

Micoses Sistêmicas Endêmicas Prevalentes na América do Sul

Carlos Pelleschi Taborda, Ph.D.

Instituto de Ciências Biomédicas – USP

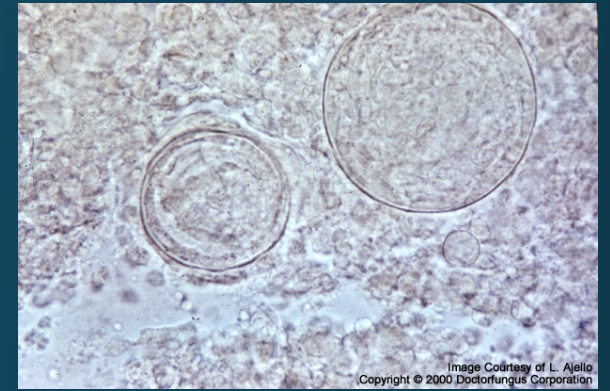
Instituto de Medicina Tropical de São Paulo - FMUSP

- 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*) *marneffe*
 - *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.

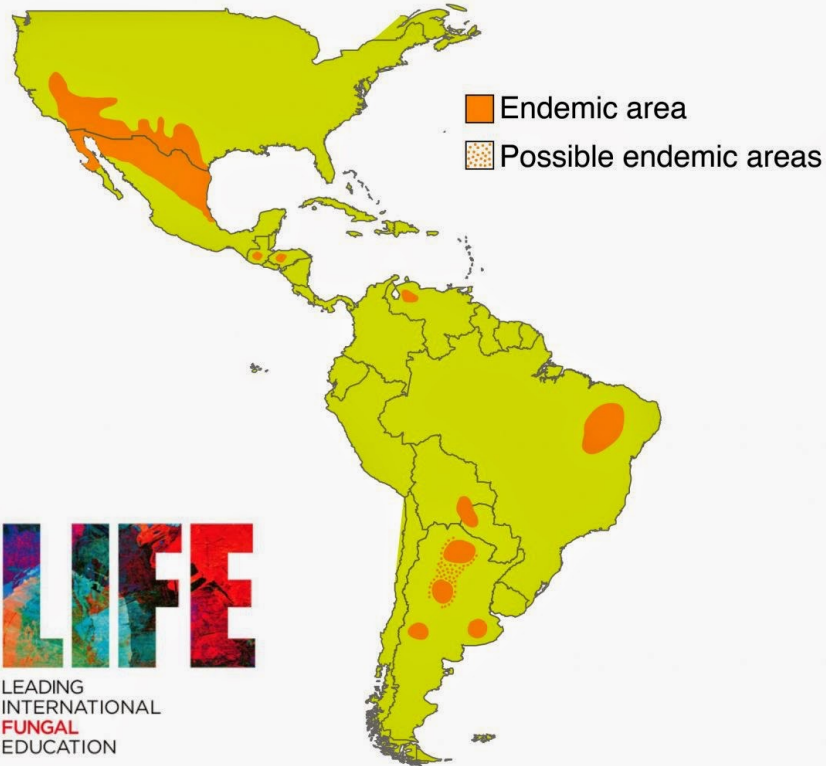
Fungos causadores de micoses sistêmicas apresentam uma série de características em comum

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

Coccidioides spp.



Coccidioidomycosis

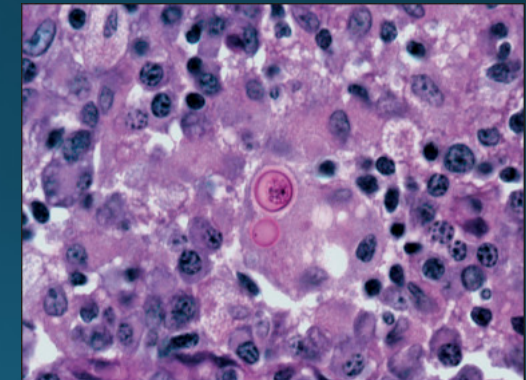
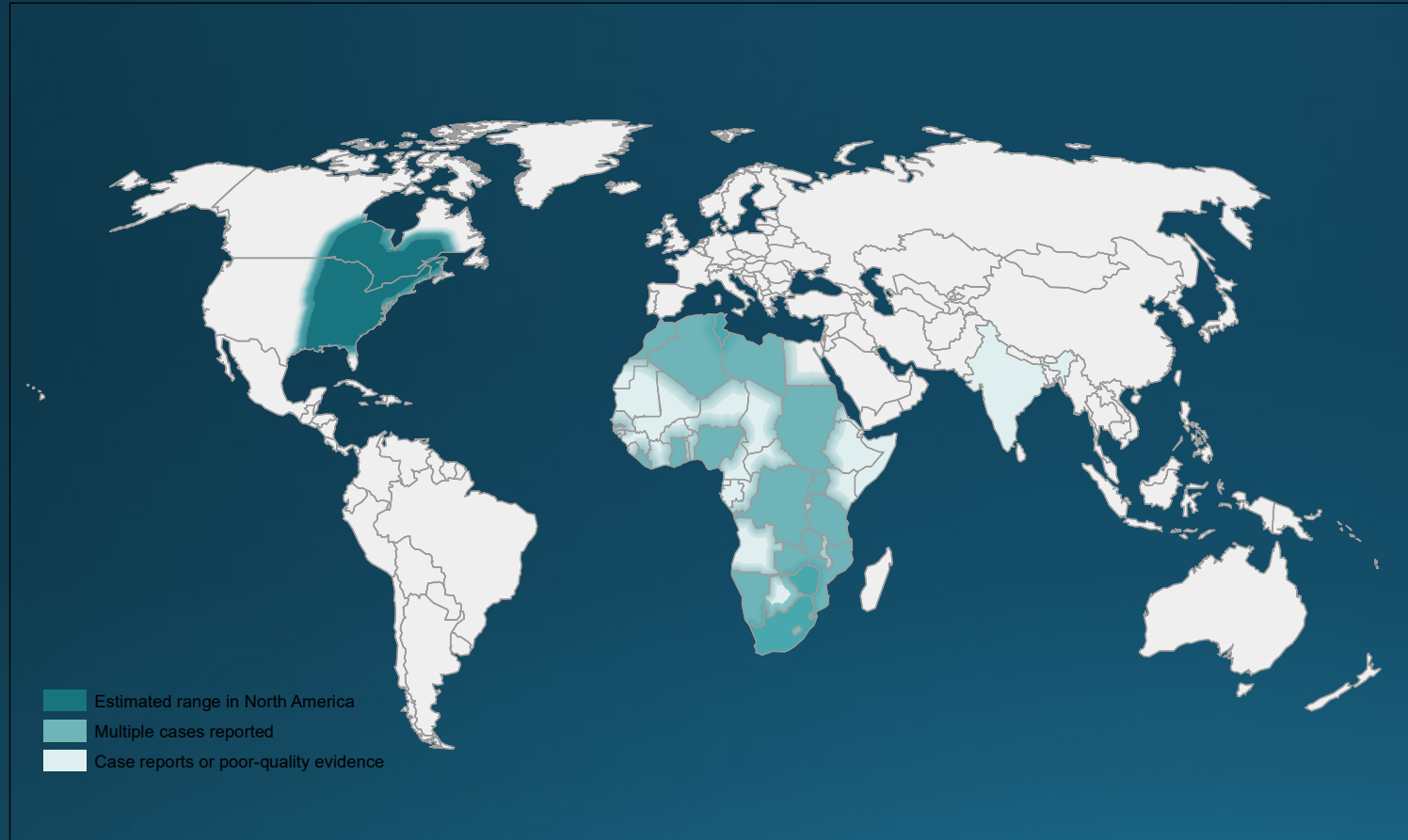


