sp.



Colonia cremosa pigmentada de color rosa o salmón

Trichosporon sp.



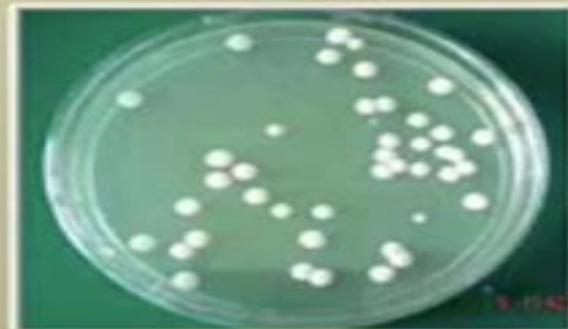
Colonia color crema, cerebriformes, generalmente secas.

Cryptococcus sp.



Colonia mucosa o cremosa de color crema

Candida sp. y otros géneros



Colonia cremosa de color blanco o crema

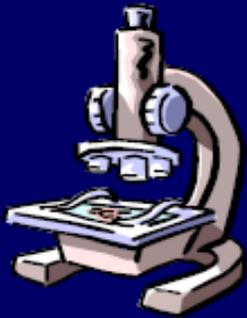
Geotrichum sp.



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



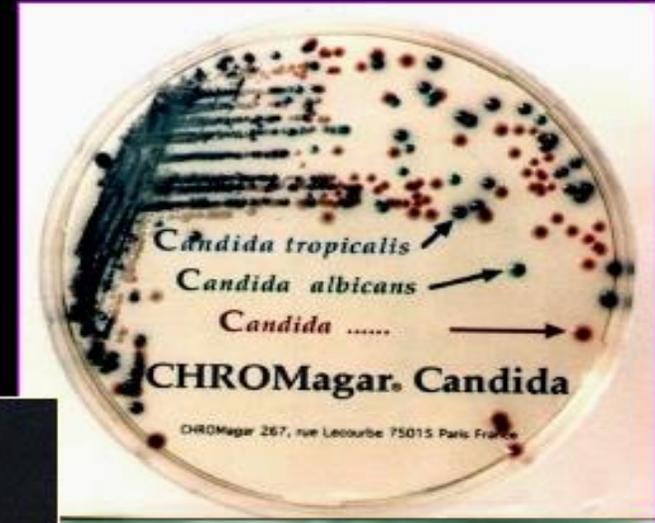
Candida krusei



Candida albicans

otras

Candida tropicalis



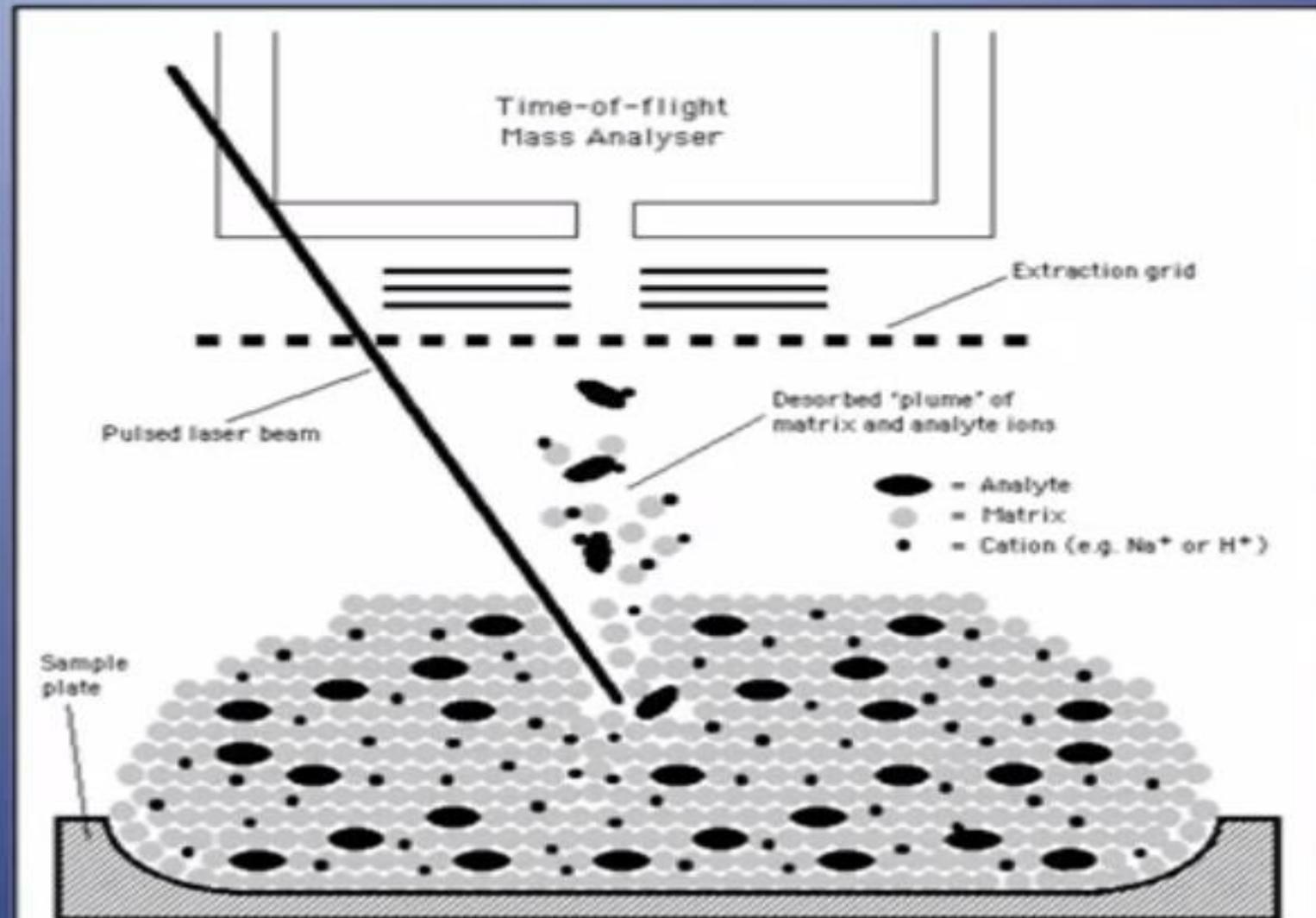
Cultivo de 24
h 25 - 28 °C

IDENTIFICACIÓN MOLECULAR BASADA EN ADN

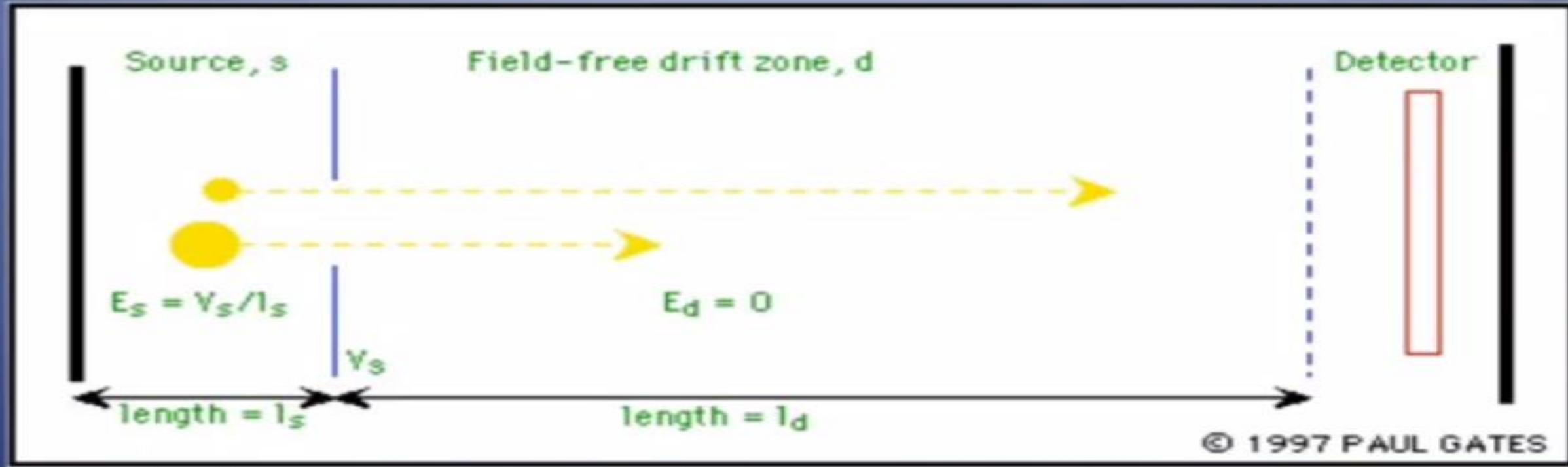
- PCR CON PRIMERS ESPECÍFICOS
- PCR-RFLP
- PCR-SECUENCIACIÓN CON PRIMERS PANFÚNICOS

