

# Micoses Sistêmicas Endêmicas Prevalentes na América do Sul

**Carlos Pelleschi Taborda, Ph.D.**

Instituto de Ciências Biomédicas – USP

Instituto de Medicina Tropical de São Paulo - FMUSP

- Podemos dividir em três grupos:
  - Micoses sistêmicas causadas por fungos dimórficos.
    - *Paracoccidioides brasiliensis*/ *P. lutzii*/ *P. americana*/ *P. venezuelensis*/ *P. restrepiensis*
    - *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*
    - *Coccidioides posadasii* / *C. immitis*
    - *Blastomyces dermatitidis*/ *B. gilchristii* / *B. helicus* / *B. percusus* / *B. emazantsi* / *B. parvus*
    - *Talaromyces (Penicillium) marneffeii*
    - *Emergomyces* spp.
  - Micoses sistêmicas causadas por leveduras clássicas.
    - *Cryptococcus neoformans* e *C. gattii*
    - *Candida albicans* e outras espécies
  - Micoses sistêmicas causas por bolores presentes no ambiente.
    - *Aspergillus* spp.
    - *Fusarium* spp.
    - *Mucor* spp. e *Rhizopus* spp.

# Fungos causadores de micoses sistêmicas apresentam uma série de características em comum

- Distribuição geográfica definida
- Agentes são encontrados no solo e em dejetos de animais
- A principal porta de entrada são as vias aéreas superiores

# Hipóteses Diagnósticas

com base no quadro clínico

- Tuberculose
- Paracoccidioidomicose
- Histoplasmose
- Actinomicose
- Coccidioidomicose
- Leishmaniose
- Câncer
- Linfoma
- Hanseníase
- Sífilis.....

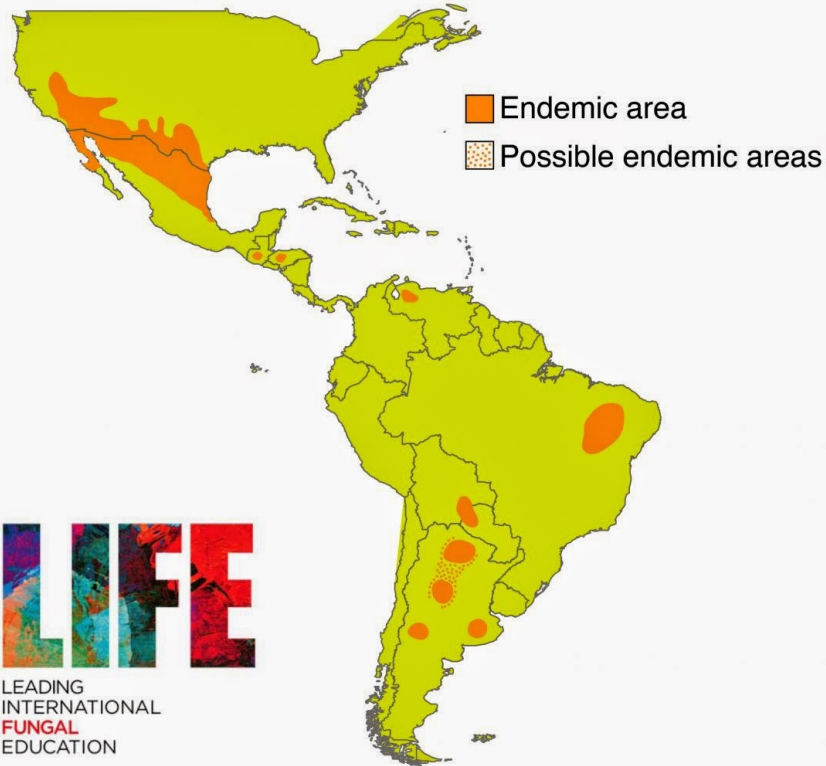
# Diagnóstico Laboratorial Microbiológico e Imunológico

- Epidemiológico
- Clínico
- Micológico
  - Visualização direta
  - Cultura
  - Histológico
- Sorológico – diagnóstico e acompanhamento
  - Pesquisa de antígenos e anticorpos
- Teste cutâneo (?)
- Teste molecular e proteômico

# Coccidioides spp.



## Coccidioidomycosis

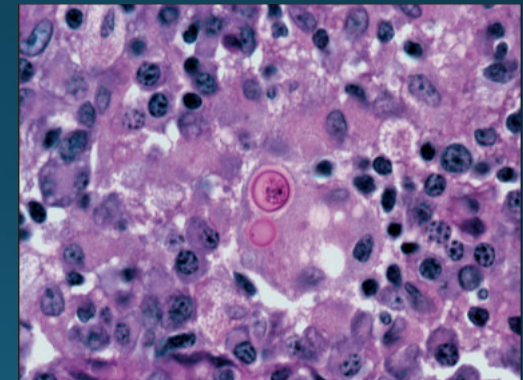
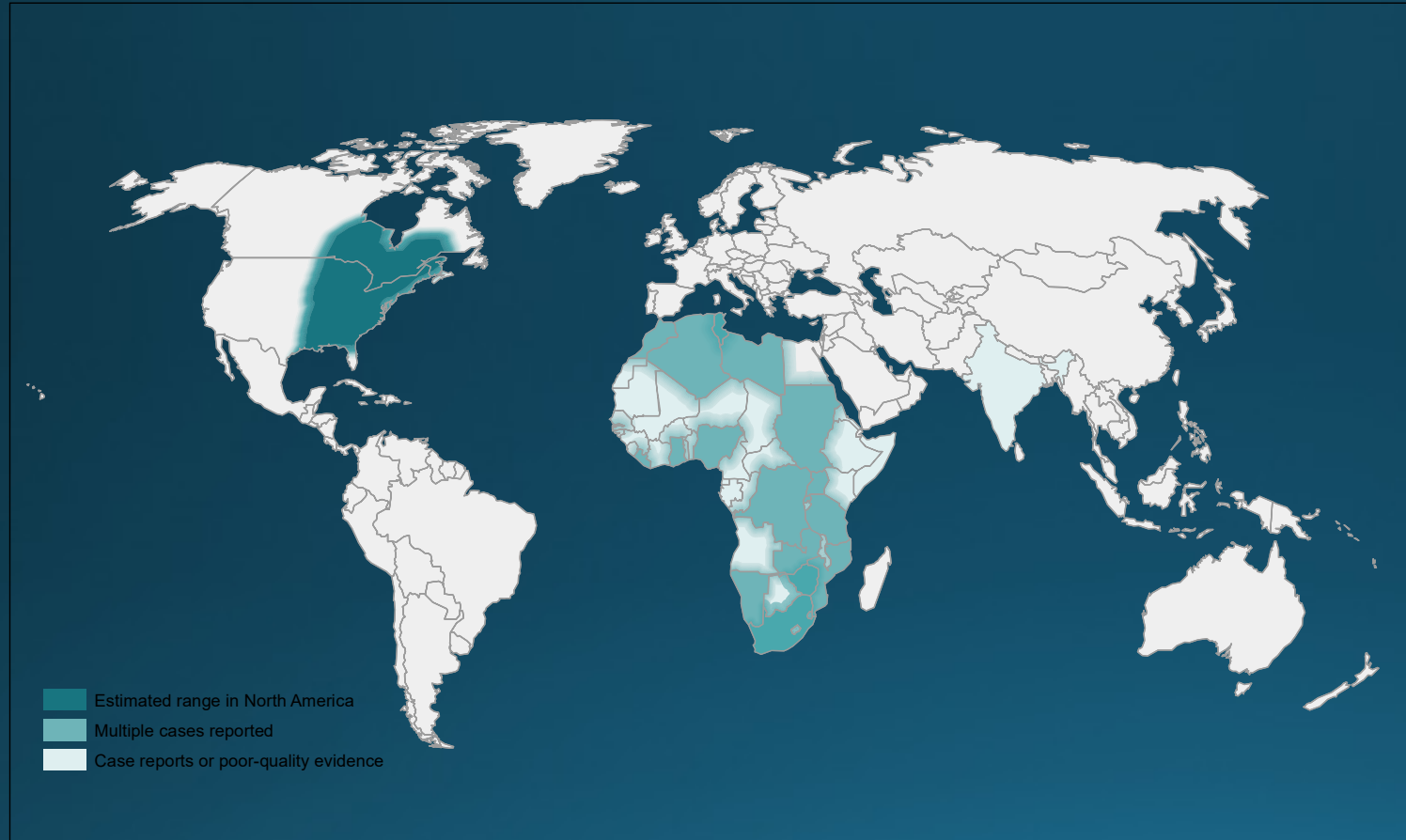