Frequency of different manifestations of coccidioidomycosis after exposure

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 ↑
	←	←	←

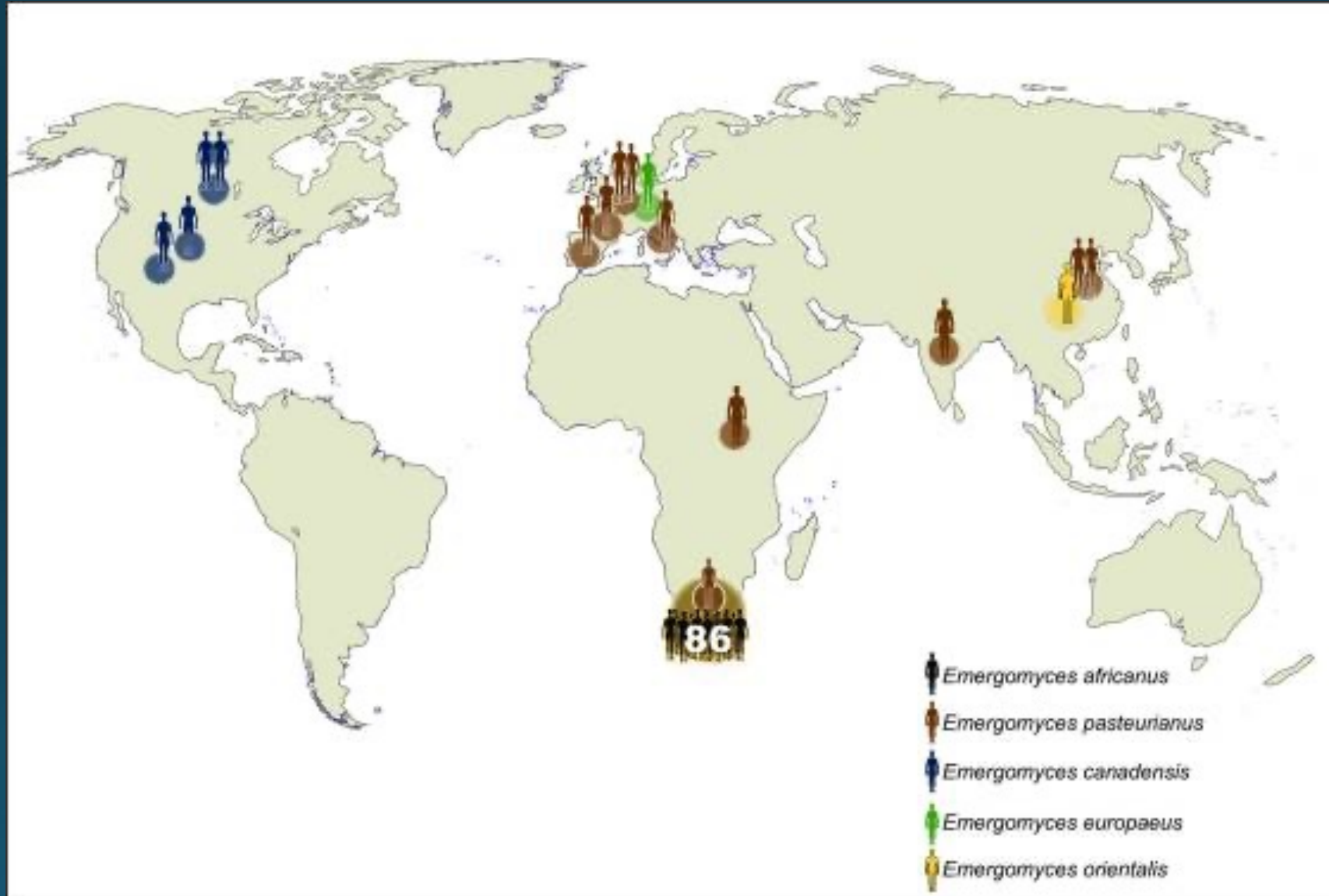
LIFE
LEADING INTERNATIONAL FUNGAL EDUCATION

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



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

Emergomyces spp.



