Diagnóstico Micológico

T.M María Cristina Diaz J
Profesor Asociado
Programa de Microbiologia y Micología
ICBM, Facultad de Medicina
Universidad de Chile
mcdiaz @med.uchile.cl

DIAGNOSTICO

MÁS RAPIDO

MÁS EFICIENTE

Enfermedades fúngicas invasoras (EFI) :

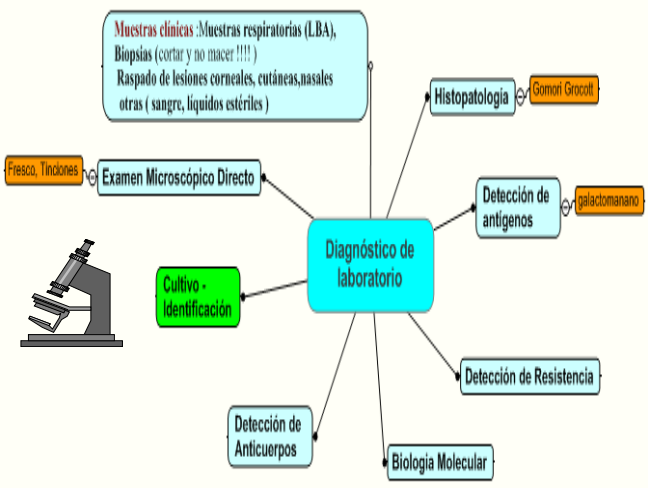
elevados porcentajes de mortalidad

¡Tratamiento antifúngico

IMPACTO CLINICO

DIAGNÓSTICO MICOLÓGICO

- **Diagnóstico etiológico** frente a un cuadro clínico sospechoso de micosis .
- **Estudio susceptibilidad antifúngica "in vitro"** : Ej. Scedosporium
- **Información epidemiológica :**
  Diferenciación intraespecies : métodos fenotípicos y genotípicos.



DIAGNOSTICO MICOLOGICO : ETAPAS

- Sospecha clínica
- Toma y transporte de muestras clínicas
- EXAMEN MICOLOGICO
  - Examen microscópico directo
  - Cultivo - Identificación
- Inmunodiagnóstico
- Histopatología
- Biologia Molecular

Toma y transporte de muestras clínicas

Sitios estériles : LCR, sangre,médula ósea, tejidos, líquidos corporales, orina cateterizada

Sitios no estériles :

Muestras respiratorias (expectoración, aspirados traqueales, cepillados y lavados bronquiales)

orina 2 °micción

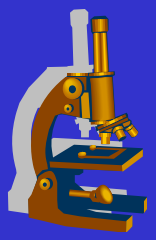
lavados gástricos

piel, pelo, uñas

heridas operatorias

Cavidad orofaríngea , vagina, deposiciones

Examen microscópico directo

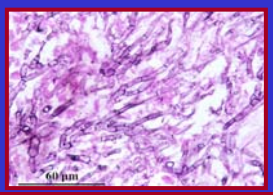


Diagnóstico en tiempo real (menos de 10 min)

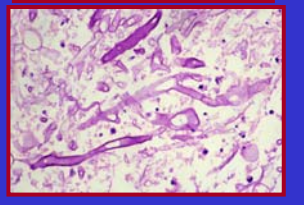
- Método sencillo, rápido y barato.
- Observar características morfológicas específicas.
- Un informe rápido al clínico - inicio de tratamiento.
- Evidencia de infección - cultivo negativo - Pacientes en tratamiento.