## Frequency of different manifestations of coccidioidomycosis after exposure

Asymptomatic	Primary	Chronic	Progressive
60	40 'Flu-like Syndrome' ↓ 32 ←      8 ↓ Pneumonia Cavitation Pericarditis ↓ 1 - 4      1 - 4	Chronic Thoracic Involvement 1 - 3.5 ↑	Disseminated, Miliary, Meningeal 0.5 - 1 ↑
	←	←	←

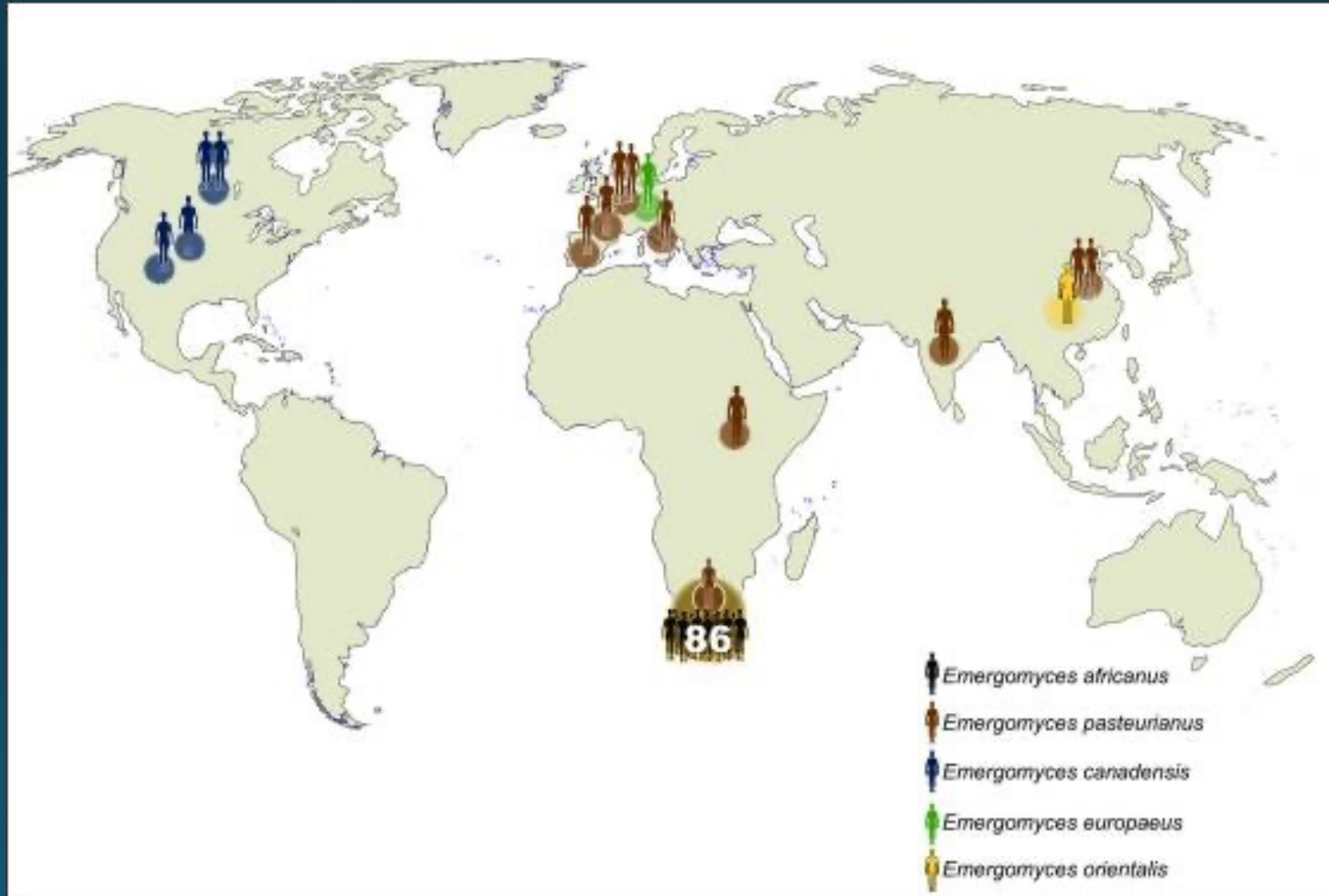
**LIFE**  
LEADING INTERNATIONAL FUNGAL EDUCATION

# *Blastomyces dermatitidis* / *B. gilchristii* / *B. helicus*



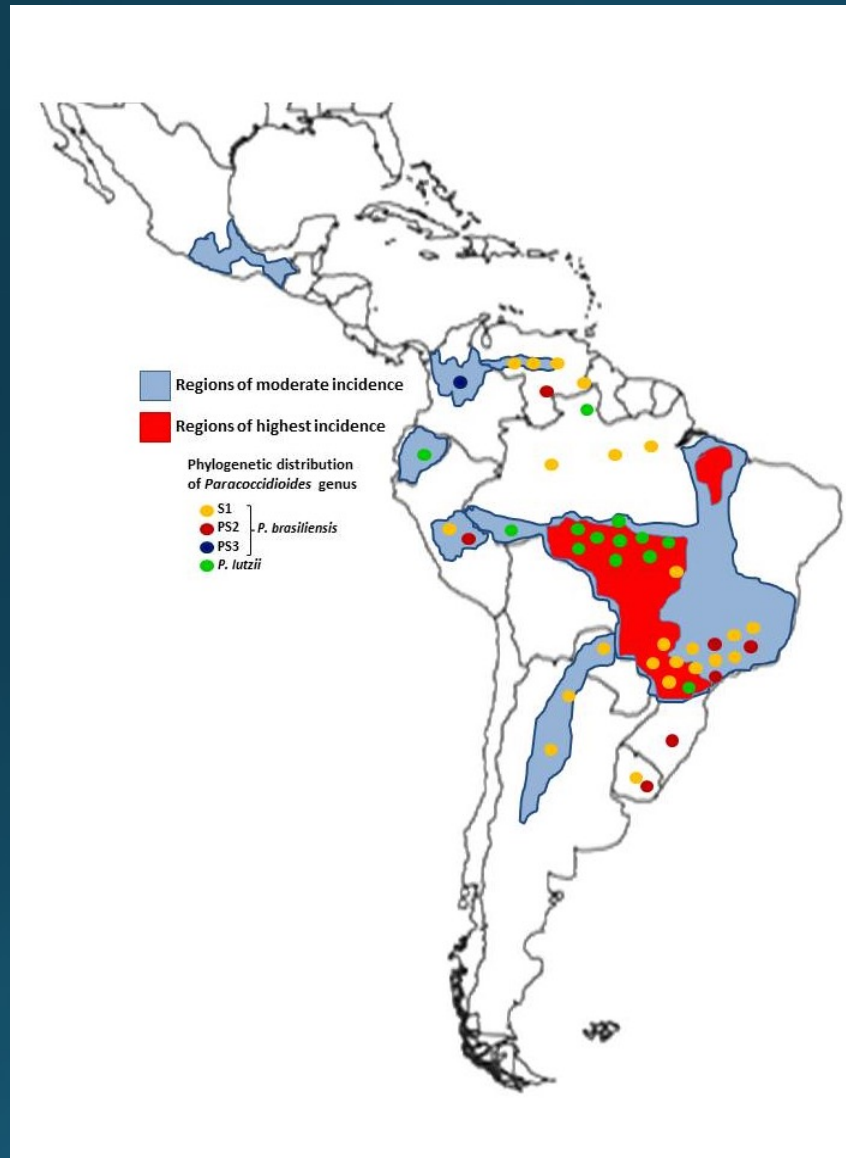
Oriente Médio e África: *B. percusus*, *B. emzantsi* e *B. parvus*

