

Micoses Sistêmicas Endêmicas : Paracoccidioidomicose e Histoplamose

Carlos Pelleschi Taborda

Instituto de Ciências Biomédicas – USP

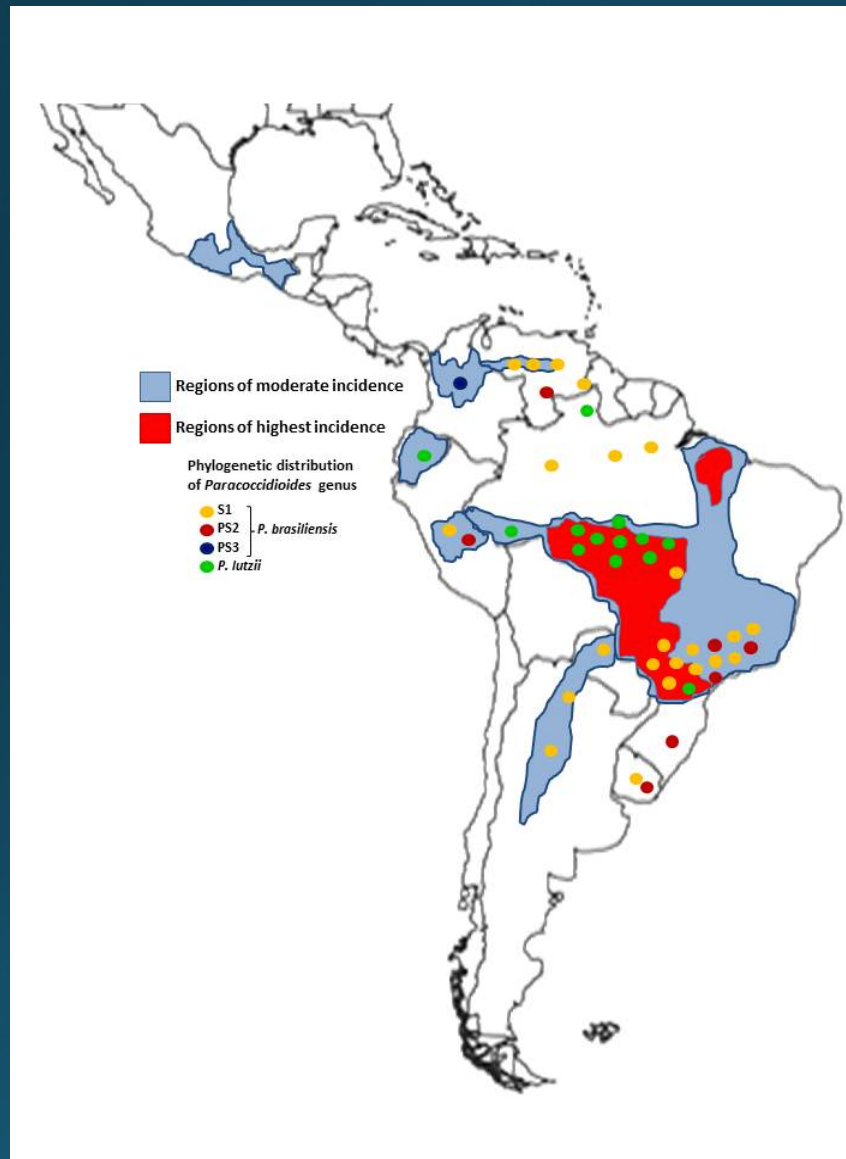
Instituto de Medicina Tropical de São Paulo - FMUSP

- Podemos dividir em três grupos:
 - Micoses sistêmicas causadas por fungos dimórficos.
 - *Paracoccidioides brasiliensis*/ *P. lutzii*
 - *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*
 - *Coccidioides posadasii* / *C. immitis*
 - *Blastomyces dermatitidis*
 - *Talaromyces (Penicillium) marneffeii*
 - *Emergomyces* spp.
 - Micoses sistêmicas causadas por leveduras clássicas.
 - *Cryptococcus neoformans* e *C. gattii*
 - *Candida albicans* e outras espécies
 - Micoses sistêmicas causadas 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

Paracoccidioides spp.



P. restrepiensis – Colômbia – PS3
P. venezuelensis – Venezuela – PS4
P. americana – América do Sul – PS2

Fungal Genetics and Biology 106 (2017) 9–25

Contents lists available at ScienceDirect



Fungal Genetics and Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yfgbi



Species boundaries in the human pathogen *Paracoccidioides*

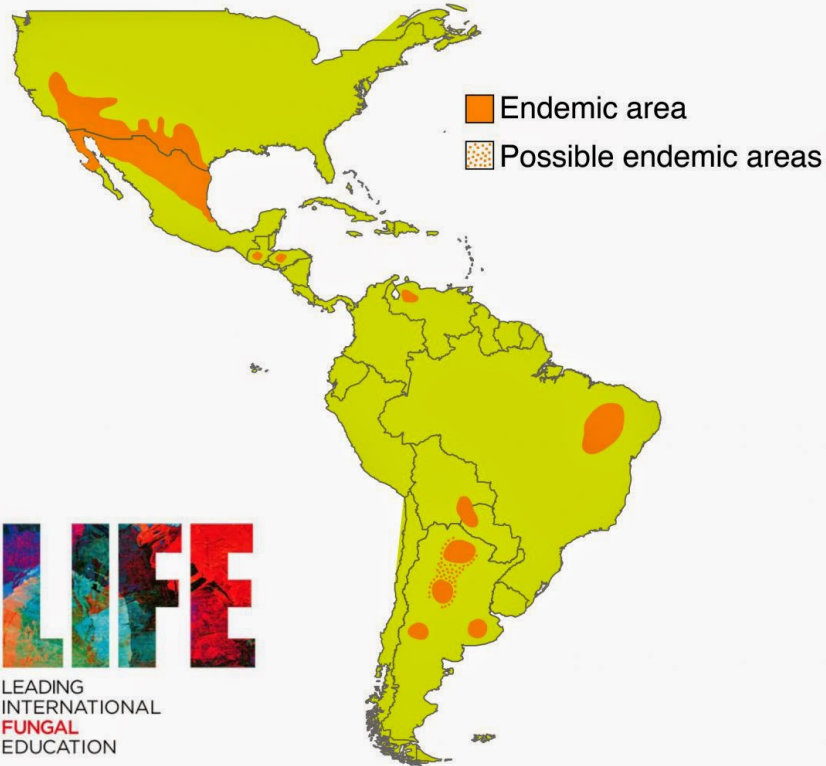
David A. Turissini^a, Oscar M. Gomez^{b,c}, Marcus M. Teixeira^d, Juan G. McEwen^{b,e},
Daniel R. Matute^{a,*}



Coccidioides spp.