Estructuras fúngicas

Hifas septadas hialinas (3-4 u) *Aspergillus, Fusarium, Paecilomyces*



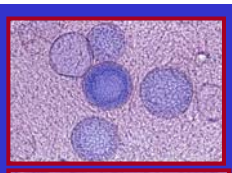
Hifas aseptadas (6-10 u) Zygomycetes



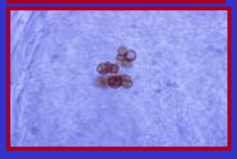
Hifas septadas pigmentadas (3-4 u):….. *Alternaria, Bipolaris, Curvularia*

Hifas hialinas , septadas , artroconidios ..... *Trichophyton*

Esférulas *Coccidioides*



Células muriformes - cuerpos escleróticos *Phialophora*



Levaduras (blastoconidios)
Levaduras encapsuladas
..... *Cryptococcus*

Globosas

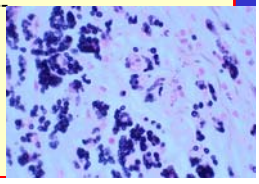
Brotación múltiple, base angosta .....*Paracoccidioides*

con base ancha ..... *Blastomyces*

Brotación simple, con base angosta ------

Cryptococcus

Histoplasma



Ovoides

4- 7 u..... *Candida*

2-3 u .....*Candida, Histoplasma, Sporotrix*

levaduras intracelulares.....*Histoplasma*

levaduras , pseudohifas ..... *Candida*

blastoconidio, artroconidios ,hifas .....*Trichosporon*

EXAMEN MICROSCOPICO DIRECTO

- Método : Observación al fresco
- Ej. LCR
- Levaduras redondas , sugerentes de *C. neoformans*.
- Diferenciar de glóbulos rojos, gotas de grasa .

- Montaje con solución salina estéril o agua destilada
- secreción vaginal : levaduras y pseudohifas.

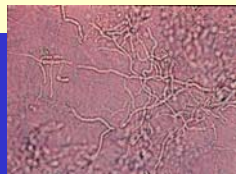
EXAMEN MICROSCOPICO DIRECTO

Método : Montaje con KOH (10-40%)

- Efecto clarificador.
- **Material queratinizado .**
- No afecta las estructuras fúngicas.

*KOH : 10-40% + **Tinta Parker** 3:1

* Glicerol- DMSO



Examen Microscópico directo

Método : Tinta china o nigrosina en solución con agua destilada (1:1o 1:2)

Detección cápsula *C. neoformans* en LCR

Tiempo : 1 min

Sensibilidad 50% no VIH
70-90% VIH

LCR

Examen microscópico directo

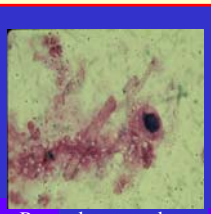
Método : Tinción de Gram

Utilidad : Detectar bacterias y hongos

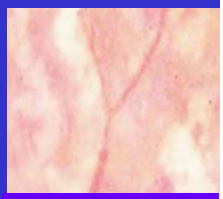
Levaduras 3 veces más grande que cocácea .Gram +
Hifas : apariencia granular.

Tiempo : 1 minuto

secreción vaginal



Raspado corneal



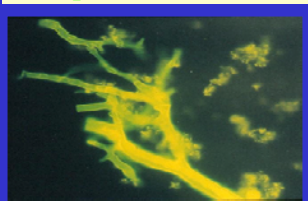
Biopsia cerebral

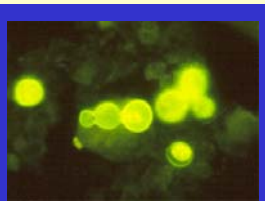
Examen microscópico directo

Método : Blanco-calcofluor

Fluorocromo se une a residuos Beta 1,3 de polisacáridos como celulosa y quitina de la pared de la célula fúngica y produce una fluorescencia amarillenta o verdosa.