# *Emergomyces* spp.





# Paracoccidioides spp.



*Paracoccidioides brasiliensis* – S1  
*P. americana* – América do Sul – PS2  
*P. restrepiensis* – Colômbia – PS3  
*P. venezuelensis* – Venezuela – PS4

*P. lutzii*

Fungal Genetics and Biology 106 (2017) 9–25

Contents lists available at ScienceDirect



Fungal Genetics and Biology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/yfgbi](http://www.elsevier.com/locate/yfgbi)



Species boundaries in the human pathogen *Paracoccidioides*

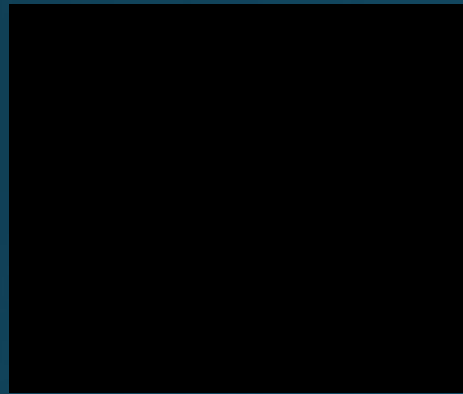
David A. Turissini<sup>a</sup>, Oscar M. Gomez<sup>b,c</sup>, Marcus M. Teixeira<sup>d</sup>, Juan G. McEwen<sup>b,e</sup>,  
Daniel R. Matute<sup>a,\*</sup>



# Paracoccidioidomicose

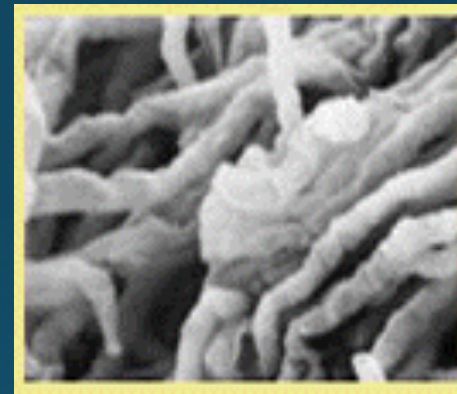
## Dimorfismo térmico

35-37°C



**FORMA DE LEVEDURA**

25-27°C



**FORMA DE BOLOR**



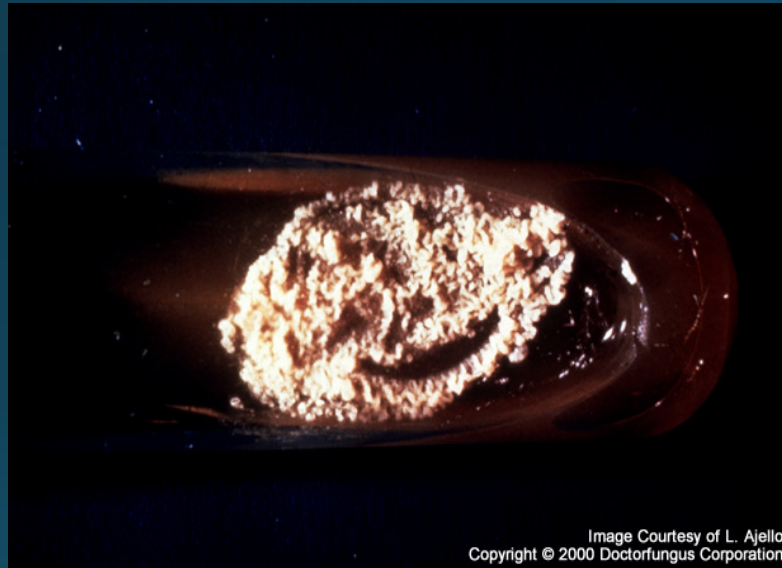
# ISOLAMENTO

## Características Macro/Microscópicas a TA



# ISOLAMENTO

## Características Macro/Microscópicas a 37° C



# CLASSIFICAÇÃO CLÍNICA (Medellín, 1986)

## PCM infecção

(PB micose oligossintomática)

## Aguda (forma PCM juvenil)

Moderada

Grave

## PCM crônica (forma do adulto)

Leve

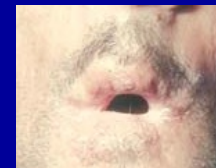
Moderada

Grave

## Sequelar

Unifocal

Multifocal



# Paracoccidioidomicose aguda/subaguda (Juvenil)

- Inalação do fungo: doença em poucas semanas.
- Indivíduos mais jovens até terceira década de vida.
- Sem diferença entre homens e mulheres.
- Sistema fagocítico-mononuclear.
- Adenomegalia generalizada (com possível supuração), febre, emagrecimento.
- Pode acometer supra-renal e ossos.
- Envolvimento pulmonar é incomum.
- Acometimento intestinal: diarreia e síndrome de má absorção
- Icterícia obstrutiva
- Paracoccidioidina negativa.
- Sorologia positiva (ID + e CIEF + com títulos mais altos).







# Paracoccidioidomicose crônica (Adulto)

- **Sexo masculino (8-15 H: 1 M), após a quarta década de vida.**
- Se manifesta anos após o contato com o agente.
- Insidiosa.
- Pulmões são os órgãos mais acometidos.
- Mucosa oral (estomatite moriforme) e do trato respiratório são comuns.
- Outros órgãos: supra-renal, ossos, pele, SNC.
- Associação com tuberculose pulmonar em ~10 % dos casos.
- Paracoccidioidina pode ser + em casos leves; sorologia positiva (ID + e CIEF +)