Diagnóstico Laboratorial Microbiológico e Imunológico

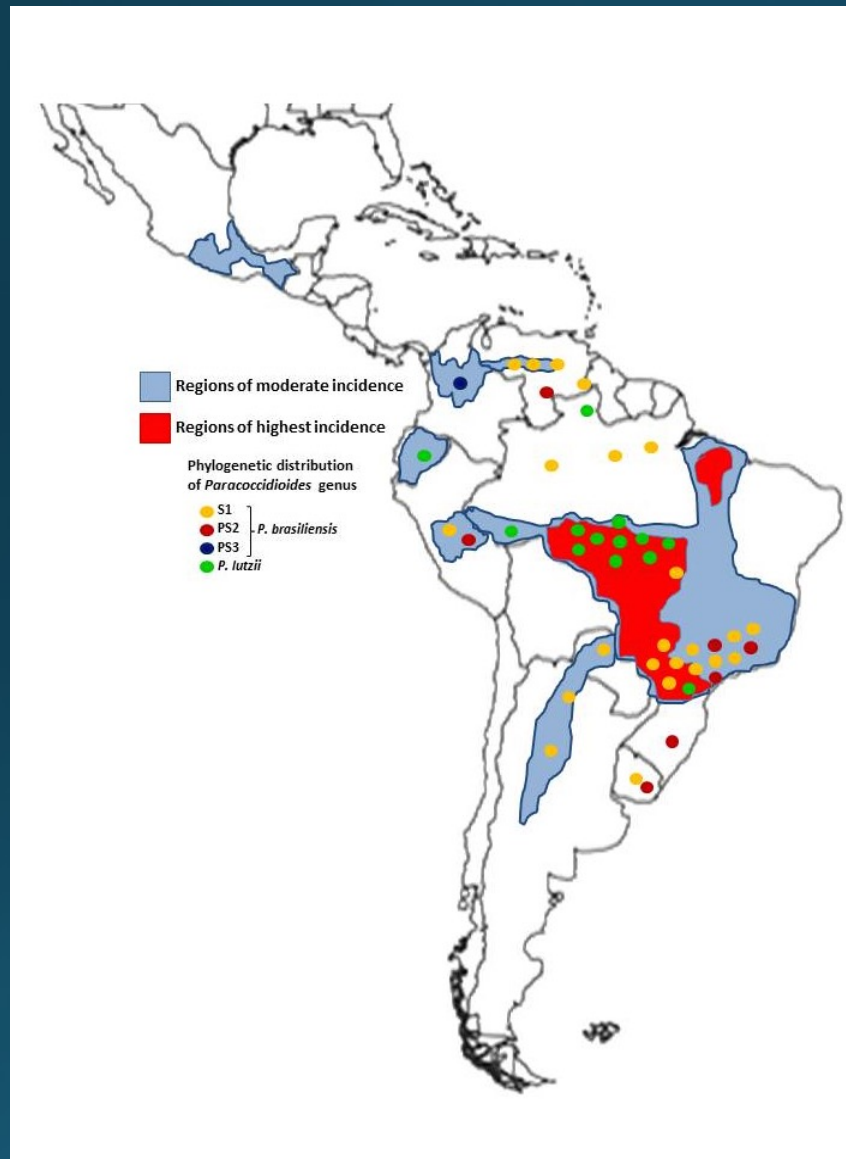
- Epidemiológico
- Clínico
- Micológico
 - Visualização direta
 - Cultura
 - Histológico
- Sorológico – diagnóstico e acompanhamento
 - Pesquisa de antígenos e anticorpos
- Teste cutâneo (?)
- Teste molecular e proteômico

Hipóteses Diagnósticas

com base no quadro clínico

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

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



Species boundaries in the human pathogen *Paracoccidioides*

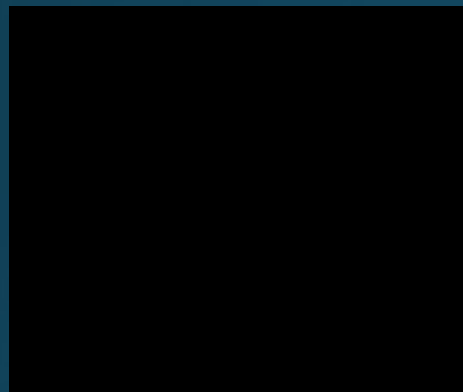
David A. Turissini^a, Oscar M. Gomez^{b,c}, Marcus M. Teixeira^d, Juan G. McEwen^{b,e},
Daniel R. Matute^{a,*}



Paracoccidioidomicose

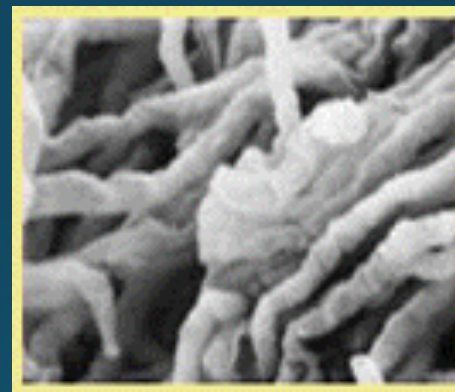
Dimorfismo térmico

35-37°C



FORMA DE LEVEDURA

25-27°C



FORMA DE BOLOR



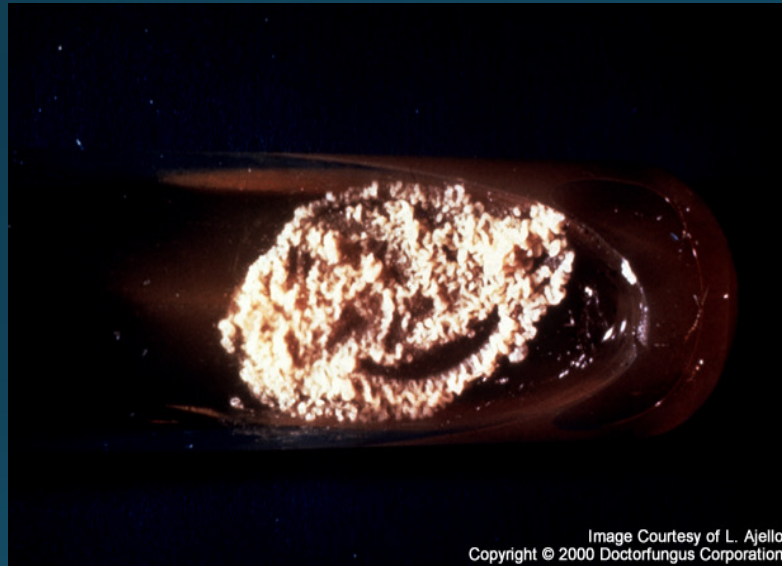
ISOLAMENTO

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

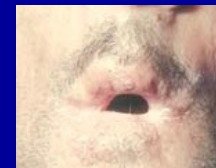
Moderada

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).





Paracoccidiodomicose 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.
- Paracoccidiodina pode ser + em casos leves; sorologia positiva (ID + e CIEF +)