Tiempo : 1 min





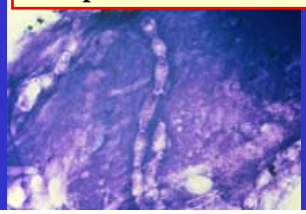
Examen Microscópico Directo

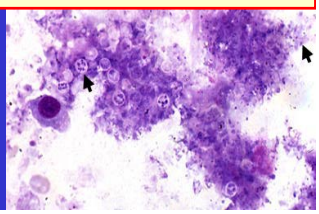
Método : Giemsa

Detección levaduras de *Histoplasma capsulatum*

Pneumocystis jirovecci

Tiempo : 13-15 min





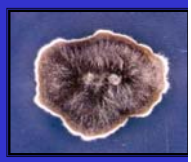
Examen Microscópico Directo

LIMITACIONES

- Baja sensibilidad
- Incapacidad de identificar el hongo a nivel de especie (en la mayoria de los casos)

CULTIVO

Método más utilizado
Diagnóstico en más de 24 hrs



Identificación de especie
Perfil de susceptibilidad antifúngica
Caracterización genotípica.

Limitación : lento
velocidad de crecimiento del hongo.
Tiempo

Medios de Cultivo (en tubos o placas)

Básico: Agar Sabouraud-Glucosa (ASG).

Selectivo: ASG + cloranfenicol (CAF) y ASG + CAF + cicloheximida.

Indicador: Agar lactrimel, Chromagar.

Cultivo : Aislamiento Primario

AGAR SABOURAUD GLUCOSADO
medio ácido- pobre : glucosa, peptona,agar.
a) Antibióticos - bacterias
Cloramfenicol,Gentamicina, Penicilina, Estreptomicina.
b) cicloheximida (actidiona) - hongos saprófitos ambientales:

Agar Sabouraud Glucosado 2%

* **Dermatophyte test medium (DTM)**: medio selectivo
Recuperación de dermatofitos- muestras muy contaminadas- cambio de color .

* **Lactritmel** : **medio casero : harina de trigo- leche-miel : buena fructificación - mejor evidencia de pigmentos.**

Agar bird-seed - agar ácido cafeico - medio selectivo *C. neoformans*

Candida ID- CHROMagar- medio selectivo- *Candida*

Cultivo : Aislamiento secundario

Agar Sabouraud dextrosa 2% : hongos filamentosos hialinos

Agar Papa dextrosa : hongos filamentosos.

Agar extracto de malta : hongos filamentosos y levaduriformes .

Agar Czapeck- Dox : especies de *Aspergillus* y *Penicillium.*

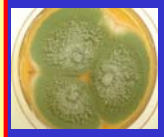
Agar Malta : hongos levaduriformes.

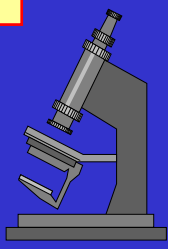
Agar extracto de malta + extracto de levadura (YM agar) ..... Levaduras

Corn Meal Agar : levaduras.