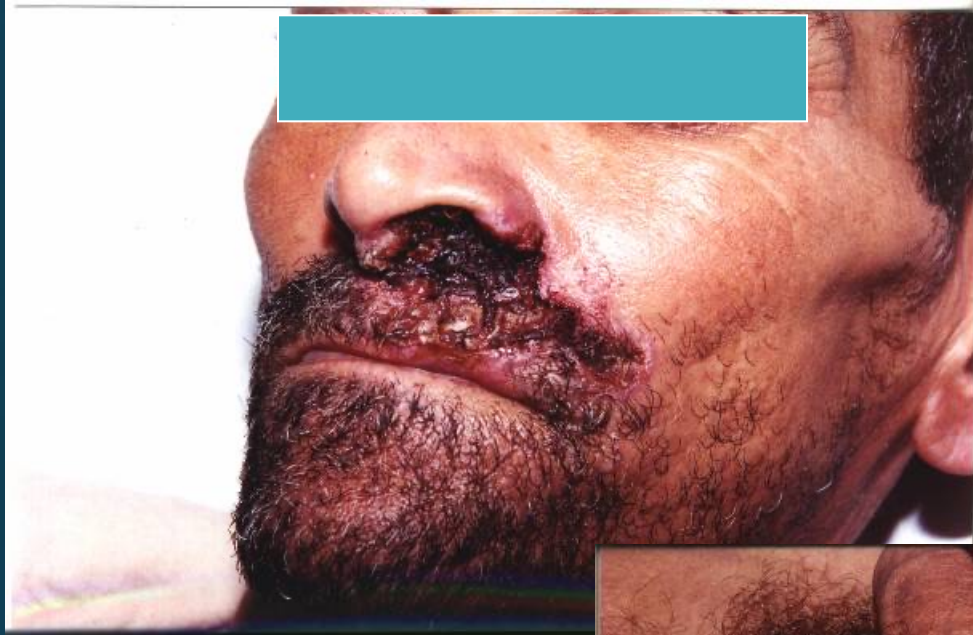




Copyright © 2005, 2004, 2000, 1995, 1990, 19



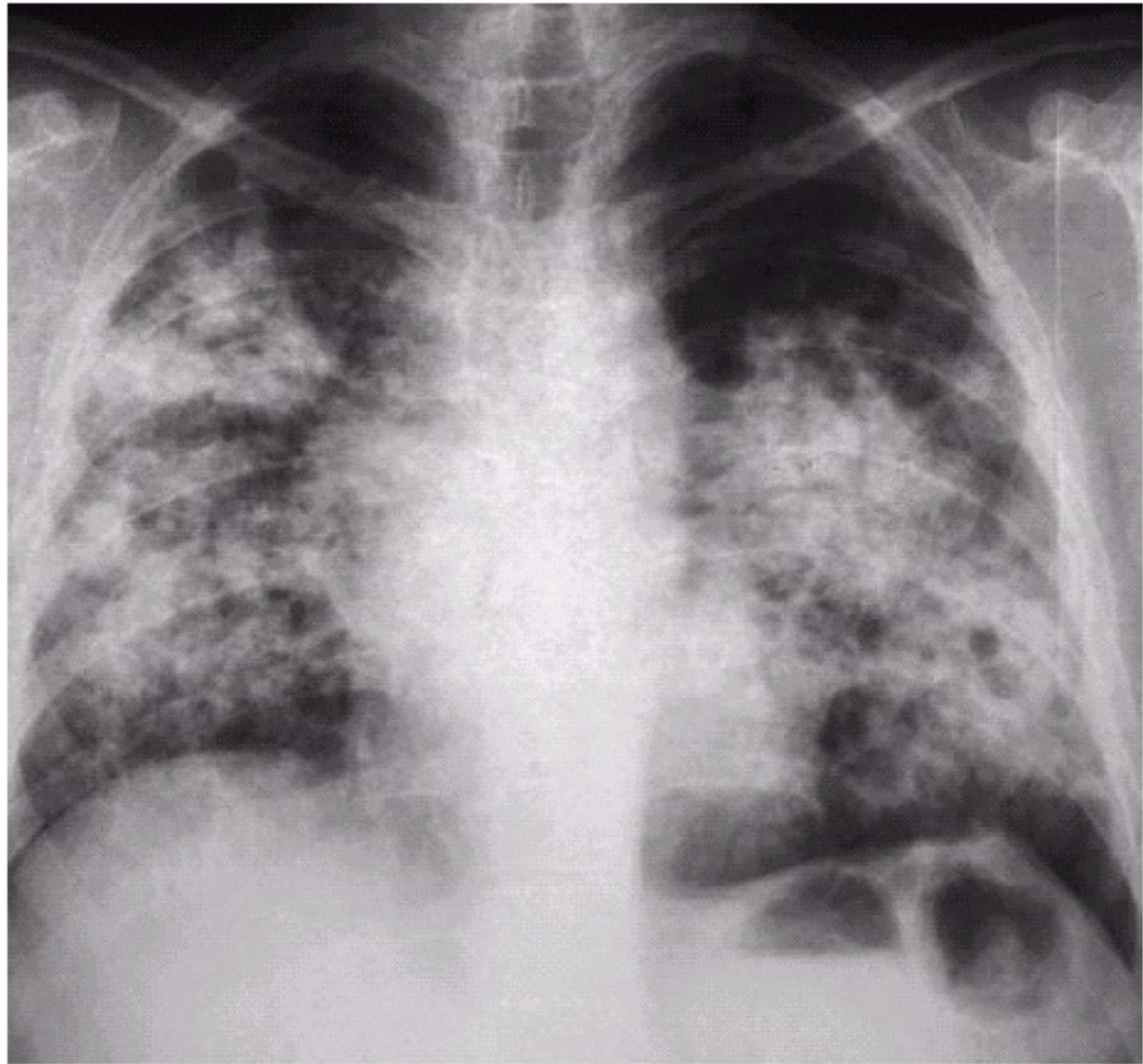
Copyright © 2005, 2004, 2000, 1995, 1990, 1985, 1979 by Elsevier Inc.



03/10/02







Copyright © 2005, 2004, 2000, 1995, 1990, 1985, 1979 by Elsevier Inc.

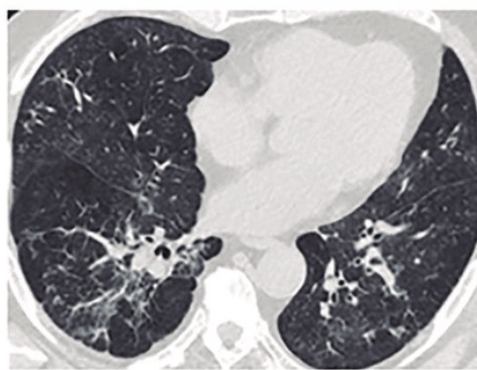
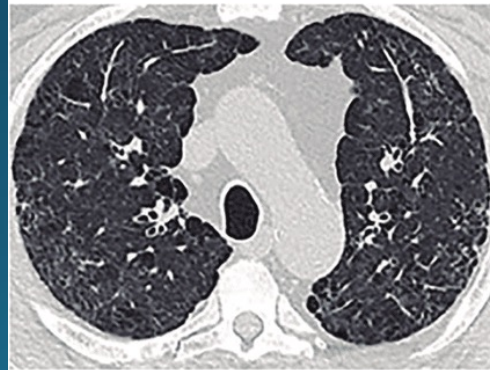


# Paracoccidioidomicose Sequelar

## **A cura da doença evolui com fibrose cicatricial:**

- ✓ Pulmões: hiper-insuflação, bolhas, bronquiectasias e fibrose. Insuficiência respiratória de gravidade variável.
- ✓ Microstomia.
- ✓ Doença de Addison.
- ✓ Estenose de traquéia.
- ✓ Síndrome de má-absorção.
- ✓ Sequelas neurológicas.