Coccidioidomycosis



Frequency of different manifestations of coccidioidomycosis after exposure

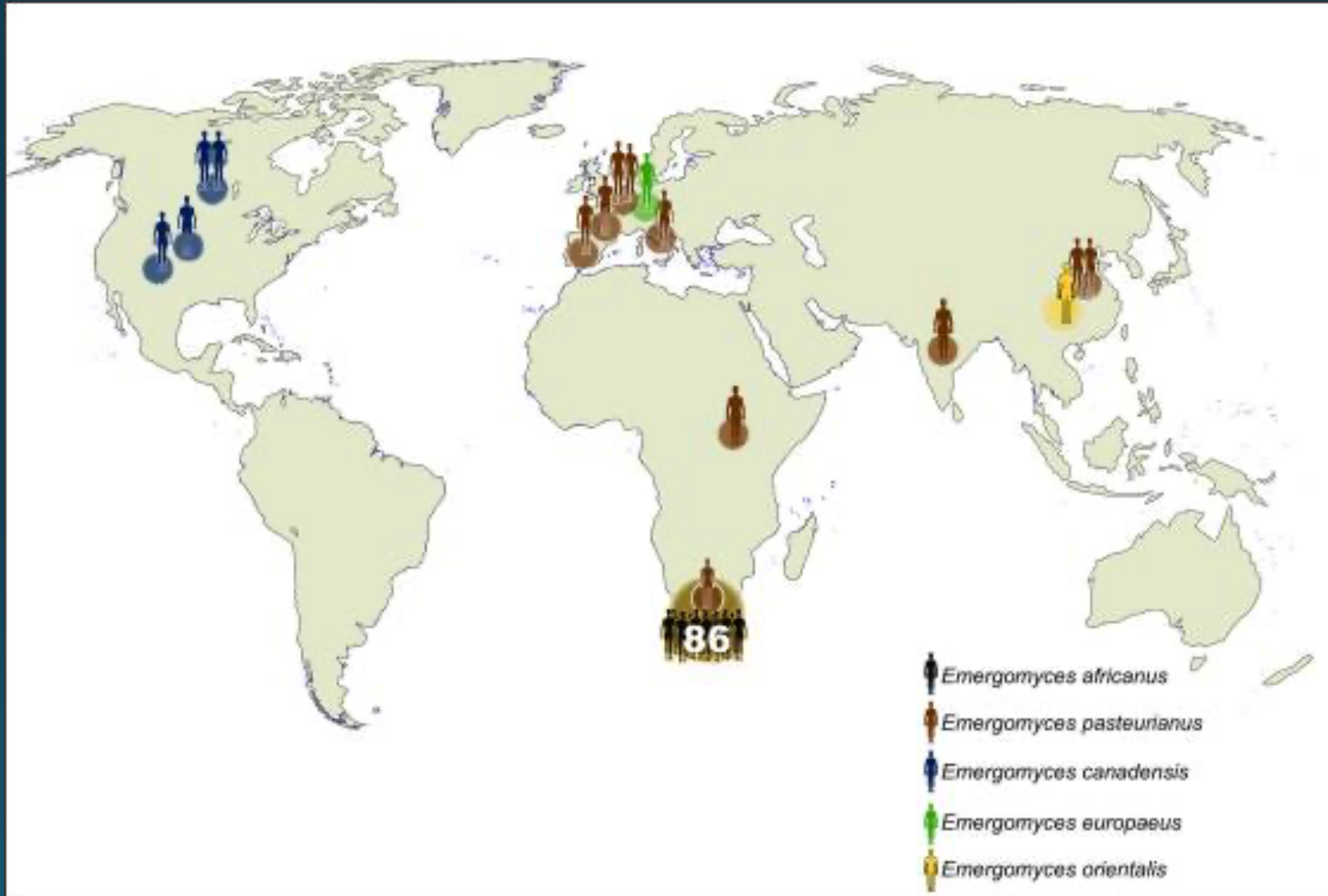
Asymptomatic	Primary	Chronic	Progressive
60	40 'Flu-like Syndrome' ↓ 32 ← 8 ↓ Pneumonia Cavitation Pericarditis ↓ 1 - 4 1 - 4	Chronic Thoracic Involvement 1 - 3.5 ↑	Disseminated, Miliary, Meningeal 0.5 - 1 ↑
	←	←	←

LIFE
LEADING INTERNATIONAL FUNGAL EDUCATION

Histoplasma capsulatum



Emergomyces spp.



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

Hipóteses Diagnósticas

com base no quadro clínico

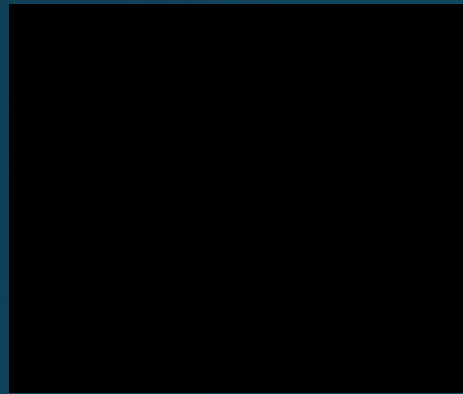
- Tuberculose
- Paracoccidioidomicose
- Histoplasmose
- Actinomicose
- Coccidioidomicose
- Leishmaniose
- Câncer
- Linfoma
- Hanseníase
- Sífilis.....

Paracoccidioidomycose

- *Paracoccidioides brasiliensis*
 - *P. restrepiensis*
 - *P. venezuelensis*
 - *P. americana*
- *Paracoccidioides lutzii*

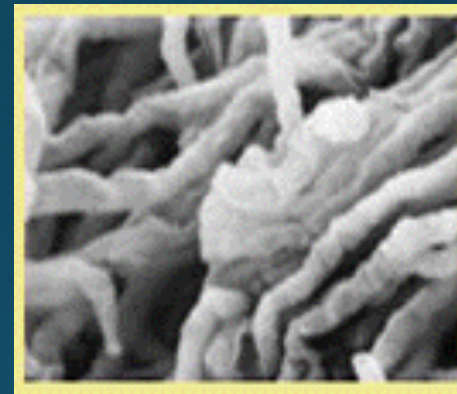
Dimorfismo térmico

35-37°C



FORMA DE LEVEDURA

25-27°C



FORMA DE BOLOR



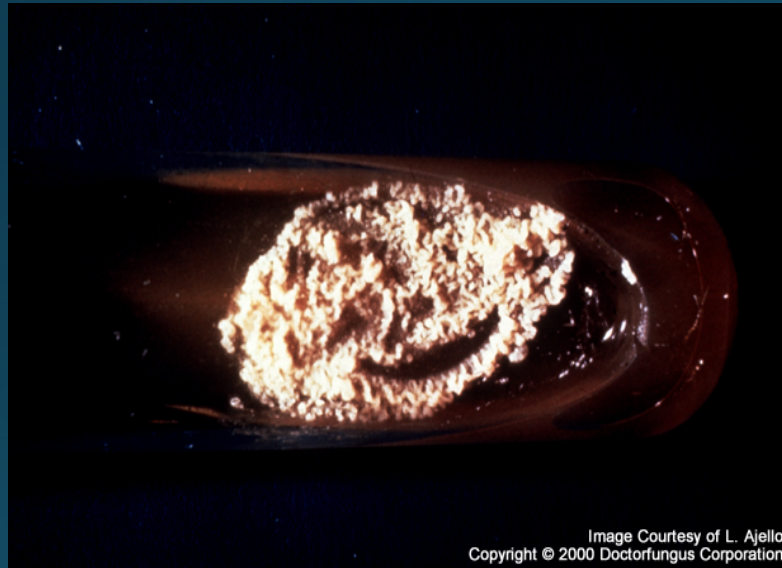
ISOLAMENTO

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



Paracoccidiodomicose 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
- Paracoccidiodina negativa.
- Sorologia positiva (ID + e CIEF + com títulos mais altos).