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: • α -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 ^a
	+			-	-	+	<i>C. dubliniensis</i> group I ^a
	+			+	-	+	<i>C. africana</i>
		+		+	+	+	<i>C. dubliniensis</i> group II ^a
		+		-	-	-	<i>C. glabrata</i>
			+	-	-	-	<i>C. nivariensis</i> / <i>C. braccarensis</i>
			+	-	-	+	<i>C. parapsilosis</i> complex
		+		-	-	+	<i>C. orthopsilosis</i> ^b

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

^a Albaina et al. (2015).

^b 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 ≥ 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

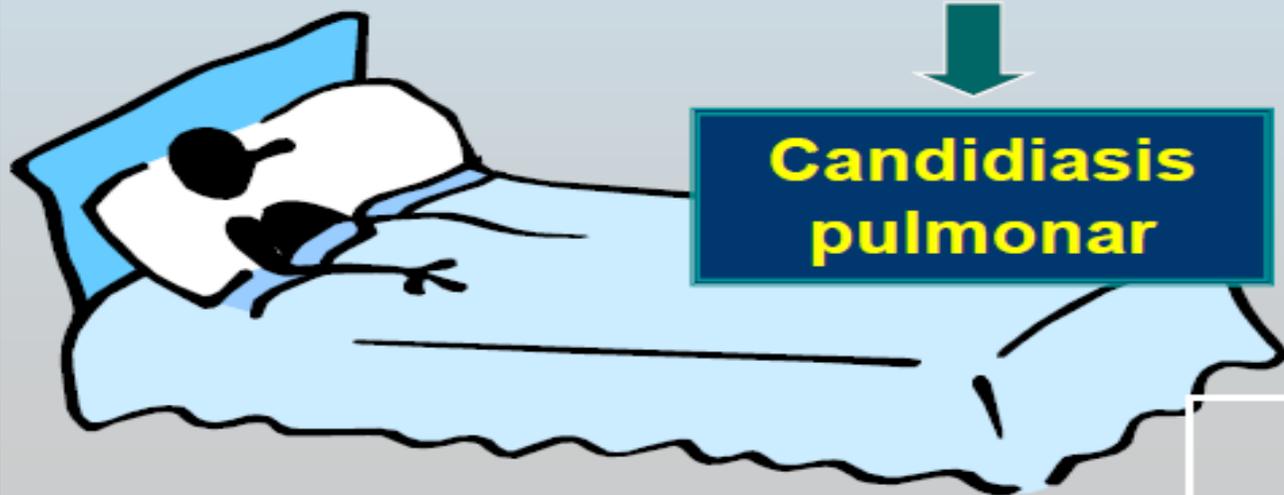
LEVADURAS EN EL EXAMEN DIRECTO Y EN EL CULTIVO

RECUENTOS DE LEVADURAS ≥ 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

Ex. directo y cultivo

Sobrenadante

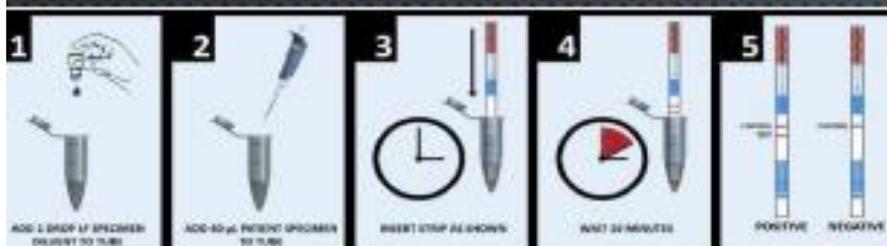


Inmunodiagnóstico

INMUNODIAGNOSTICO

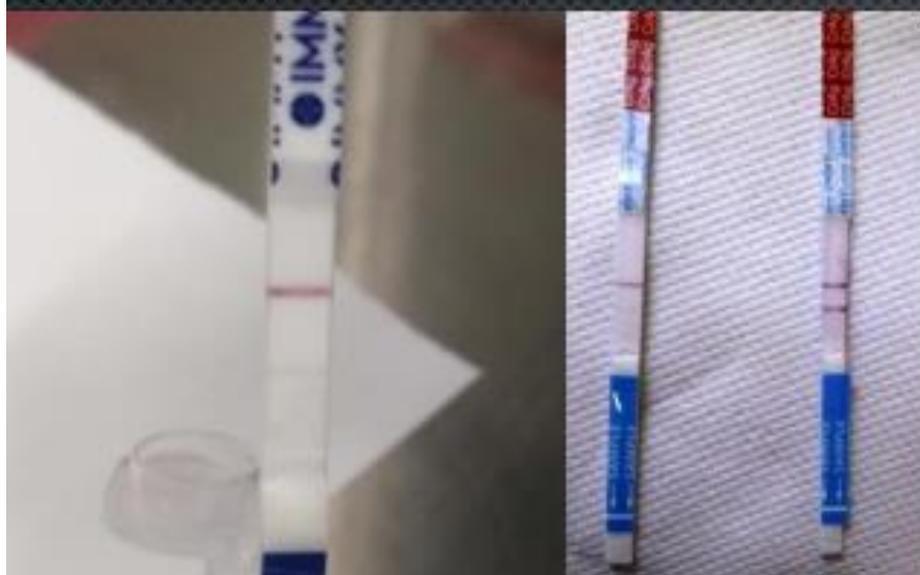
DETECCIÓN DE ANTÍGENO CAPSULAR DE *CRYPTOCOCCUS*

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.