# PCM SEQUELAR



# RESUMO: FORMAS CLÍNICAS

## Forma juvenil

- **Faixa etária: até terceira década de vida.**
- **1 homem: 1 mulher.**
- **História de semanas a poucos meses.**
- **Acomete órgãos do sistema retículo-endotelial**

**Febre e emagrecimento. (diferencial com doença linfo-proliferativa).**

- **Lesões mucosas são pouco freqüentes.**
- **Geralmente não há acometimento pulmonar.**

## Forma do adulto

- **Faixa etária: quarta década de vida.**
- **8 – 15 homens: 1 mulher.**
- **História arrastada de meses a anos, principalmente com relação aos sintomas respiratórios.**

**Geralmente não há queixa de febre.  
Emagrecimento não é queixa importante.**

- **Diferencial com tuberculose pulmonar.  
10 % PB micose pulmonar com TB pulmonar.**
- **Pulmão e mucosa oral são os sítios de acometimento mais comuns.**

# DIAGNÓSTICO

## ✓ Isolamento do agente etiológico:

- Pesquisa direta em material biológico – escarro, raspado de lesões de pele e mucosa.
- Cultura.

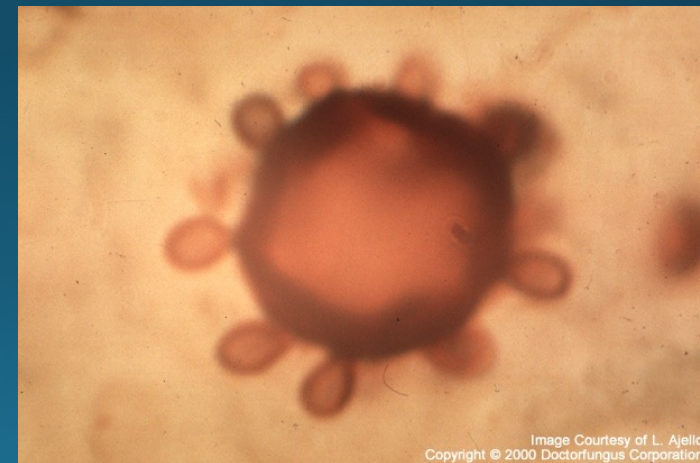
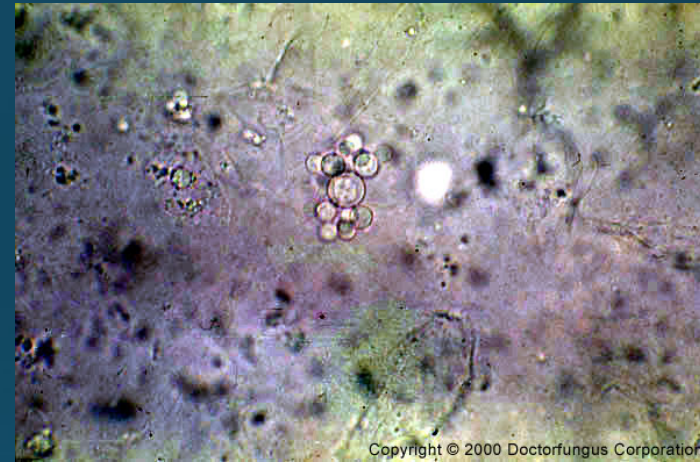
## ✓ Biópsia e exame anátomo-patológico.

## ✓ Exames de imagem.

## ✓ Sorologia: ID, CIEF, FC, Elisa, Immunoblotting.

# Exame direto

- Material processado com 10% de KOH
  - Exame direto
  
- Células leveduriformes de 2 a 40 até 60  $\mu\text{m}$ , de parede birrefringente, com três ou mais brotamentos, que se ligam à célula mãe por base estreita.



# Isolamento

- A cultura permite a verificação de formas micelianas e de leveduras dependendo da temperatura empregada.
  - Inóculo do material clínico em ágar Sabouraud dextrose contendo ciclohexamida.
  - Fungo de crescimento lento (25 – 28° C), sendo necessário esperar até 4 semanas.
  - A transformação de bolor para levedura é necessária.

# Características Macro/Microscópicas a 25° C

- Colônias brancas lisas, produzindo micélio aéreo curto.
- Microscopicamente observa-se hifas septadas, poucos conídios, alguns clamidoconídios.



# Características Macro/Microscópicas a 37° C

- Colônias cerebriformes e brilhantes.
- Microscopicamente observa-se células arredondadas, com brotamentos, semelhantes às estruturas verificadas em parasitismo.





# Histologia

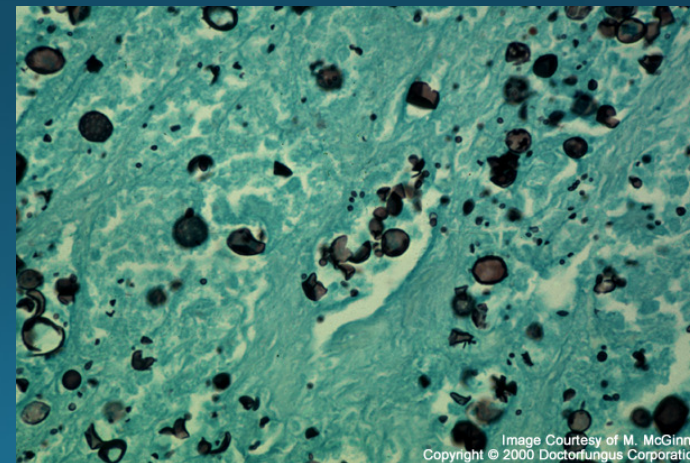
- Permanece umas das mais importantes ferramentas de diagnóstico na micologia.
  - Rápida, baixo custo e capaz de identificar o agente infeccioso.
- Colorações utilizadas
  - GMS (Gomori methenamine silver)
  - H&E (hematoxylin and eosin)

# Histológico – Prata

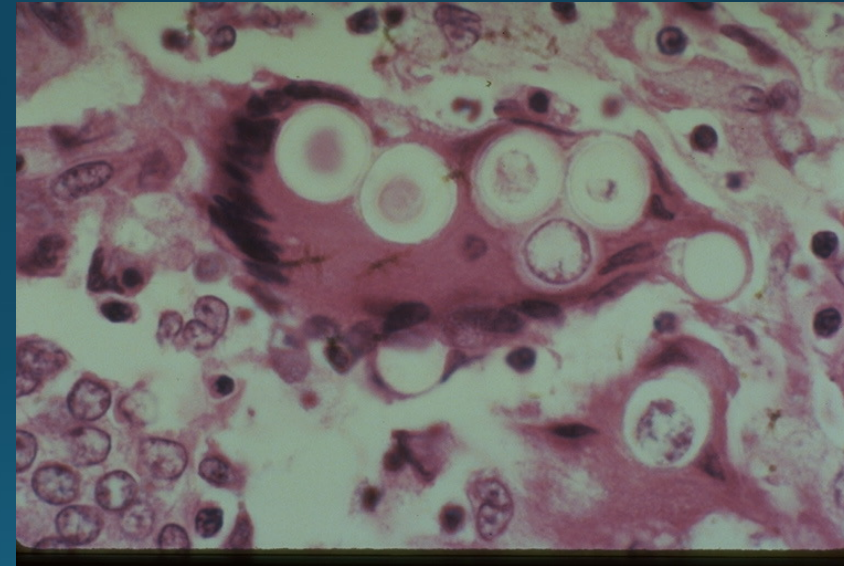
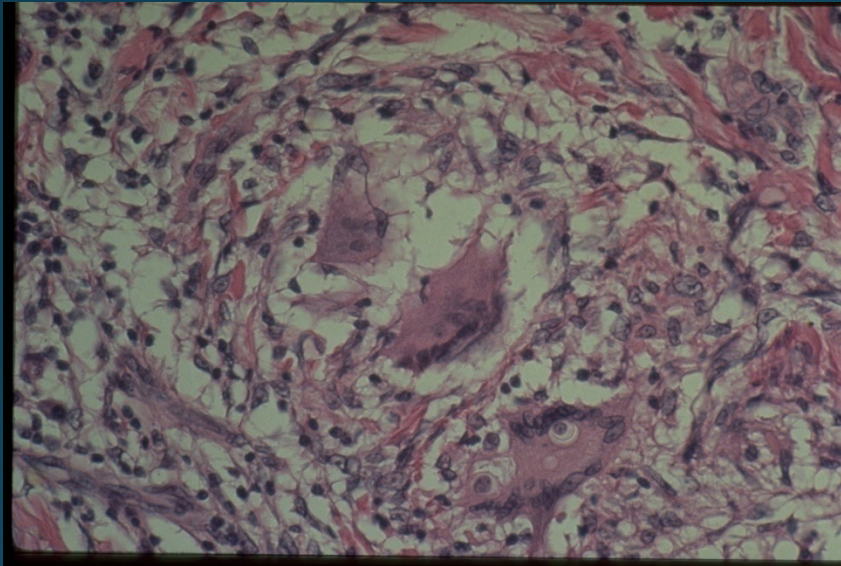
- Prata



- Parede celular marrom para preto com um fundo esverdeado.