Identificación

MORFOLOGIA MACROSCOPICA y MICROSCOPICA



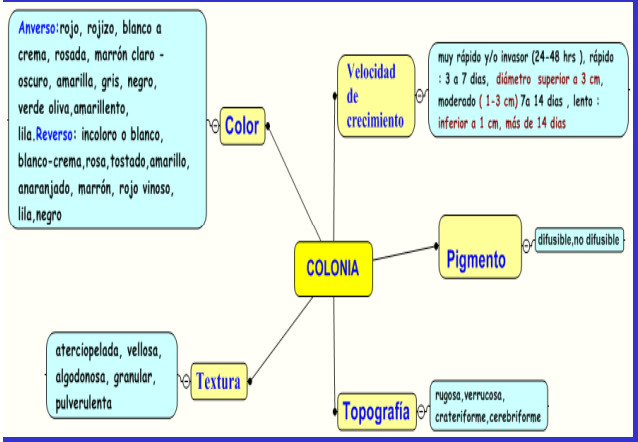


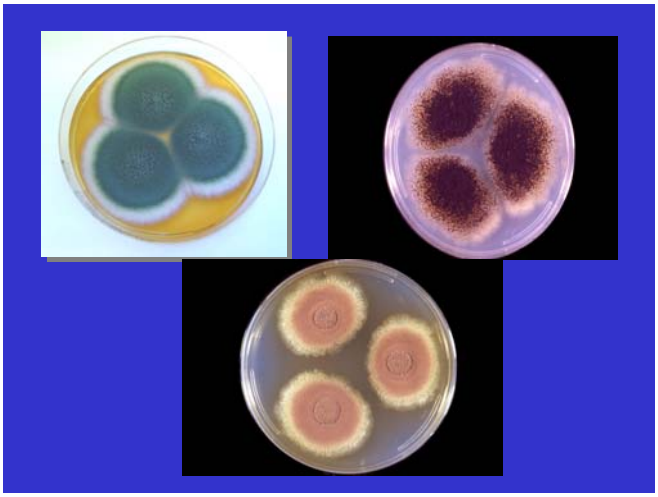
Cultivo primario : Agar Sabouraud

Subcultivo : Agar papa dextrosa, Agar malta , Agar Csapeck

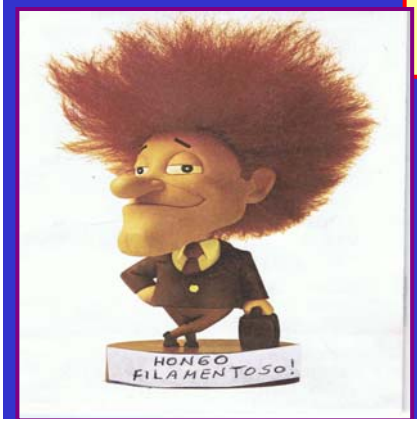
CULTIVO

Criterios de Interpretación

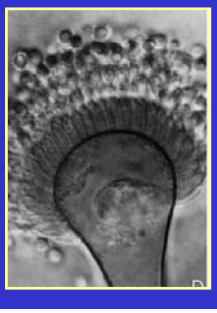


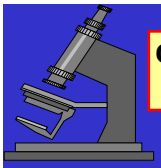


IDENTIFICACION !!!!!!!

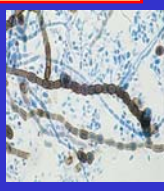


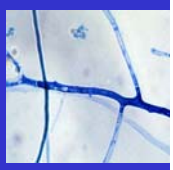
Observación Microscópica





Características micromorfológicas





Hifas:
hialinas, pigmentadas(dematiáceas),
septadas,
aseptadas(cenocíticas)

Conidios: forma, tamaño, origen
asexuados, sexuados

Otras estructuras : sinemas, esporodoquios

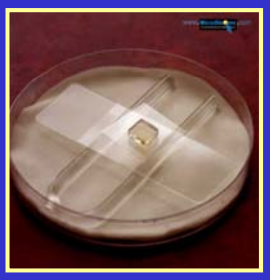
Examen Microscópico : Procedimientos

1.- **Observación a través de las paredes del tubo:** estructuras reproductivas .

2.- **Montajes directos**
Lactofenol (con o sin colorante)
azul de lactofenol

Cinta adhesiva transparente

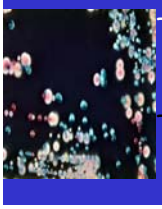
3.- **Microcultivos** o cultivos en lámina .



Colonias

Identificación de levaduras

- **Caracteristicas micromorfológicas y fisiológicas** : asimilación de azúcares y otros compuestos - 15 y 72 hrs.
- Identificación rápida por sistemas comerciales.



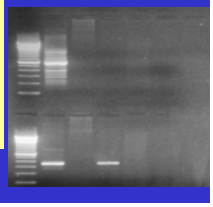
- **Medios diferenciales** : identificación por color y morfología de las colonias Ej. **medios cromogénicos** .
- **Técnicas moleculares** basadas en el análisis de la secuencia del ADN .