Paracoccidioidomicose do 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

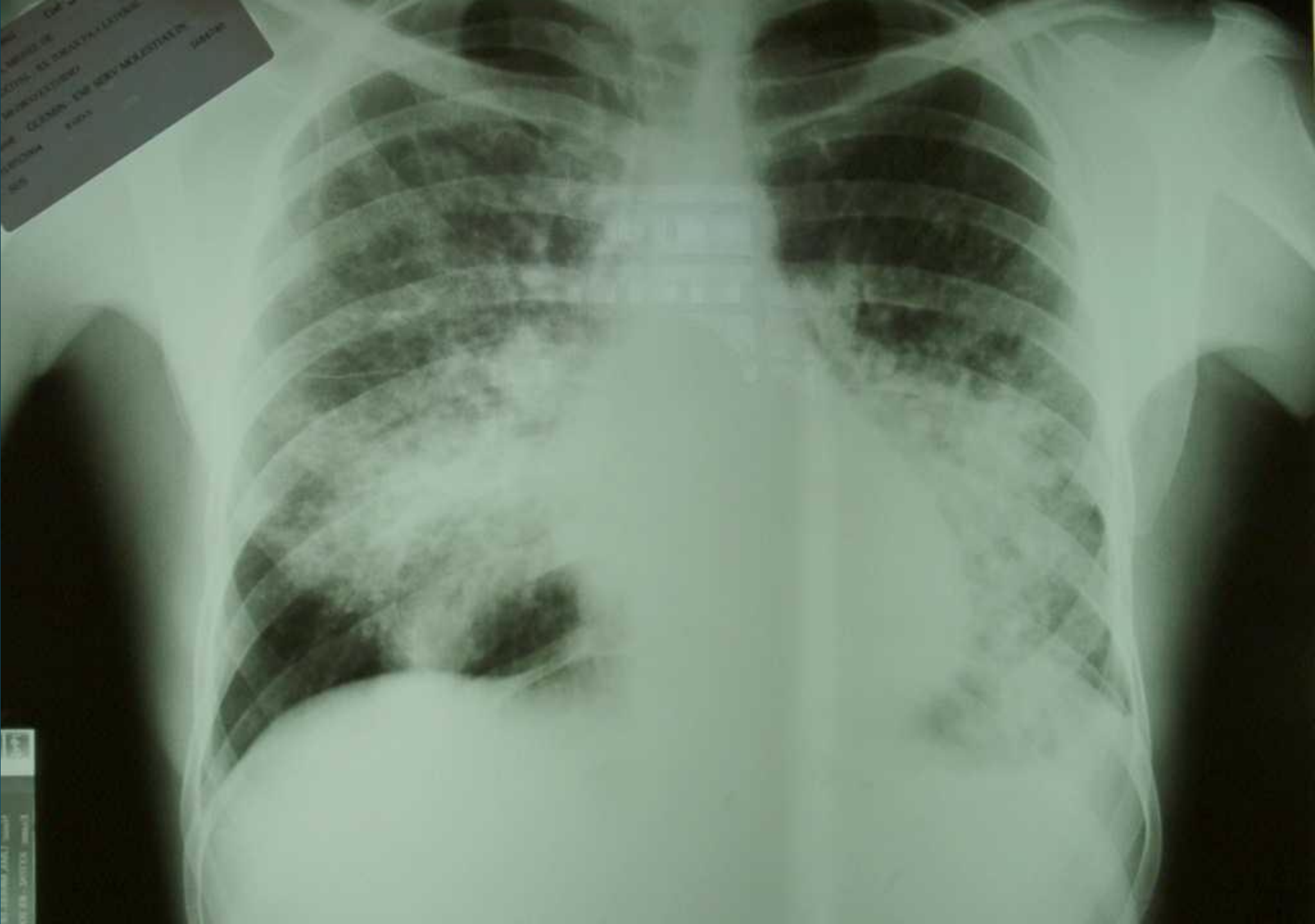


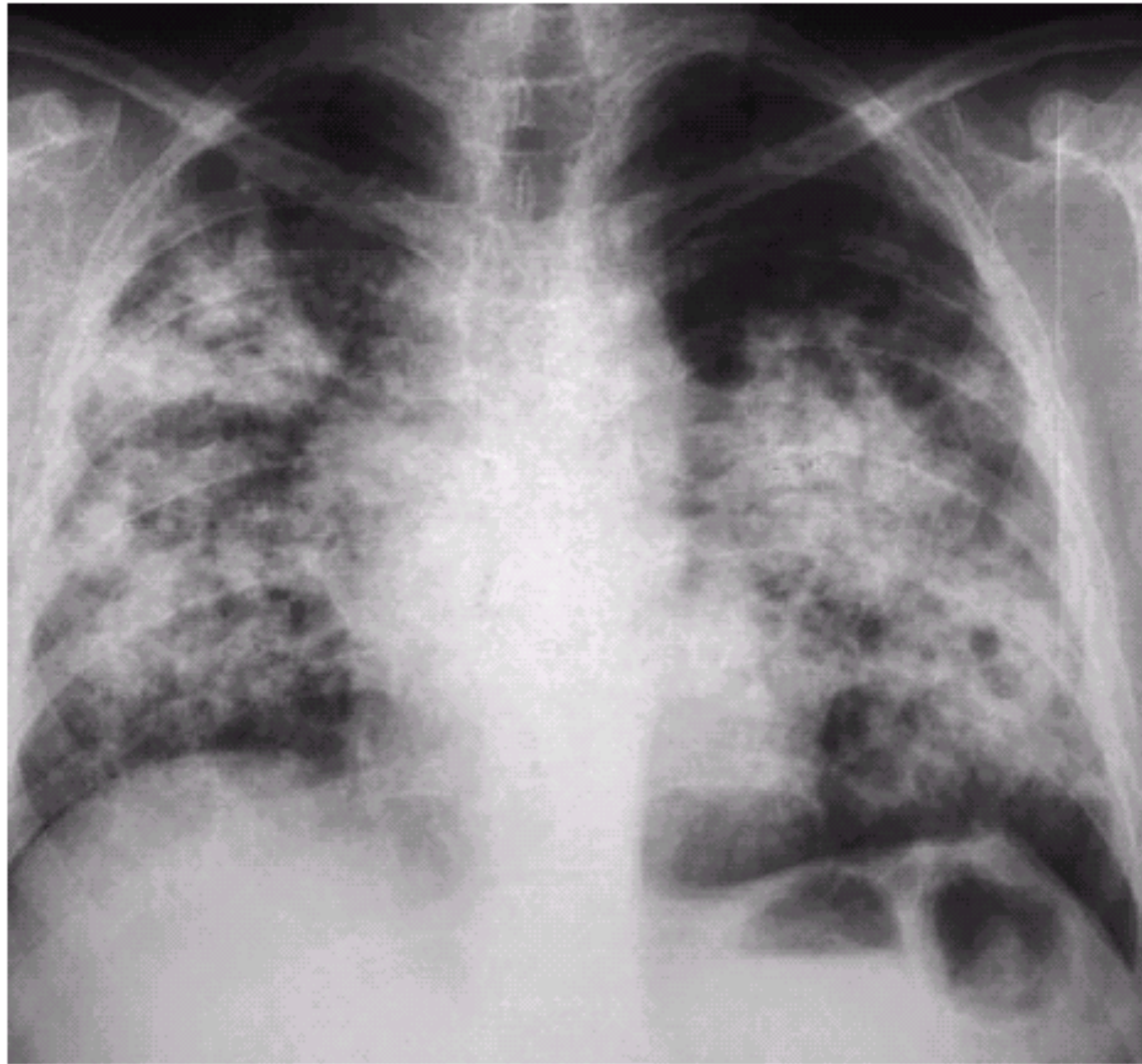
PCM do ADULTO no PULMÃO

- Comum.
- Evolução crônica.
- Dispneia, tosse com expectoração mucóide.
- Acometimento de padrão obstrutivo, misto ou restritivo.
- RX: “Asa de borboleta”.

... The ...
... of ...
... to ...
... the ...
...
...
...

...
...
...
...
...





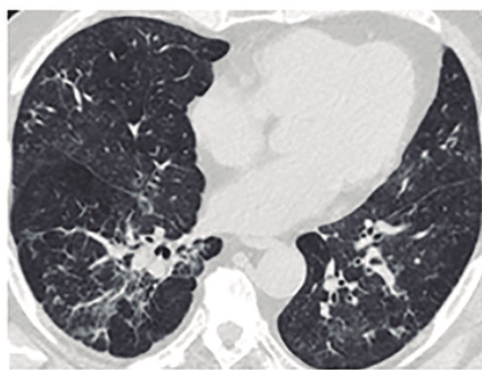
Copyright © 2005, 2004, 2000, 1995, 1990, 1985, 1979 by Elsevier Inc.

PCM 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.