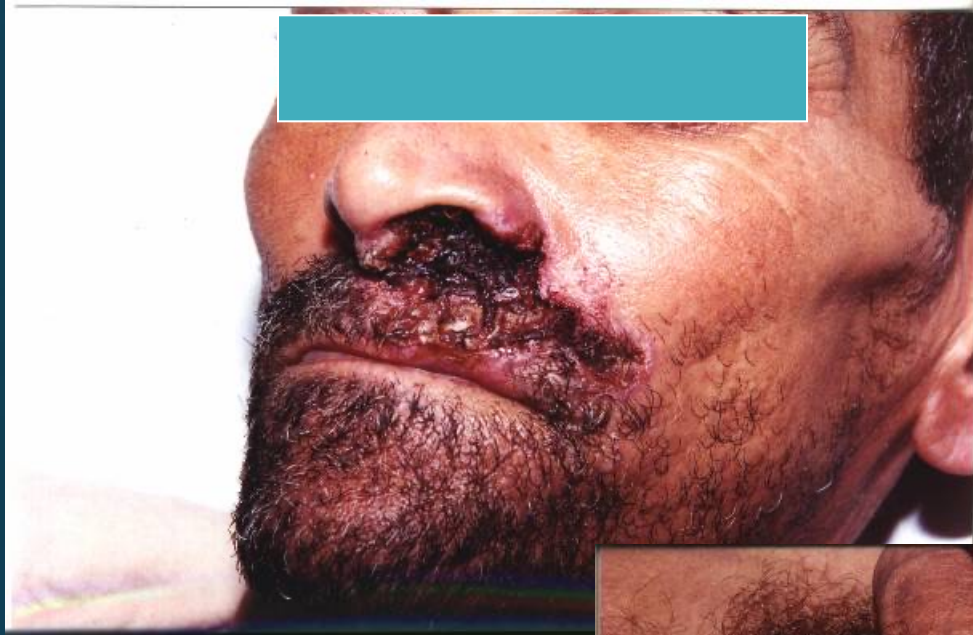




Copyright © 2005, 2004, 2000, 1995, 1990, 19

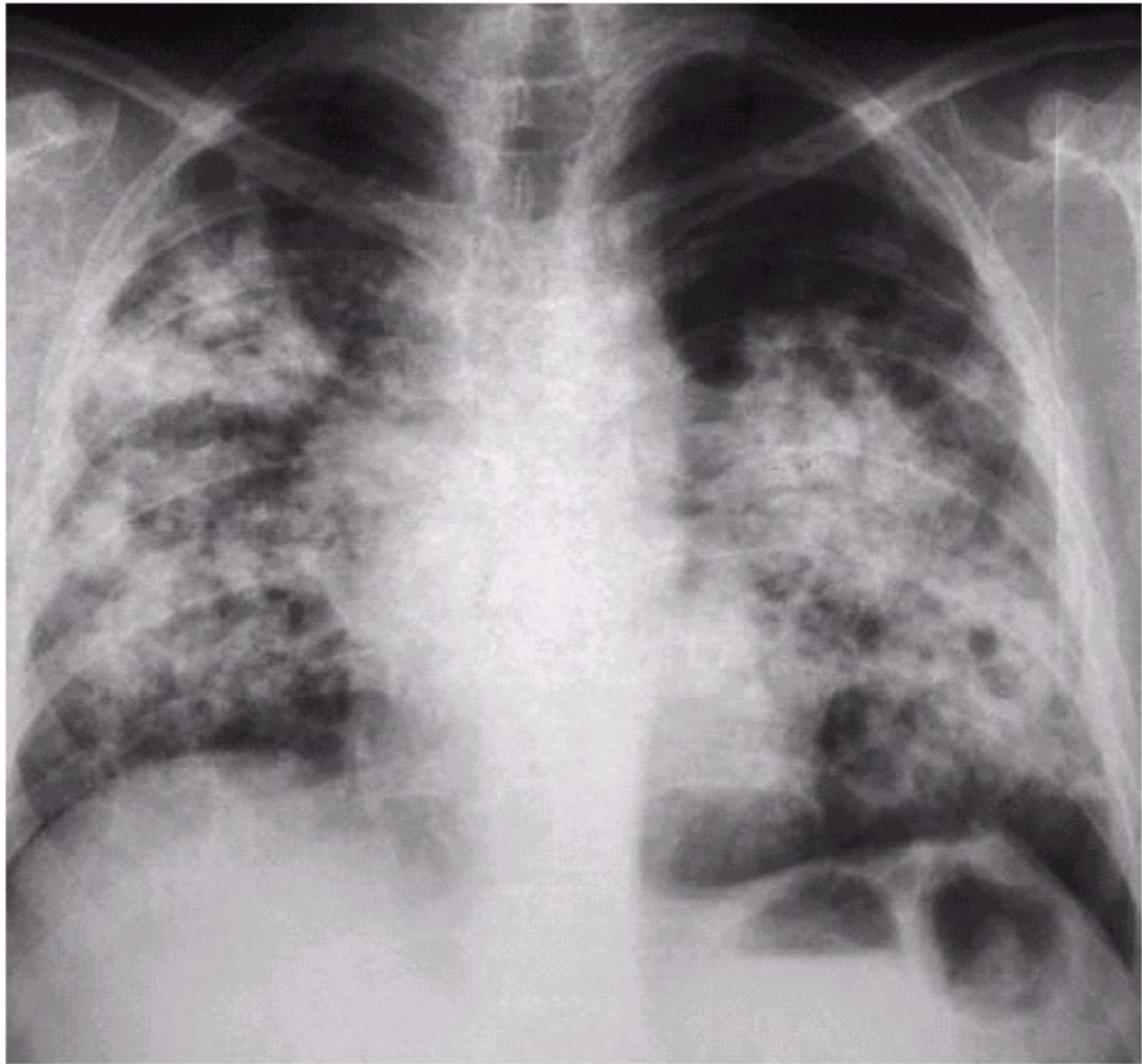


Copyright © 2005, 2004, 2000, 1995, 1990, 1985, 1979 by Elsevier Inc.



03/10/02





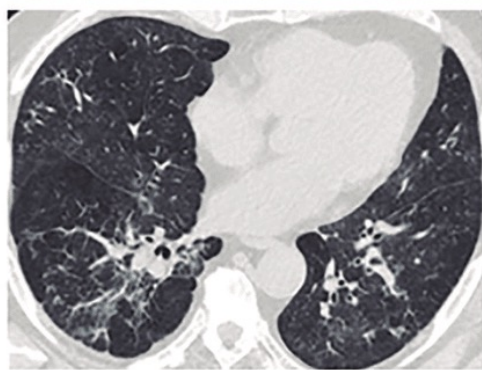
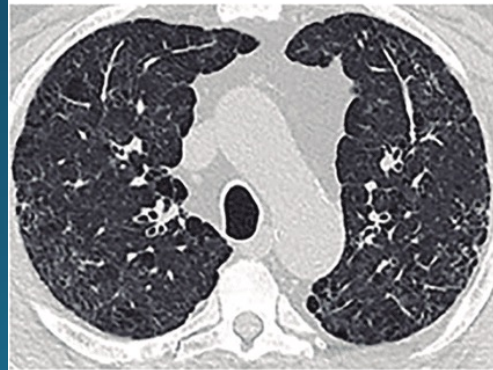
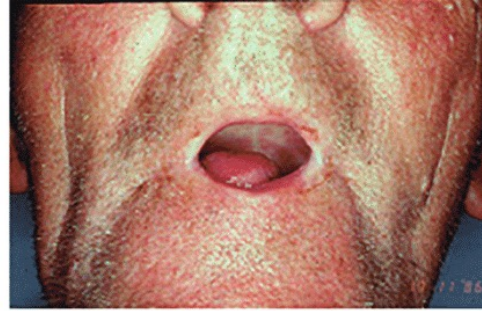
Copyright © 2005, 2004, 2000, 1995, 1990, 1985, 1979 by Elsevier Inc.