# Histológico – H&E



# Sorologia

- Importante no auxílio ao diagnóstico e no acompanhamento do tratamento clínico.
  - Reação de precipitação em gel de agarose
    - Imunodifusão dupla e contraimunoeletroforese
  - ~~Reação de fixação de complemento.~~
  - ELISA, Western blot e Dot Blot.
  - Imunofluorescência.

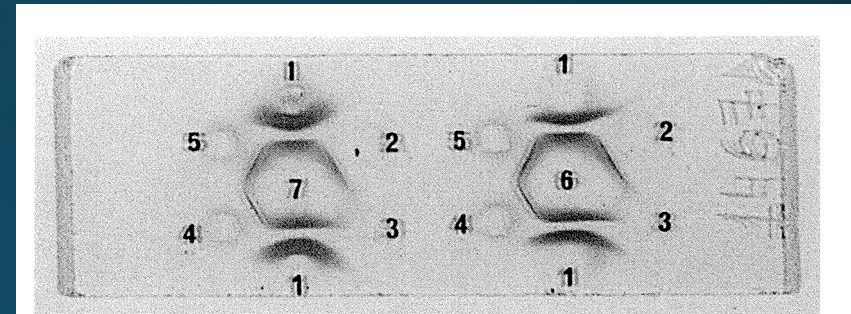
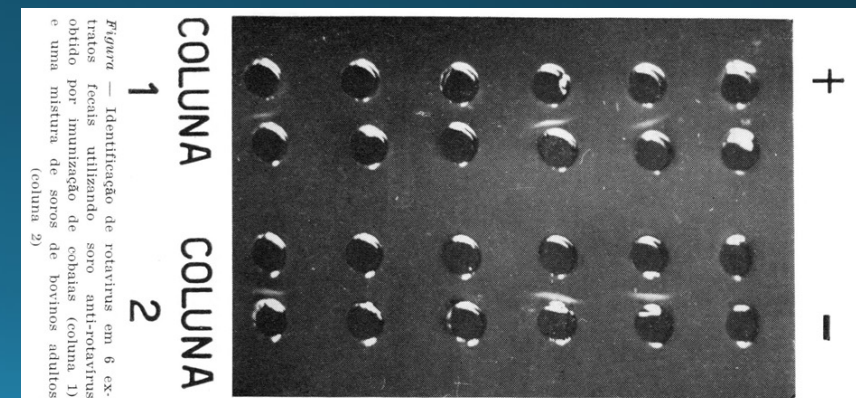


Fig. 5 - Double immunodiffusion. 1, 4 and 5) Paracoccidioidomycosis patients sera; 2) Polyclonal anti-gp43 rabbit serum; 3) Polyclonal anti *P-brasiliensis* total produced in rabbit; 6) Metabolic antigen from IBIÁ strain; 7) Metabolic antigen from BAT strain.



# Testes moleculares

- É Viável?
  - Reação de polimerização em cadeia - PCR
  - Reação de polimerização em cadeia em tempo real – rtPCR
  - Nested PCR / semi nested PCR
  - PCR - RLFP

Rev Iberoam Micol. 2014;31(1):35–41

Revista Iberoamericana  
de Micología

[www.elsevier.es/reviberoammicol](http://www.elsevier.es/reviberoammicol)

Mycologic Forum

**Molecular diagnosis of endemic and invasive mycoses: Advances and challenges**

Beatriz L. Gómez<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> School of Medicine and Health Sciences, Universidad del Rosario, Bogota, Colombia  
<sup>b</sup> Medical and Experimental Mycology Group, Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB), Medellín, Colombia

 CrossMark

# ESPECTROMETRIA DE MASSA MALDI-TOF

MALDI - "Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization"  
TOF – "Time of Flight"

# MALDI-TOF

## etapas da técnica

A amostra a ser analisada é dissolvida em uma matriz, geralmente um **ácido orgânico**, promovendo a protonação (próton  $[H^+]$  liga-se a um átomo, uma molécula ou um íon).

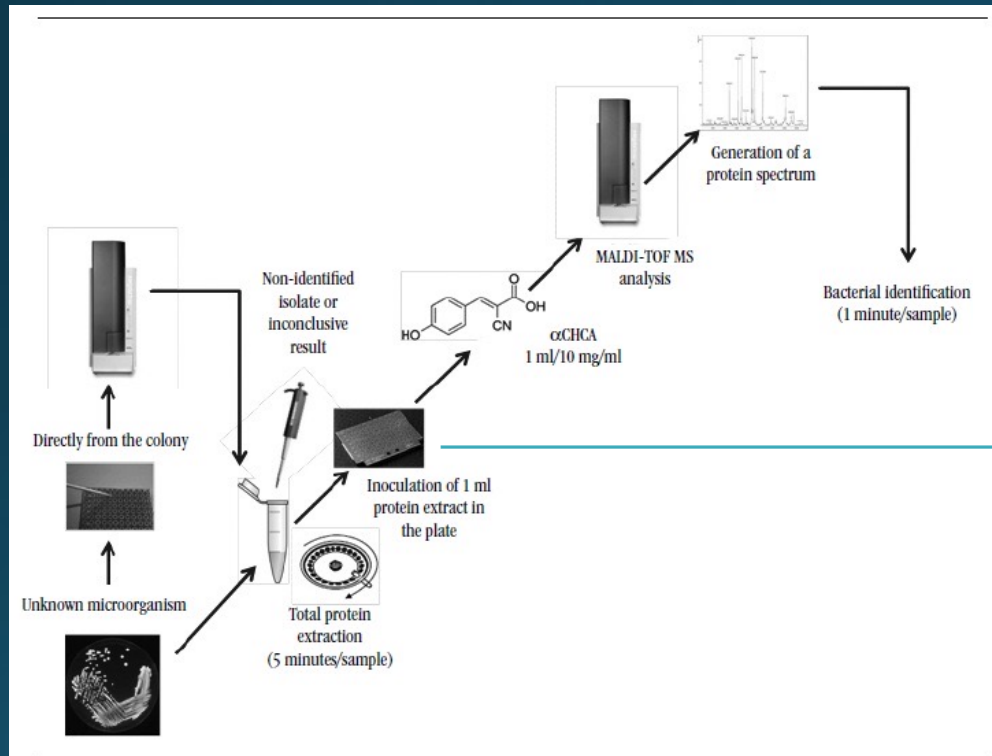
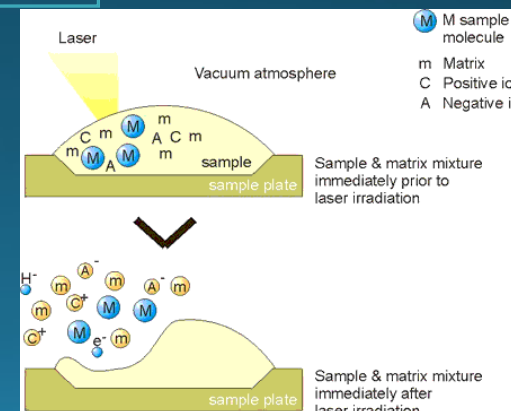
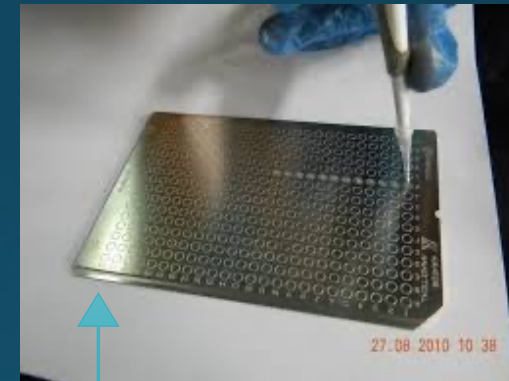