Candida y diagnóstico

..... pero con otros hongos la identificación puede tardar más de 1 mes

EL ESTUDIO MICOLOGICO NO CONVENCIONAL CONSTA DE:

- Estudio histológico
- Inmunodiagnóstico
- Técnicas de biología molecular



Diagnóstico morfológico de las Micosis

- No siempre es posible.
- Sección tisular muestre hifas invaginadas que aparenten septación .
- Hifas hinchadas o degeneradas, poco reconocibles.
- Estructuras que simulen conidias unidas a fiálides

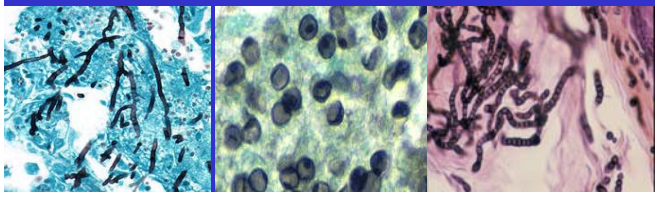
- Hematoxilina & eosina : coloración básica de la histopatología.
  Hematoxilina : coloración nuclear
  Eosina : coloración de citoplasmas.
- PAS : tiñe paredes celulares por tener alto contenido en polisacáridos .
  PAS (+) = hongos de color rosado , núcleos azules .
- Azul- Alcian : tiñe de color azul, núcleos rojos.
- Grocott : actua por precipitación selectiva de la plata sobre las paredes fúngicas , los cuales se ven de color negro.
  Mucicarmin de Mayer : color rojo púrpura , núcleos negros .

Examen Microscópico Directo

Método : Gomori Grocott-Plata metenamina-

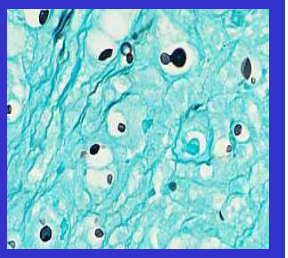
Detección hongos en tejido

Tiempo : 60 min



Examen Microscópico Directo

Mucicarmin de Meyer
cápsula de *C. neoformans.*



Diagnóstico Inmunológico

Diagnóstico inmunológico

Anticuerpos

Inmunodifusión

Antígenos

Aglutinación de látex

EIA

Diagnóstico inmunológico

aglutinación de partículas de látex

precipitación en gel de agarosa

- inmunodifusión radial ID
- inmunoelectroforesis IEF
- contrainmunoelectroforesis CIEF

Enzimoinmunoanálisis EIA

Inmunofluorescencia IF

fijación de complemento FC

Inmunoprecipitación

Interacción Ag -Ac en soporte neutro .

Difusión + precipitación

En punto de equivalencia: banda de precipitación

Inmunodifusión

Identidad= Ac específicos

Identidad parcial

Confirmar por otra técnica

No identidad

Detección de ANTICUERPOS
Micosis profundas endémicas

Histoplasma capsulatum, Paracoccidiodes brasiliensis
Coccidioides immitis

Diagnóstico de micosis endémica enfermedad.

Limitaciones

- Calidad de antígeno
- Capacidad de paciente de producir Anticuerpos
- Tiempo de evolución de enfermedad

En pacientes inmunocompetentes: E 90% S 60-70 %

Detección de Antígeno

Útil en paciente inmunocomprometidos

No necesita tiempo de inducción de respuesta inmune

Criptococcosis

Detección de Antígeno

Aglutinación de partículas de látex sensibilizadas con Ac antipolisacáridos (capsula fúngica).

Rápida(10-15 min) Sencilla

LCR, suero

S 90 % E 100 %

Detecta 3.2 - 12.5 ng/ml de Ag.

Aspergilosis

Anticuerpos — Aspergilosis pulmonar

Aspergillosis pulmonar alérgica S 50 %
Aspergiloma S 70 %

Antígeno — Aspergilosis invasora en paciente neutropénico

Aglutinación de partículas de látex
Pastorex Aspergillus Sanofi ® S 28-100 % E 16-100%

Aspergilosis

Galactomanano GM

Polisacárido de la cubierta externa de la pared celular de *Aspergillus*.

Formado por familia de moléculas de galactofuranosa.

Se libera durante el crecimiento micelial del hongo.