Paracoccidiodomicose 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.

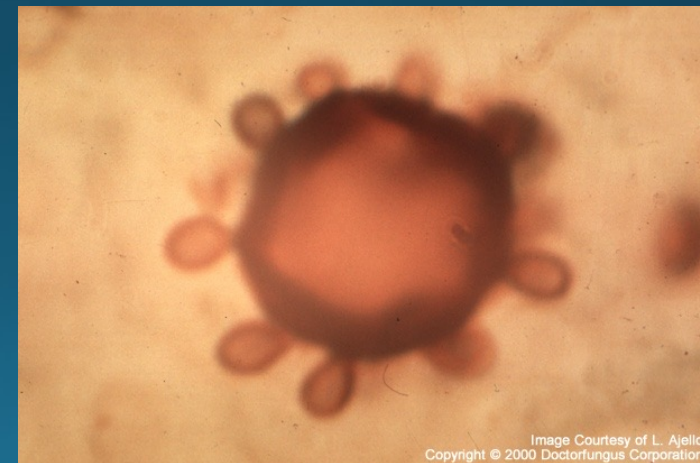
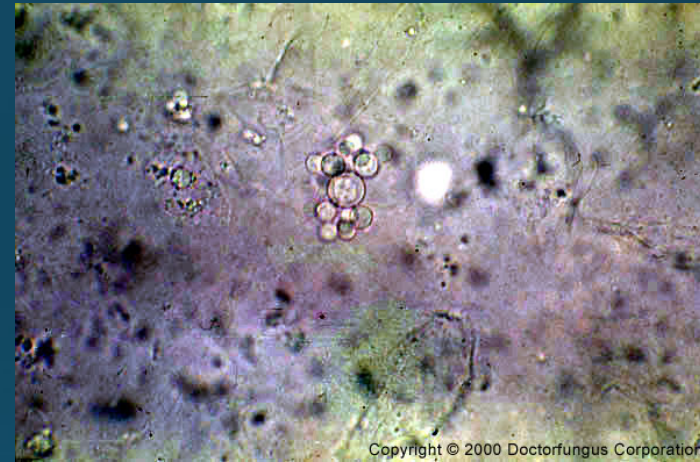
✓ Exames de imagem.

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

Exame direto

- Material processado com 10% de KOH
 - Exame direto

- Células leveduriformes de 2 a 40 até 60 μm , 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

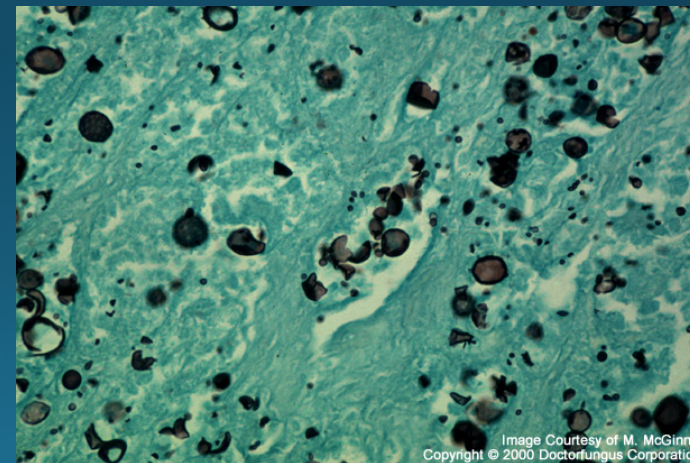
- Permanece umas das mais importantes ferramentas de diagnóstico na micologia.
 - Rápida, baixo custo e capaz de identificar o agente infeccioso.
- Colorações utilizadas
 - GMS (Gomori methenamine silver)
 - H&E (hematoxylin and eosin)

Histológico – Prata

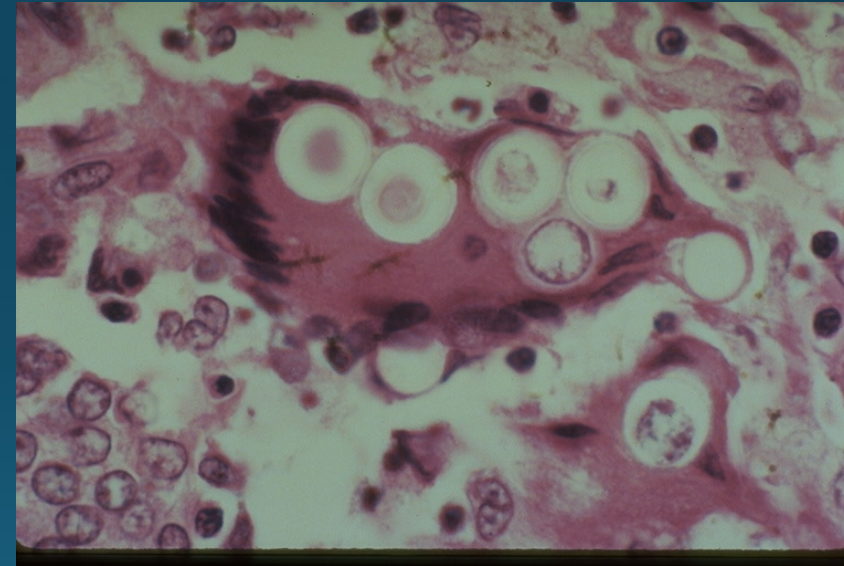
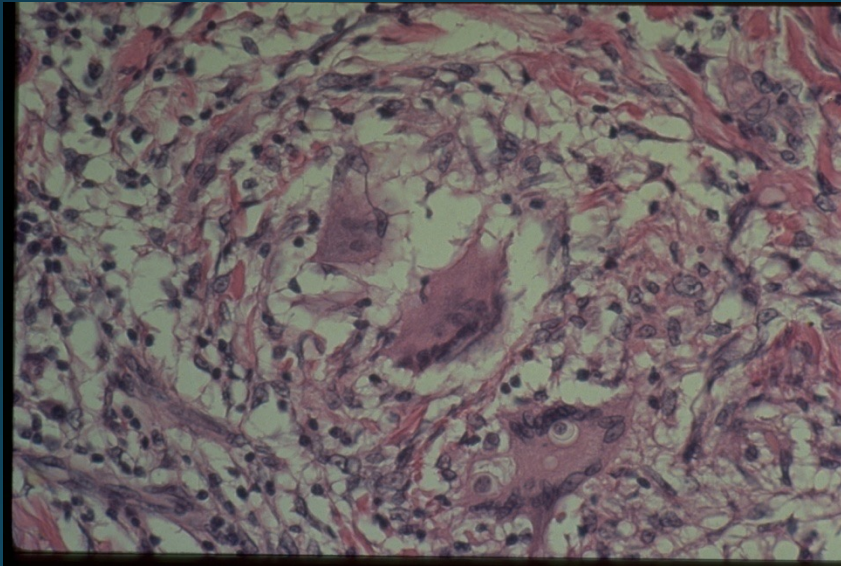
- Prata



- 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.