FIGURE 2 – Flowchart of the use of MALDI-TOF MS in microorganism identification at the clinical microbiology laboratory  
MALDI-TOF MS: matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry;  $\alpha$ CHCA: alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid.



# Histoplasmose

- **Histoplasmose humana**

*Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*

*Histoplasma capsulatum* var. *duboisii*



- **Histoplasmose equina**

*Histoplasma capsulatum* var.

*farciminosum* – histoplasmose equina





# *Histoplasma capsulatum*





# Epidemiologia

- **Potenciais locais de contato**

- ◆ Galinheiros
- ◆ Pombais
- ◆ Prédios urbanos habitados por morcegos ou pombos
- ◆ Porões e sótãos
- ◆ Grutas e Cavernas
- ◆ Túneis e Minas abandonadas
- ◆ O fungo cresce em solo rico em fezes de aves e morcegos

- ***H. capsulatum var. capsulatum***

- Descrita em várias parte do mundo entretanto, maior incidência nas Américas em especial no vale dos rios Mississippi e Ohio

- ***H. capsulatum var. duboisii***

- Casos são relatados na África e na Europa

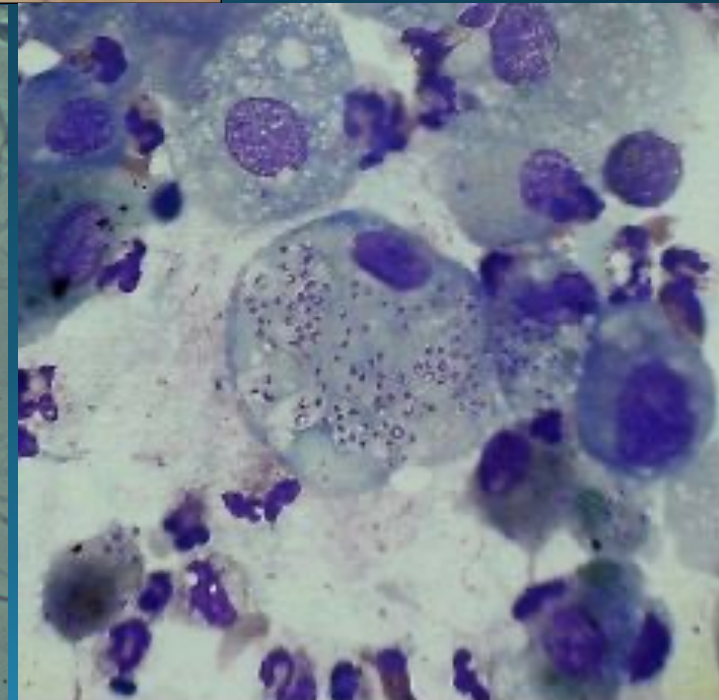
## Atividades com significativo risco de infecção pelo *H. capsulatum*

- Geólogos
  - Arqueólogos
  - Veterinários
  - Excursionistas
  - Escoteiros
- 
- Animais (cão, gato, cavalo, gado)
- 
- População de grandes cidades como São Paulo?

Micélio



Levedura



# HISTOPLASMOSE

## Doença em humanos

- **Inalação de conídeos/micélio - transformação em leveduras** → pulmões → macrófago alveolar/CD18
- **Sobrevive no interior dos macrófagos / Escape** → multiplicação
- **Disseminação** → Linfonodos hilares e mediastinais → disseminação hematogênica para SRE

# HISTOPLASMOSE

## Quadro Clínico:

### ✓ No hospedeiro normal:

Primo-infecção assintomática

Infecção pulmonar aguda

Pacientes com DPOC – forma pulmonar crônica

### ✓ No paciente imunodeprimido:

**FORMA DISSEMINADA PROGRESSIVA!!!!!!!!!!**

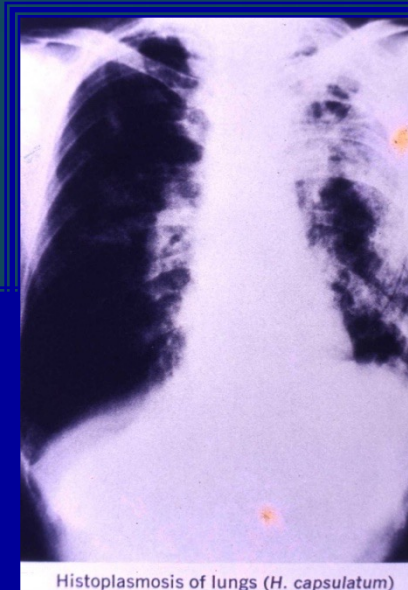
## Infecção pulmonar aguda



- ✓ Sintomas inespecíficos autolimitada – 2 a 6 semanas
- ✓ RX infiltrado intersticial, nódulos, adenomegalia, derrame pleural
- ✓ Provas sorológicas - maior positividade entre 2º e 3º mês
- ✓ Histoplasmina positiva

# Forma pulmonar crônica

- \* Sexo masculino, acima de 50 anos, DPOC
- \* Mimetiza a reativação de tuberculose
- \* Alteração radiológica: 90% infiltrado apical bilateral  
disseminação a lobos inferiores  
formação de cavidades
- \* Se não tratada - hipoxemia progressiva  
fibrose  
dispnéia  
infecções bacterianas  
cor pulmonale



Histoplasmosis of lungs (*H. capsulatum*)



**PACIENTE IMUNODEPRIMIDO:**  
Histoplasmose Disseminada Progressiva







DMIP



# HISTOPLASMOSE DIAGNÓSTICO

## Isolamento do fungo

Demonstração de leveduras: exame direto

### Cultura (semanas – meses)

- Macroconídio tubercular;
- Sangue / mo - 4 a 6s: Preferencialmente lise-centrifugação: 2x mais rápido lise-centrifugação (média 9,7 d) X automatizado (18,4d);
- Escarro/LBA
- Conversão para levedura
- Chemiluminescent DNA probe (GenProbe, Inc., San Diego, CA) / Sequenciamento

## Outros métodos

### Histopatologia

- HE e Grocott - tecidos 30-60%
- Wright – Giemsa/methenamine silver/ periodic acid-Schiff
- Diferencial: *Leishmania* (tamanho similar; cinetoplasto) e *Candida glabrata*;
- Imunohistoquímica / Biologia Molecular