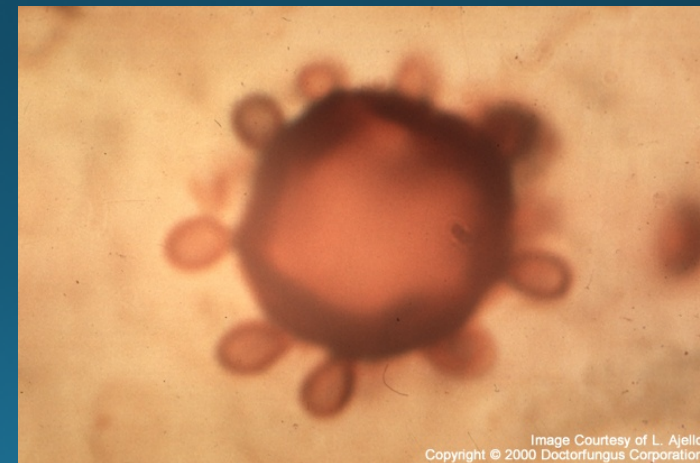
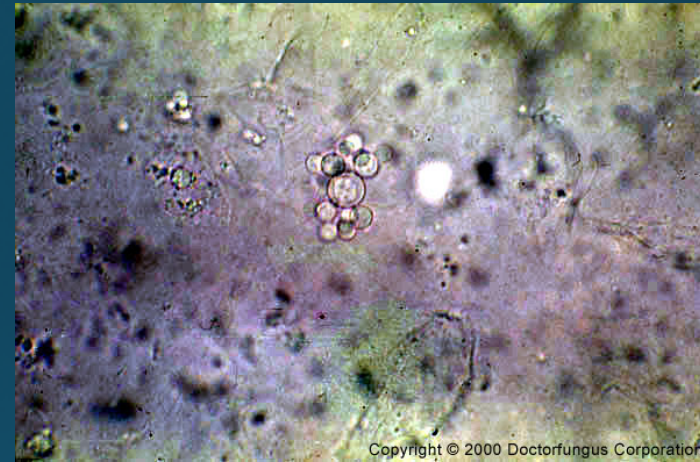
✓ Sorologia: ID, CIEF, FC, Elisa, Immunoblotting.

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.

Exame direto

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



Características Macro/Microscópicas a 25° C

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



Image Courtesy of L. Ajello
Copyright © 2000 Doctorfungus Corporation

Características Macro/Microscópicas a 37° C

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



Histologia

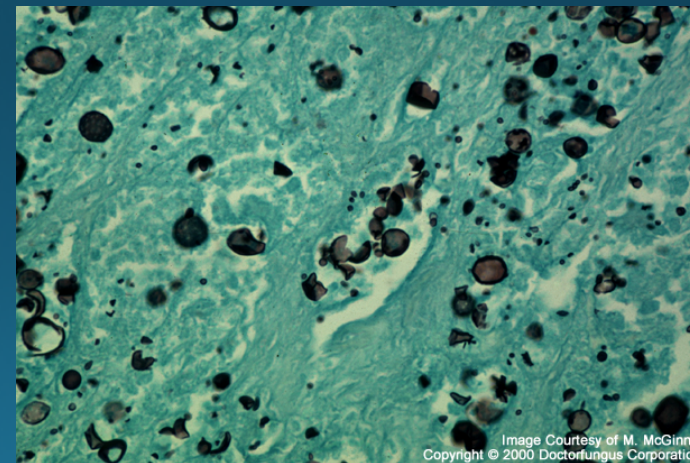
- Permanece umas das mais importantes ferramentas de diagnóstico na micologia.
 - Rápida, baixo custo e capaz de identificar o agente infeccioso.
- Colorações utilizadas
 - GMS (Gomori methenamine silver)
 - H&E (hematoxylin and eosin)

Histológico – Prata

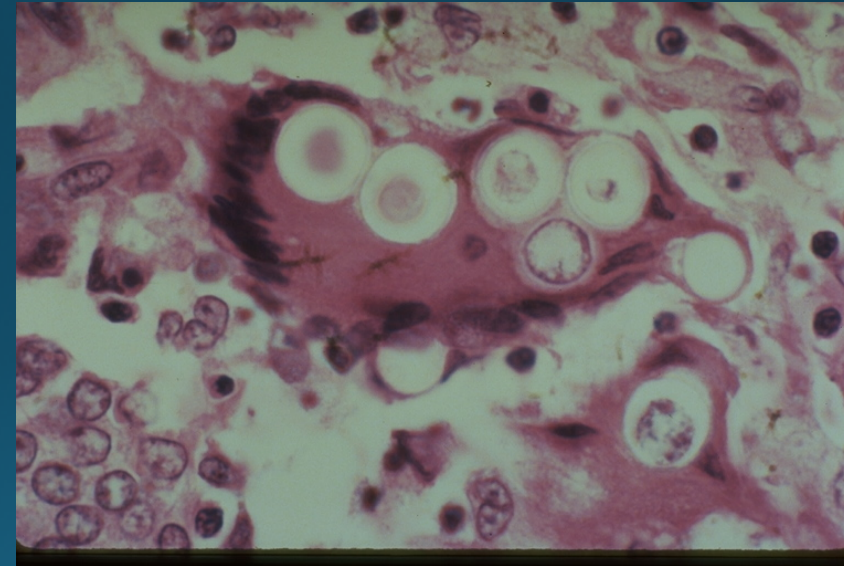
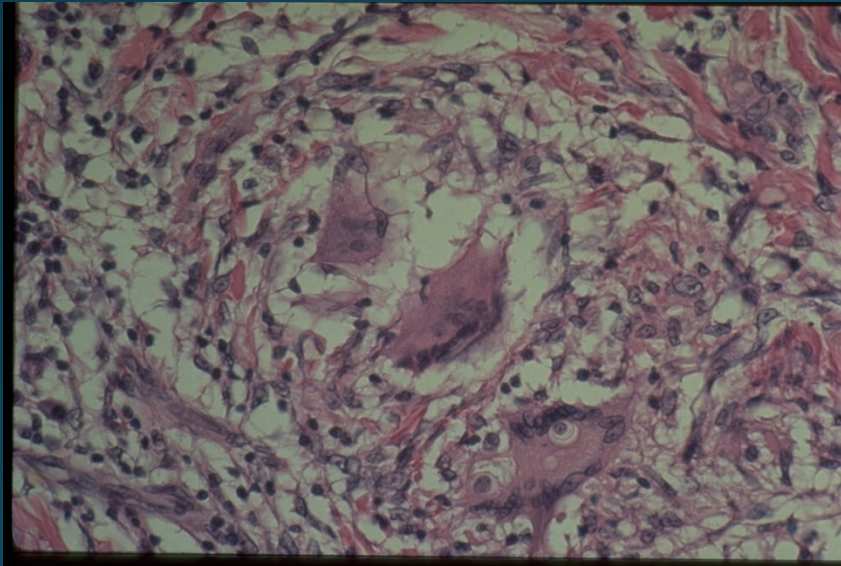
- Prata



- 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 contraímunoeletroforese

- ~~Reação de fixação de complemento.~~

- ELISA, Western blot e Dot Blot.
- Imunofluorescência.

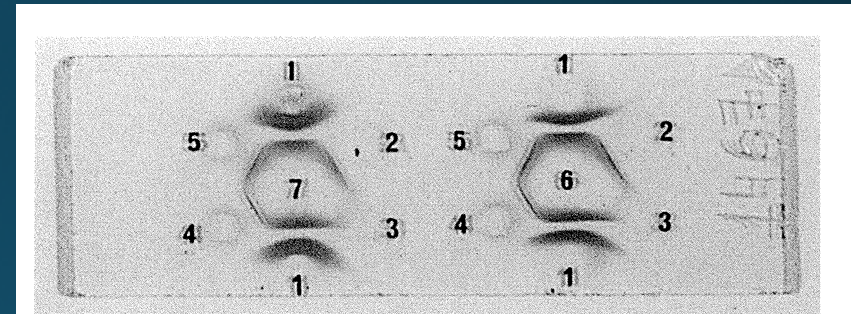


Fig. 5 - Double immunodiffusion. 1, 4 and 5) Paracoccidioidomycosis patients sera; 2) Polyclonal anti-gp43 rabbit serum; 3) Polyclonal anti *P-brasilensis* total produced in rabbit; 6) Metabolic antigen from IBIÁ strain; 7) Metabolic antigen from BAT strain.