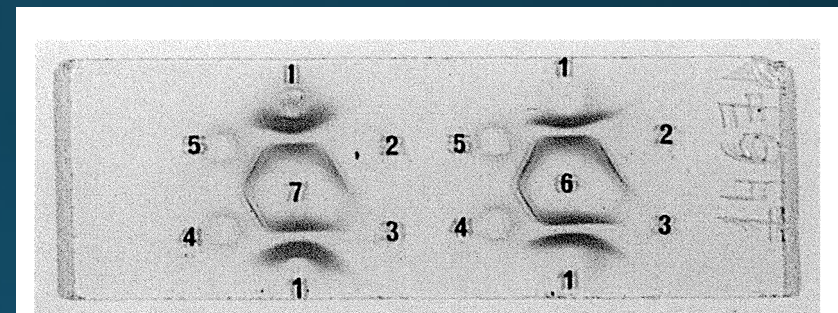
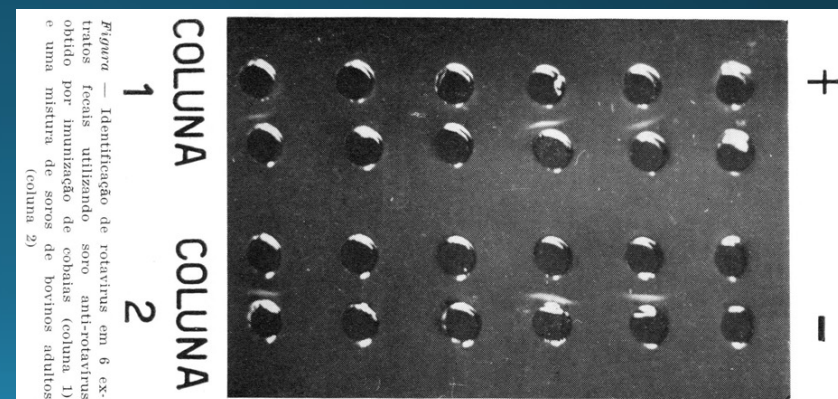


Fig. 5 - Double immunodiffusion. 1, 4 and 5) Paracoccidioidomycosis patients sera; 2) Polyclonal anti-gp43 rabbit serum; 3) Polyclonal anti *P-brasiliensis* total produced in rabbit; 6) Metabolic antigen from IBIÁ strain; 7) Metabolic antigen from BAT strain.



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

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



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).

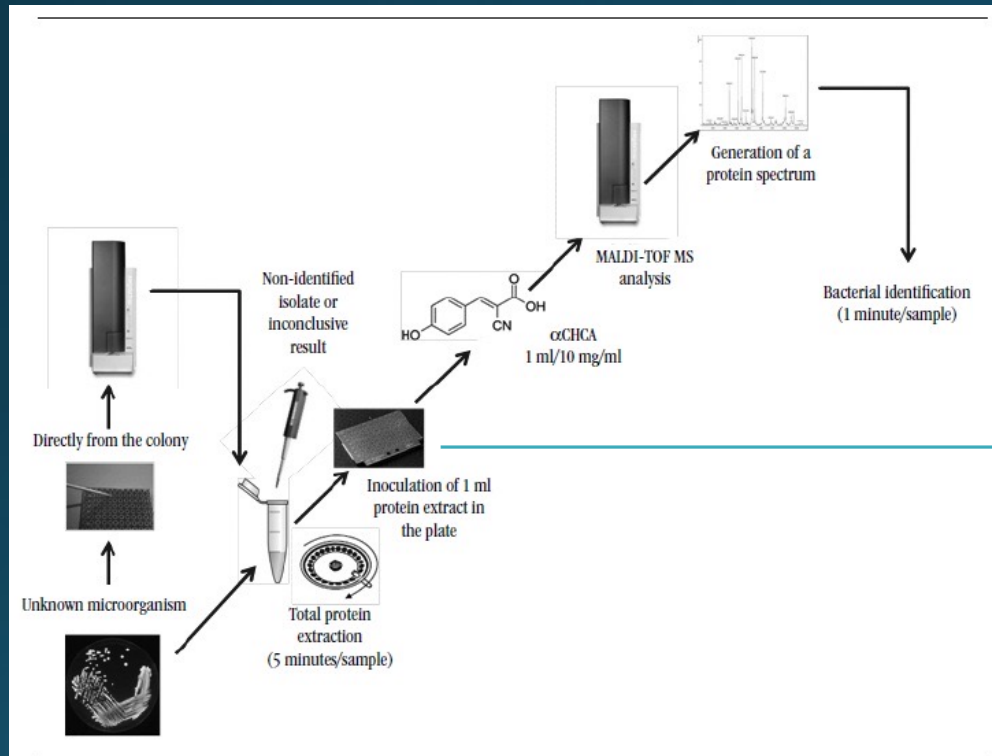
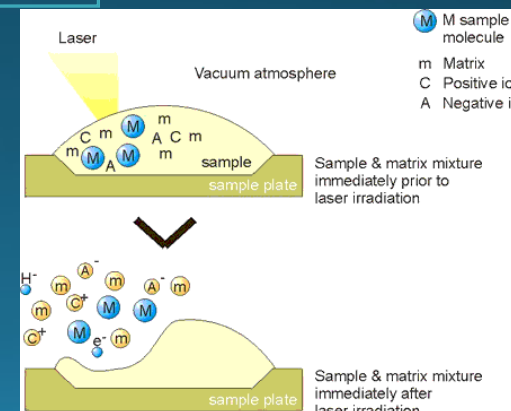
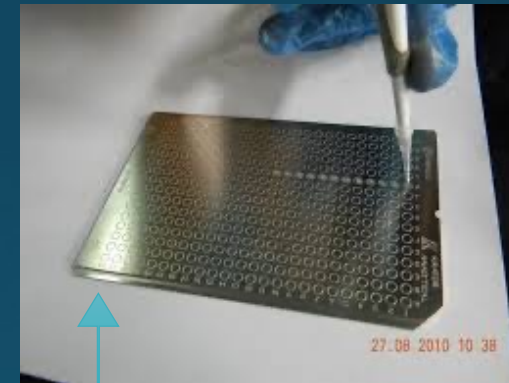


FIGURE 2 – Flowchart of the use of MALDI-TOF MS in microorganism identification at the clinical microbiology laboratory
MALDI-TOF MS: matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry; α CHCA: alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid.