### Sorologia

- ✿ 50-80% (ID, CIE)
- ✿ Western blot

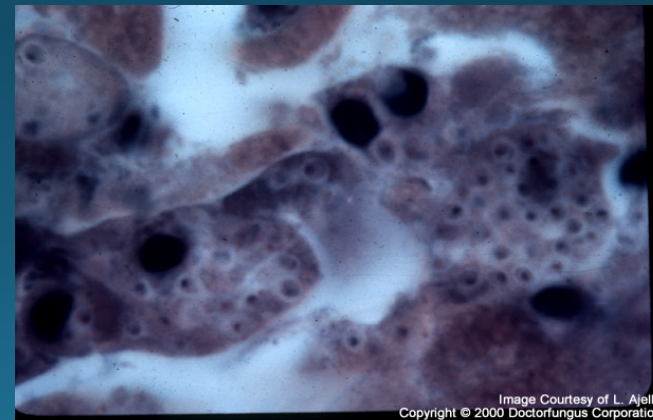
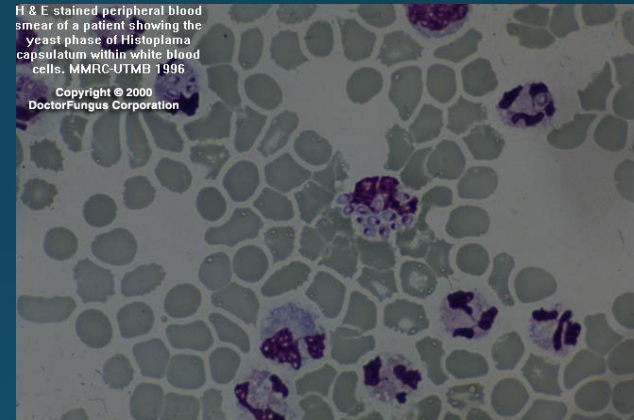
- M = aguda – presente na crônica - meses a anos H = formas graves, raramente encontrada

### Detecção de antígeno (> na dça grave)

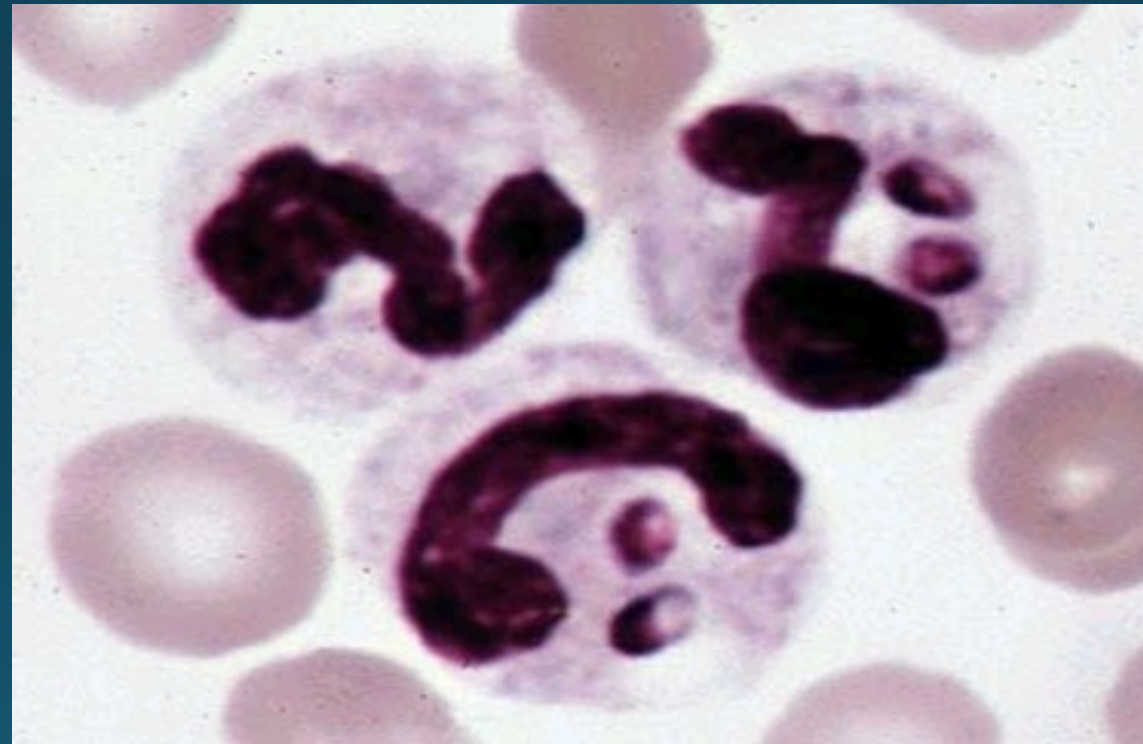
- ✿ urina ~90%, soro ~80%, LBA:70-84%
- ✿ monitorar tratamento e recaídas

# Exame Direto / Histopatológico

- Os cortes podem ser realizados a partir de pulmão, pele e coloração pelo H&E, PAS ou **Grocott é recomendado**.
- Intenso parasitismo nas células do SRE é observado.
- Nos preparados corados pelo H&E, os microrganismos aparecem com halo claro ao seu redor.



## Sangue periférico - Wright





BHI

S

S

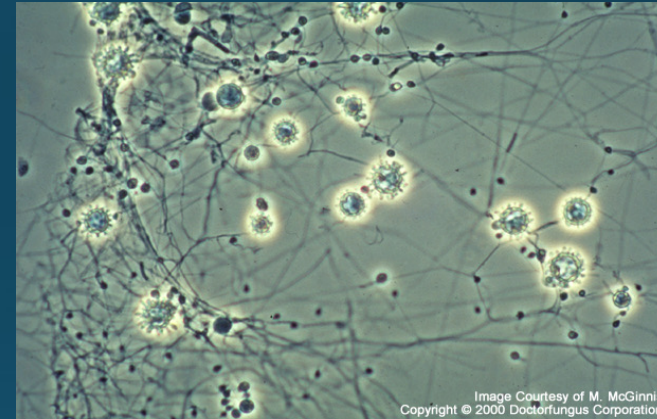
S



ML gema 37°C  
reversão

# Micromorfologia

- A análise da cultura na fase filamentosa observa-se hifas delicadas, septadas, macroconídios lisos ou equinulados, microconídios lisos.
- Na fase leveduriforme pode ser observado brotamento, o que raramente se observa nos tecidos.



Microcultivo

# Sensibilidade do método

- Cultura

- Autolimitada 15%
- Pulmonar crônica 85%
- Disseminada 85%

- Imunodifusão

- Autolimitada 75%
- Pulmonar crônica ~100%
- Disseminada 63%

# Imunodiagnóstico em histoplasma pesquisa de antígeno

Prova	Amostra clínica	Sensibilidade/Especificidade
ELISA MiraVista Diagnóstico (EUA)	Urina	40-90/95*
ELISA CDC-CIB	Urina	85/96** Pacientes com HIV/AIDS
Histoplasma EIA Test Kit (IMMY, EUA)	Urina	91/99***

\* Clin. Vacc. Immunol. 14: 1587-1591

\*\* Clin. Vacc. Immunol: 21:1364-1368

\*\*\* Clin. Infec. Dis. 53:448-454

## Diagnóstico laboratorial em pacientes AIDS

- Pesquisa de antígeno é muito importante
  - Resultado falso positivo para galactomanana de *Aspergillus* spp
- Identificação de leveduras em fagócitos no tecido
- Técnicas moleculares como PCR
- Técnicas sorológicas frequentemente negativas
- CULTURA