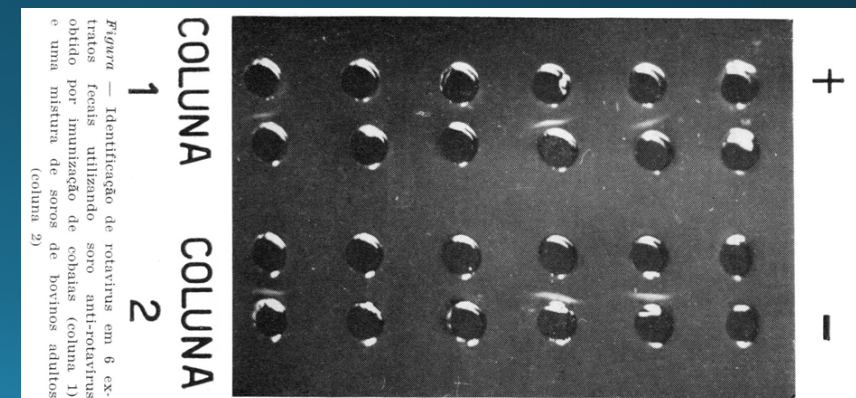


Figura - Identificação de rotavírus em 6 extratos fecais utilizando soro anti-rotavírus obtido por imunização de cobaias (coluna 1) e uma mistura de soro de bovinos adultos (coluna 2)



Serological Diagnosis of Paracoccidioidomycosis: High Rate of Inter-laboratorial Variability among Medical Mycology Reference Centers

Monica Scarpelli Martinelli Vidal¹, Gilda Maria Barbaro Del Negro¹, Adriana Pardini Vicentini², Teresinha Inez Estivalet Svidzinski³, Maria Jose Mendes-Giannini⁴, Ana Marisa Fusco Almeida⁴, Roberto Martinez⁵, Zoilo Pires de Camargo⁶, Carlos Pelleschi Taborda^{1,7}, Gil Benard^{1*}

High Variability in Serological Diagnosis of Paracoccidioidomycosis

Table 1. Details of the protocols used in the serological assays for paracoccidioidomycosis from the 6 reference centers.

Laboratory	Type of reaction	Duration of reaction	Type of buffer	Time of washing in saline	<i>P. brasiliensis</i> isolate(s) used for Ag preparation	Type of Ag/time of growth in culture
IMTSP	CIE ¹	90 m	Veronal ³	48 h	IMTSP113/B339/IMTSP135	Crude filtrate/10 days
FMRPUSP	CIE	60 m	TEB ⁴	24 h	Pb18/B339/BAT/BOAS	Sonicated/15 days
UNESP	CIE	90 m	Veronal	12 h	B339	Crude filtrate/10 days
LEPAC	IDD ²	24 h	Distilled water	24 h	B339	Crude filtrate/7 days
IALSP	IDD	48 h	Distilled water	24 h	B339	Crude filtrate/10 days
UNIFESP	IDD	24 h	Distilled water	24 h	B339	Crude filtrate/10 days

¹) Counterimmunoelectrophoresis.

²) Double Immunodiffusion.

³) Veronal buffer;

⁴) Tris- Borate-EDTA buffer.

doi:10.1371/journal.pntd.0003174.t001

Reação de hipersensibilidade tardia

- Antígeno de Fava Netto (1961) x gp43
- Não tem valor diagnóstico
- Útil para detectar áreas endêmicas
- Pode ser utilizada para avaliar a imunidade celular. Nos casos graves, quando negativa, sugere prognóstico desfavorável

Intradermorreação



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

Mycologic Forum

Molecular diagnosis of endemic and invasive mycoses: Advances and challenges

Beatriz L. Gómez^{a,b}

^a School of Medicine and Health Sciences, Universidad del Rosario, Bogota, Colombia
^b 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).

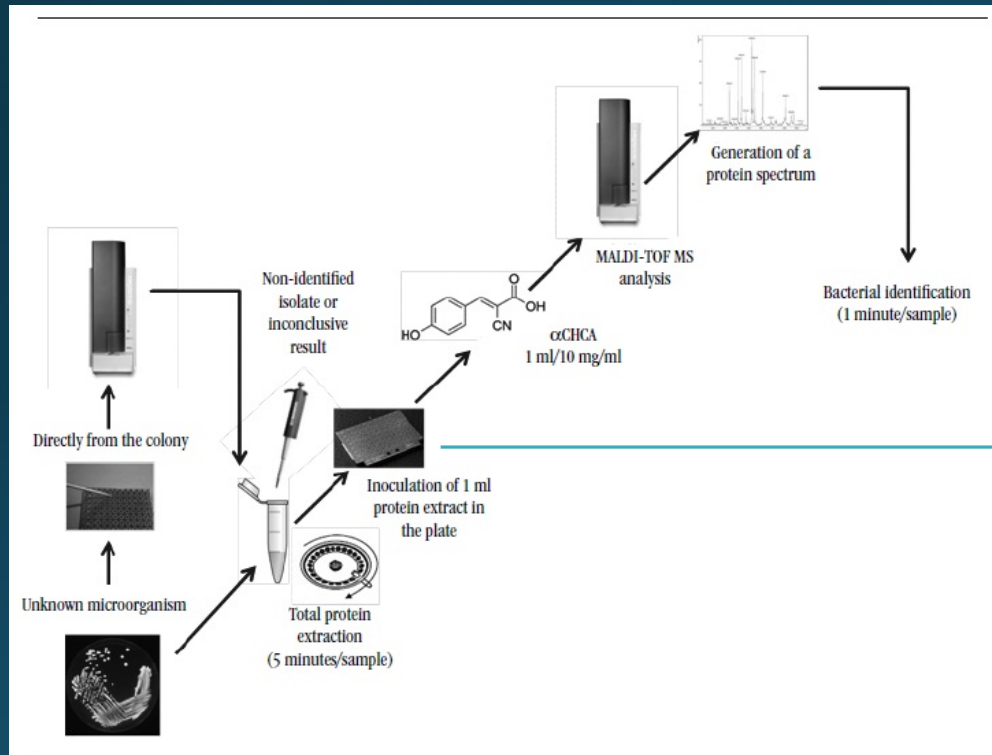
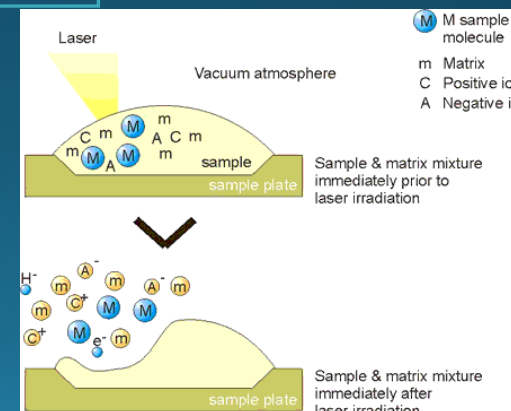
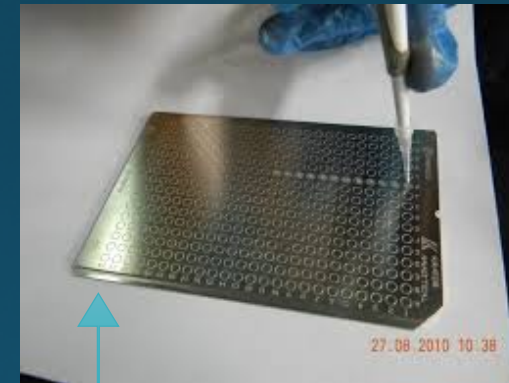


FIGURE 2 – Flowchart of the use of MALDI-TOF MS in microorganism identification at the clinical microbiology laboratory
MALDI-TOF MS: matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry; α CHCA: alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid.

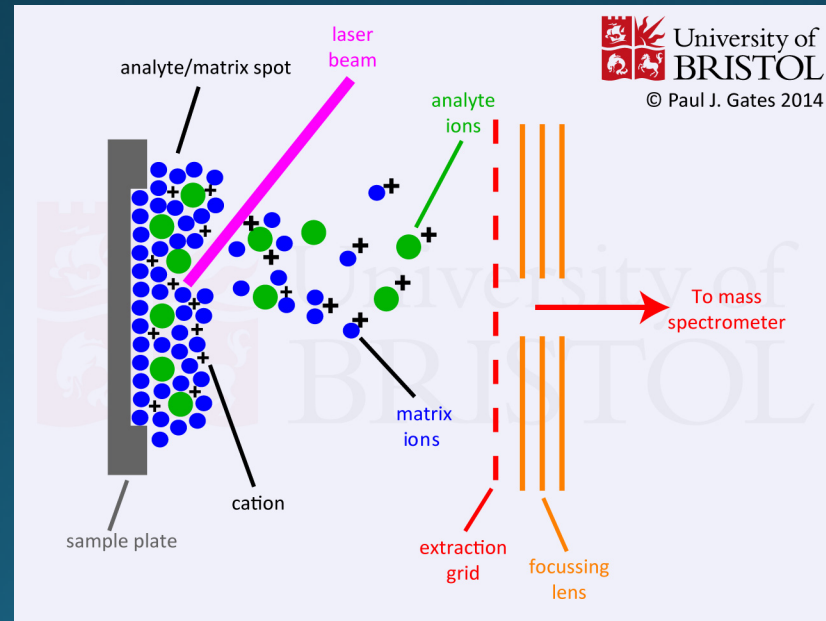


MALDI-TOF

etapas da técnica

Na próxima etapa, o solvente é evaporado, resultando em uma solução sólido-sólido que é depositada sobre a superfície da sonda e em seguida a mistura é submetida a laser de UV, que conduz à volatilização.