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

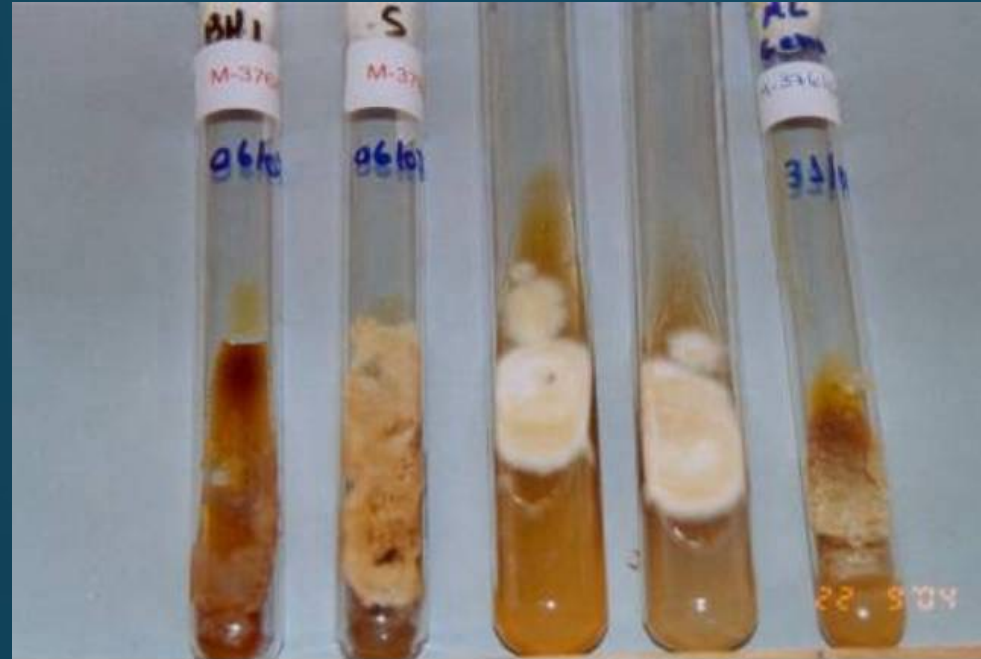
- *H. capsulatum var. duboisii*

- 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

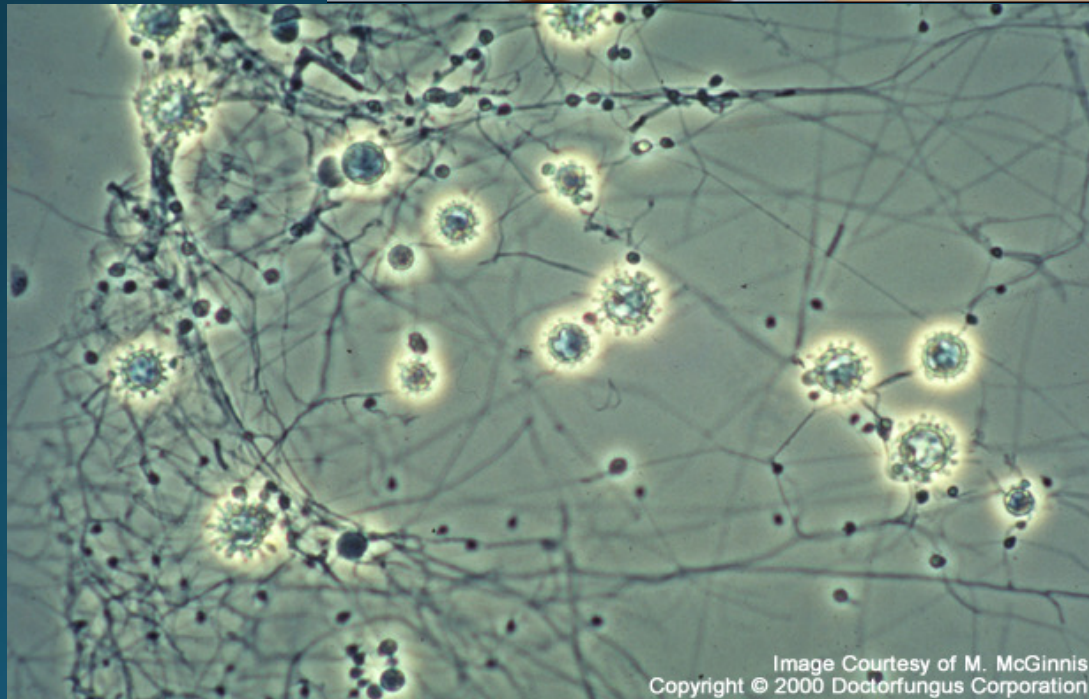
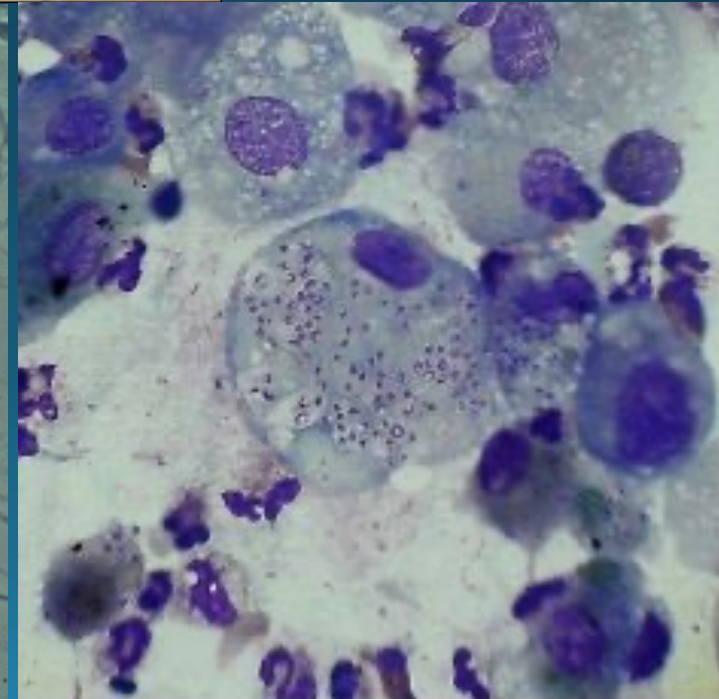


Image Courtesy of M. McGinnis
Copyright © 2000 Doctorfungus Corporation



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!!!!!!!!!!