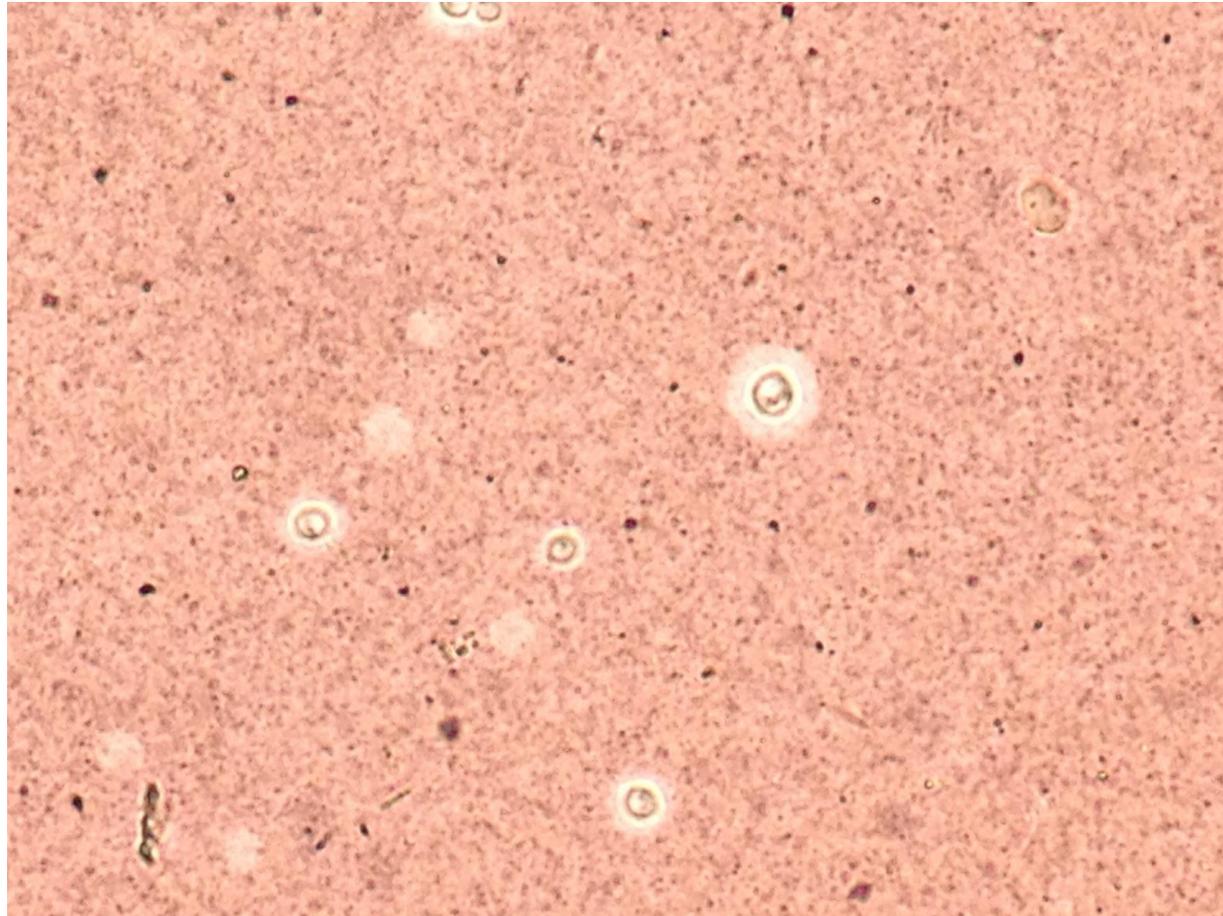
Agosto 2013: estenosis de arterias renales por angiorresonancia por lo que inicia Meprednisona 40 mg/ día y Ciclofosfamida 1 gr/ mes endovenoso (6 meses).

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.-

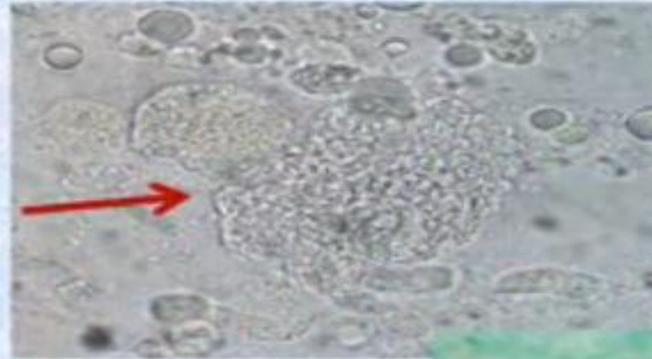
El *P. jiroveci* puede invadir distintos órganos y tejidos, provocando infecciones diseminadas, por lo general se presenta como una neumopatía aguda grave