Assim um gás com moléculas ionizadas é gerado, sendo esta a condição básica para análise de moléculas por espectrometria de massas.



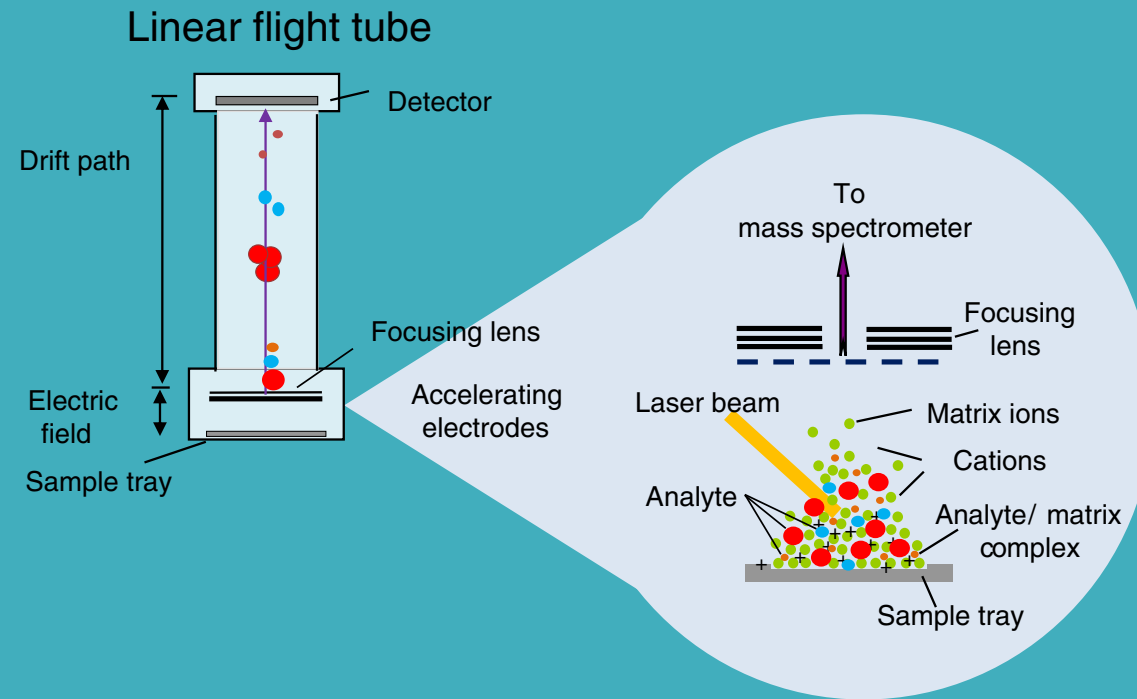
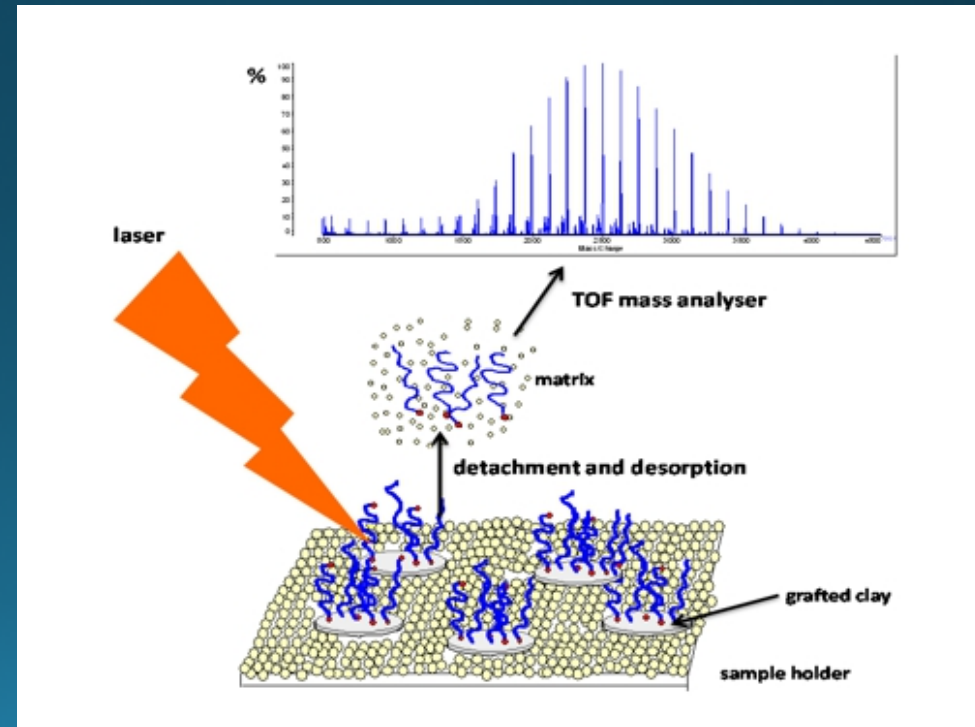


Fig. 1 Principle of MALDI-TOF MS identification of bacteria and yeast in schematic diagram. Laser impact causes thermal desorption of (ribosomal) proteins of bacteria/yeast embedded in matrix material and applied to the target plate (analytes shown as *red, light blue, and orange spheres*, the matrix is given as *green spheres*). In an *electric*

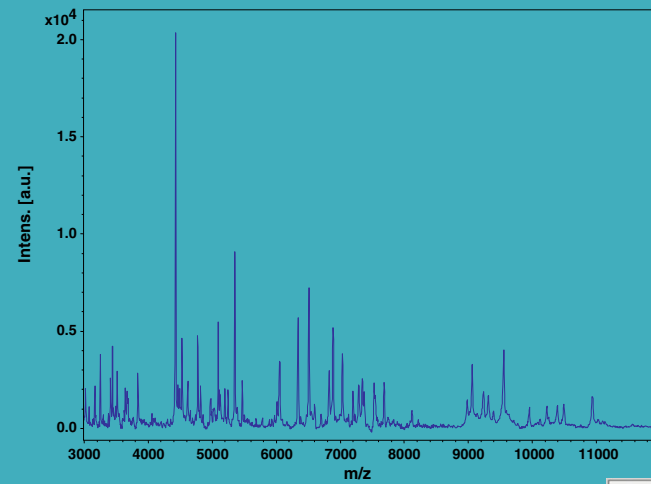
field, ions are accelerated according to their mass and electric charge. The drift path allows further separation and leads to measurable differences in time of flight of the desorbed particles that are detected on *top* of the vacuum tube. From the time of flight, the exact mass of the polypeptides can be calculated

MALDITOF



Análise do resultado

Fig. 3 MALDI-TOF mass spectrum of *Enterococcus faecium*. The measured range of 3,000 to 11,000 Da is displayed. The characteristic mass peaks are predominantly ribosomal proteins. Subsequently, the integrated MALDI software matches the pattern with entries of a database