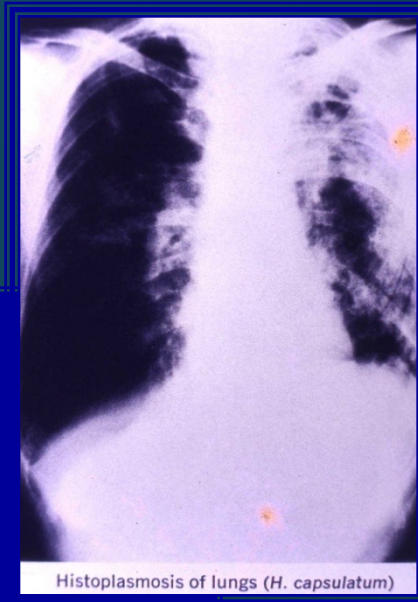
Infecção pulmonar aguda



- ✓ 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)

- Macroconidio 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

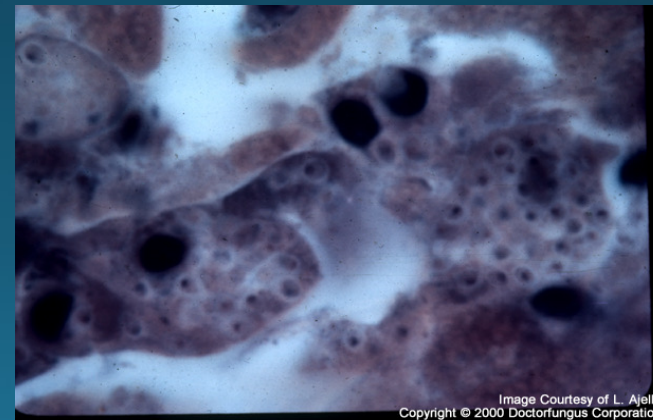
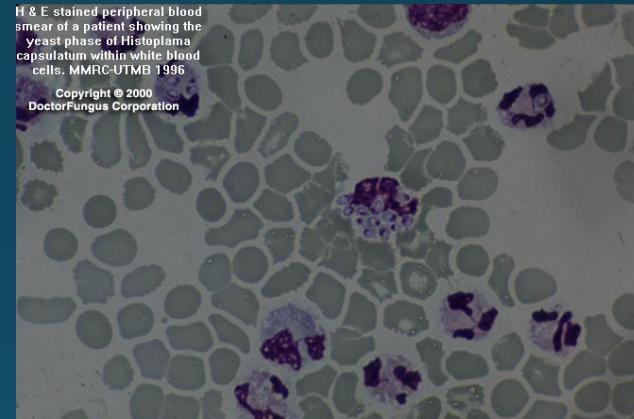
- M = aguda – presente na crônica - meses a anos H = formas graves, raramente encontrada

Detecção de antígeno (> na dça grave)

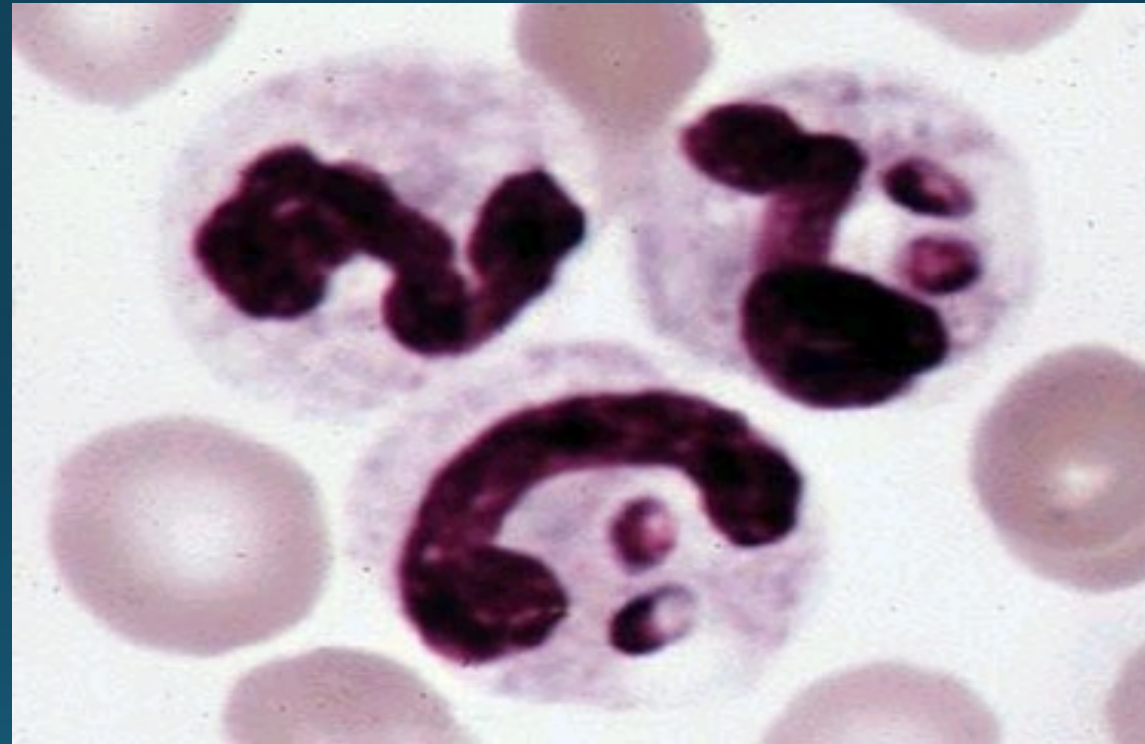
- ✧ urina ~90%, soro ~80%, LBA:70-84%
- ✧ monitorar tratamento e recaídas

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

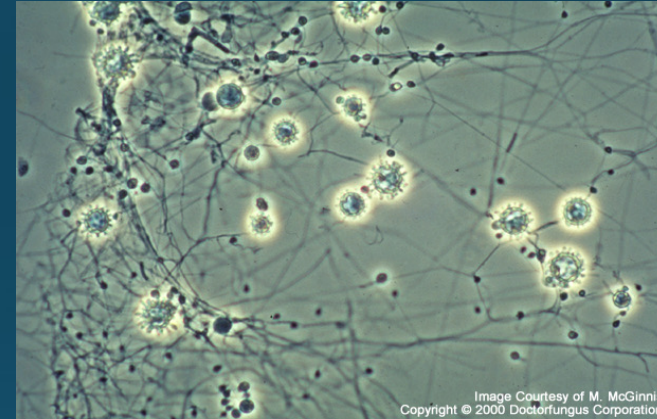
S



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%

- 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