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

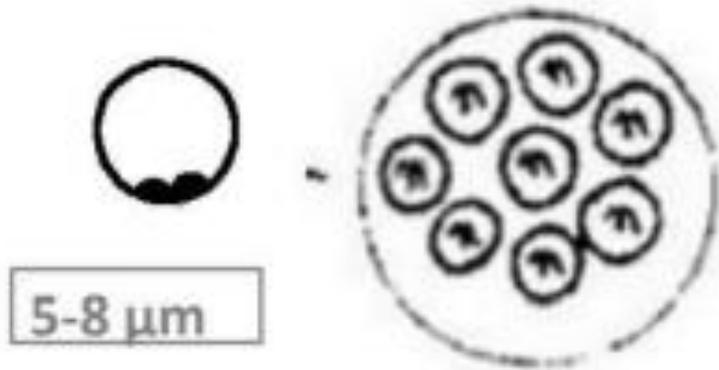
Diagnóstico

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

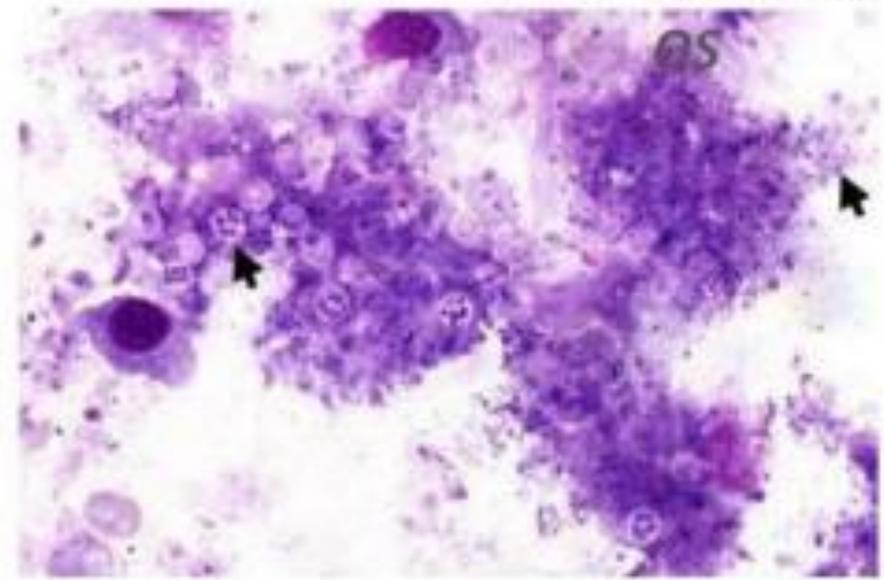
- **Directo del material**
- **Grocott y Gomori** (quiste)
- **Azul de O-toluidina** (quiste)
- **Gram Weigert** (quiste y trofozoito)
- **Giemsa** (trofozoito)
- **Técnicas de fluorescencia:**
 - Blanco de calcoflúor**
(detecta quistes)
 - Inmunofluorescencia directa**
con anticuerpos monoclonales
(detecta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



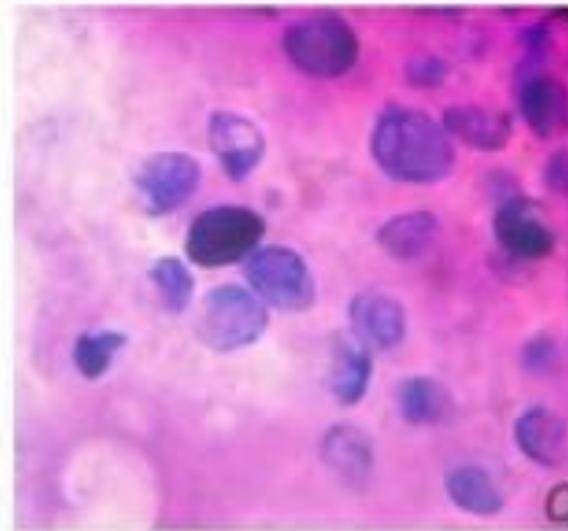
Pneumocystis jirovecii



GIEMSA



GRAM-WEIGERT



QUISTES

GROCOTT



MUCHAS GRACIAS