Ranking	Species Identification	Score Value	NCBI Code
1 (++)	Enterococcus faecium DSM 17050 DSM	2.298	1352
2 (++)	Enterococcus faecium 20218_1 CHB	2.297	1352
3 (++)	Enterococcus faecium 11037 CHB	2.206	1352
4 (++)	Enterococcus faecium DSM 13589 DSM	2.116	1352
5 (++)	Enterococcus faecium DSM 2146 DSM	2.093	1352
6 (++)	Enterococcus faecium DSM 2918 DSM	2.008	1352
7 (+)	Enterococcus faecium PX_21086109_III MLD	1.949	1352
8 (+)	Enterococcus faecium DSM 6177 DSM	1.862	1352
9 (+)	Enterococcus faecium VRE_PX_16086218 MLD	1.83	1352
10 (+)	Enterococcus mundtii DSM 4840 DSM	1.739	53346

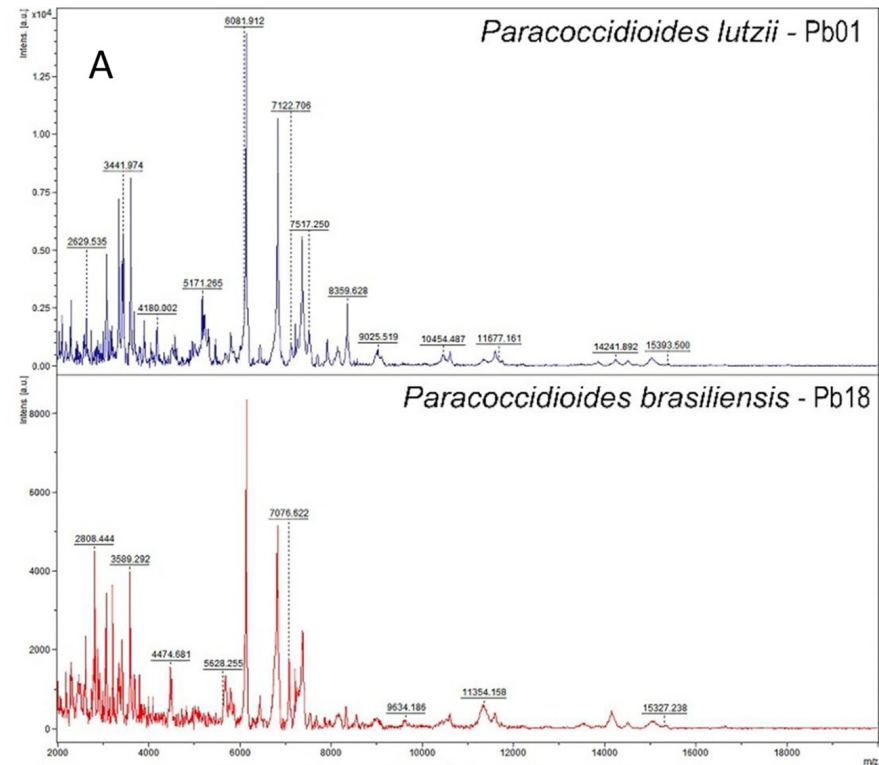
Fig. 4 Computer display of identification results after automatic comparison of the generated spectrum with the MALDI-TOF database. The ten best matching entries are shown in a tabular form. The degree of

similarity to the reference spectrum is represented by a score value. Identification results with score values above 2.0 are considered to be correct for determination of the respective species

Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry for Differentiation of the Dimorphic Fungal Species *Paracoccidioides brasiliensis* and *Paracoccidioides lutzii*

João Nobrega de Almeida, Jr.,^{a,b} Gilda M. B. Del Negro,^b Rafaella C. Grenfell,^c Monica S. M. Vidal,^b Danilo Y. Thomaz,^b Dulce S. Y. de Figueiredo,^b Eduardo Bagagli,^d Luiz Juliano,^c Gil Benard^b

Nobrega de Almeida et al.



Histoplasmose

- **Histoplasmose humana**

Histoplasma capsulatum var. *capsulatum*

Histoplasma capsulatum var. *duboisii*



- **Histoplasmose equina**

Histoplasma capsulatum var.

farciminosum – histoplasmose equina





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

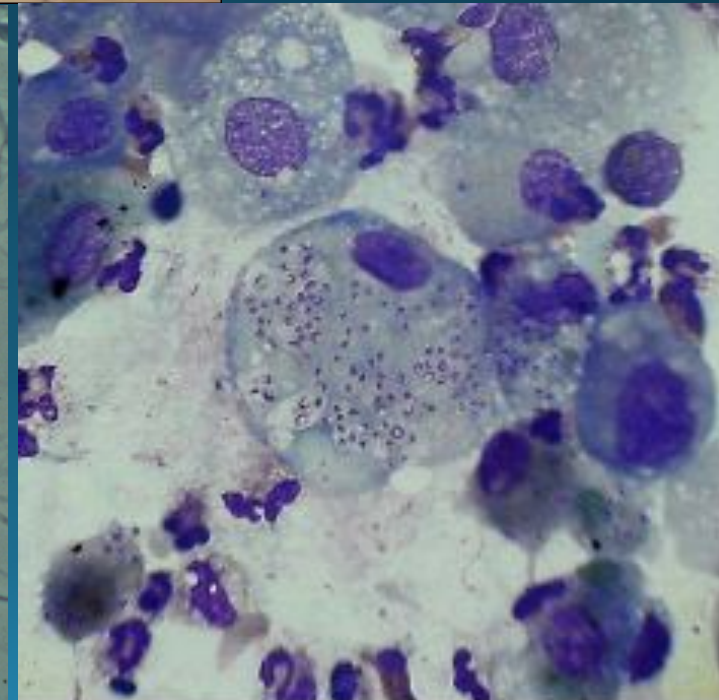
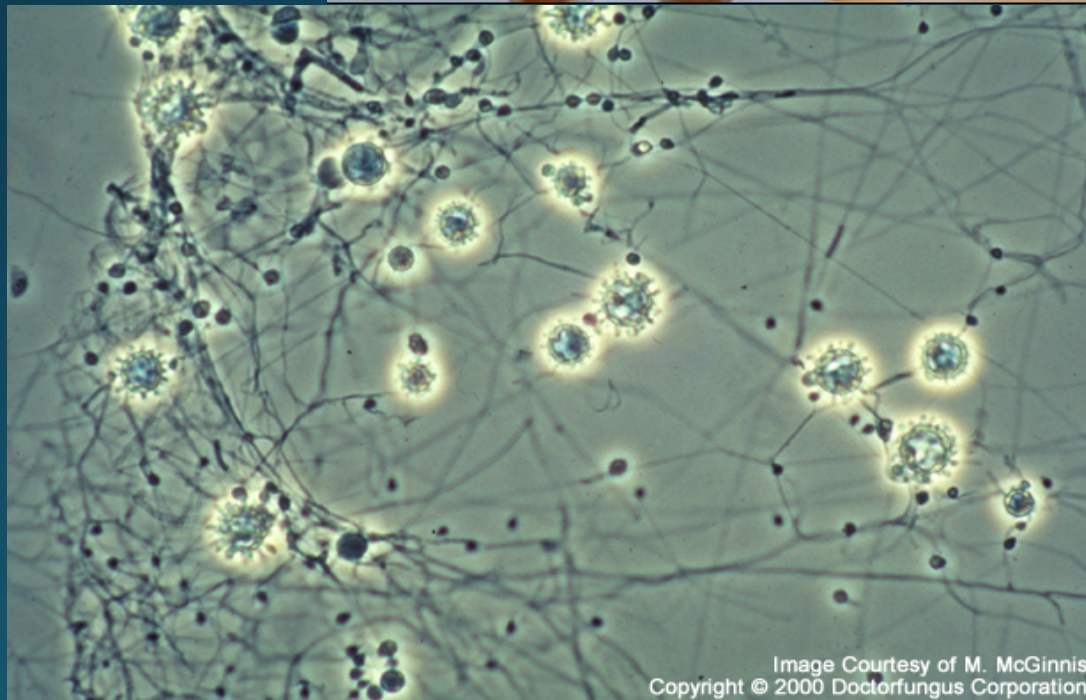


Image Courtesy of M. McGinnis
Copyright © 2000 Doctorfungus Corporation

HISTOPLASMOSE

Doença em humanos

- **Inalação de conídios/micélio 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 indivíduo aparentemente sem doença associada:**

Primo-infecção assintomática

Infecção pulmonar aguda

Pacientes com DPOC – forma pulmonar crônica

✓ **No paciente imunodeprimido:**

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

Infecção pulmonar aguda

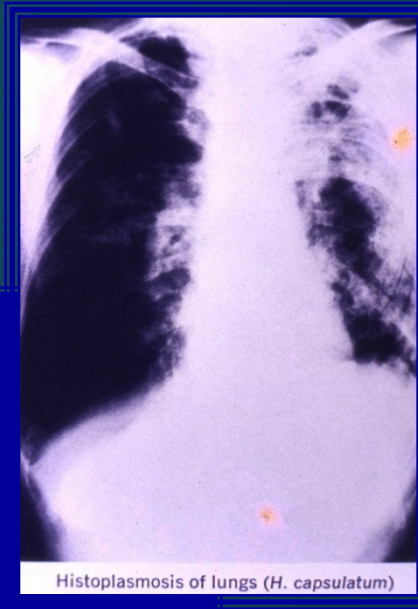


- ✓ Sintomas inespecíficos autolimitada – 2 a 6 semanas
- ✓ RX infiltrado intersticial, nódulos, adenomegalia, derrame pleural
- ✓ Provas sorológicas - maior positividade entre 2º e 3º mês
- ✓ Histoplasmina positiva

HISTOPLASMOSE

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*)

HISTOPLASMOSE

Infecção disseminada aguda

- Hepatoesplenomegalia, adenomegalias generalizadas, pancitopenia, lesões cutâneas polimorfas
- Meningoencefalite (< 20%)
- Raio X de tórax - infiltrado micronodular e adenopatias hilares

Infecção subaguda

- Evolução prolongada
- Deterioração lenta do estado geral

HISTOPLASMOSE

Disseminada crônica

- **Evolução – meses**
- **lesões mucosas - 90%**
 - **localização : oral, faringe, laringe, septo nasal**
 - **Polimorfias**
- **Insuficiência adrenal e lesões cutâneas - 10%**
- **Pouco frequente - meningoencefalite, endocardite, aortite**







DMP



HISTOPLASMOSE DIAGNÓSTICO

Isolamento do fungo

Demonstração de leveduras: exame direto

Cultura (semans – meses)

- Macroconídio tubercular;
- Sangue / mo - 4 a 6s: Preferencialmente lise-centrifugação: 2x mais rápido lise-centifugação (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

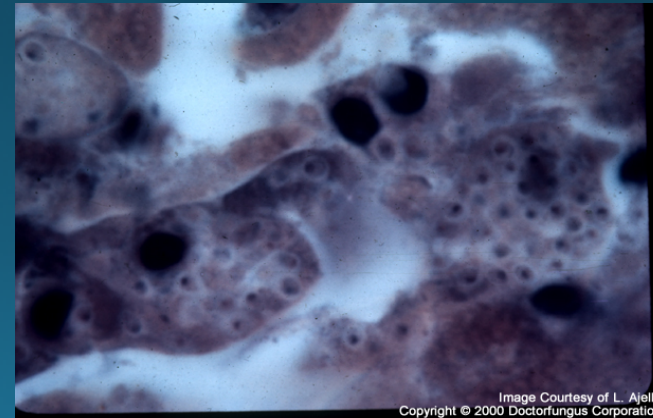
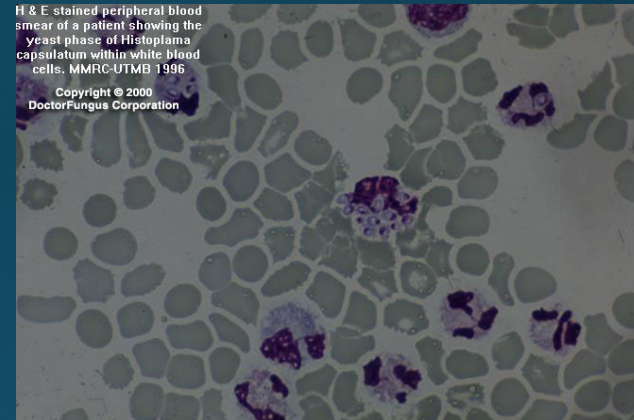
- ✧ 50-80% (ID, CIE)
- ✧ Western blot
- M = aguda – presente na crônica - meses a anos H = formas graves, raramente encontrada

Detecção de antígeno (> na dça grave)

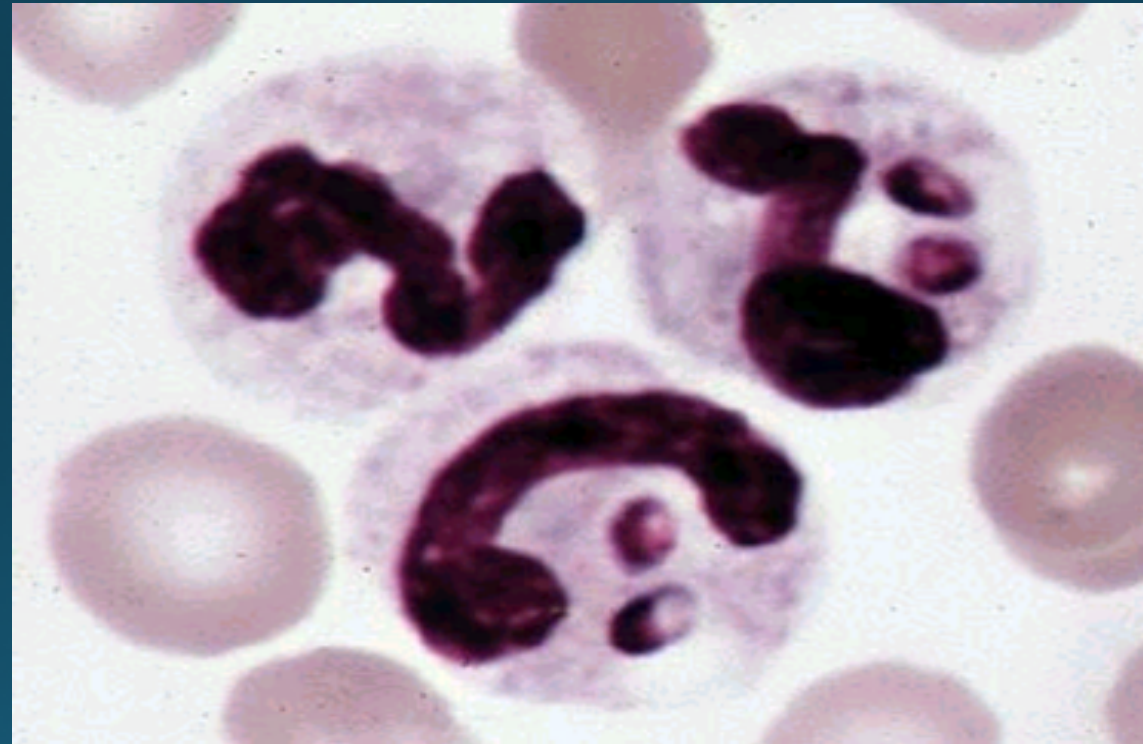
- ✧ urina ~90%, soro ~80%, LBA:70-84%
- ✧ monitorar tratamento e recaídas

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

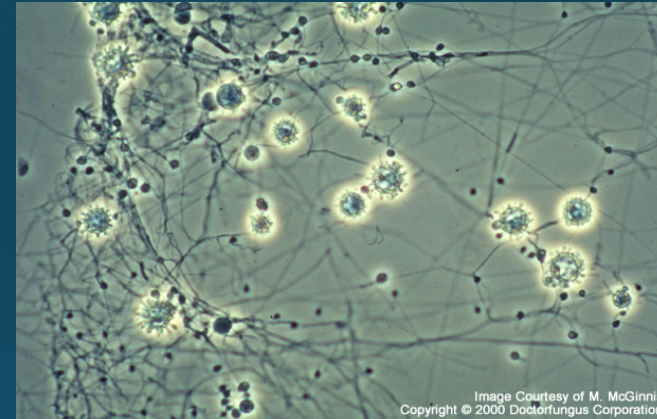
S



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%

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

Histoplasmose – sorologia

- Imunodifusão

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

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