La determinación usada en Europa (1995) y USA(2003)

Criterio microbiológico de EORT-MSG para Aspergilosis invasora.

Galactomanano GM

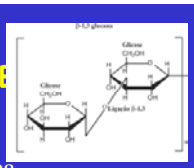
ELISA sandwich usa anticuerpos monoclonales EB-A2 que se une al epitope galactofurano de GM

Punto de corte: 0.5

Detecta 1 ng/ml.

S 80.7% E 89.2%

β-1,3-glucano



Componente de la pared celular fúngica .

Candida ,Aspergillus

Fusarium, Trichosporon, Saccharomyces y Acremonium

Cadenas de moléculas D-glucosa, ligadas por posiciones 1y 3

βDG

No detecta: y Zygomicetes (*Absidia, Mucor, Rhizopus*)

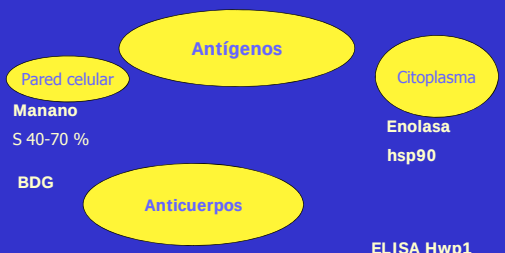
Tiempo de ejecución: 1 hora

S	47-90 %
E	77-100 %
VPP	59 %
VPN	80-100 %

FP: pacientes hemodiálisis, Sueros hemolizados, ictéricos o turbios,

Muestra clínica: 5µL de suero

Candidiasis



Manano
S 40-70 %

BDG

Enolasa

hsp90

ELISA Hwp1
S 89% E 83% VPP 80% VPN 90%

Antimicelio Candida albicans IFA IgG
S 84 % E 95%

Anti enolasa
S 81% E 84%
VPP 79 % VPN 85.5%

Detección de antígenos

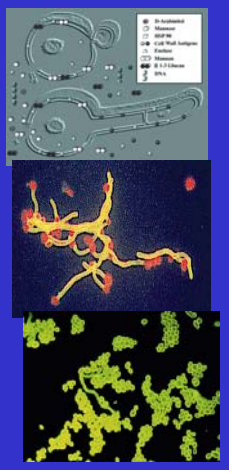
- **Manano y otros antígenos:**
  - Platelia Candida Ag (Bio-Rad, Francia)
  - Cand-Tec
  - Candigen (Enolasa) (T < 2h S 40% E 90-98%)

Detección de anticuerpos

Antimanano (Platelia Candida Ab)
(T < 2h S 53% E 94%)
Antimicelio de *Candida albicans*
Candida albicans IFA IgG (Vircell, España)
(T < 2h S 83-90% E 87-99%)

Detección de metabolitos

D-Arabinitol
D-Manosa
β 1-3 D-Glucano (Factor G): lisado de amebocitos del cangrejo de herradura (*Limulus*)
Glucatell



Mananos

ELISA
Platelia Candida antigen test®(Bio Rad)
detecta residuos de α oligomanosa

La detección de ambos epitopes de α man y β man combinadas aumenta la S y E.
Se obtuvieron en el 55% de los pacientes resultados positivos 4,7 días antes del cultivo

S:90% E: 95%
VPP: 79% VPN: 97%

D arabinitol

Metabolito producido por *Calbicans, C parapsilosis, C tropicalis* .

No es producido por *C.krusei y C.glabrata.*
(l-arabinitol producido por humanos)

Cromatografía gas-liquido o métodos enzimáticos.

No comercializado

Se puede detectar en suero y en orina.

DA/LA o DA/creatinina. VN 0.2 ug/ml suero o 10 ug/ml orina

Los niveles son mayores con candidemia

Biologia Molecular

- Detección de ácidos nucleicos

Candida

PCR : falta estandarización y distintas metodologias usadas.

SeptiFast – técnica comercial – candidemia

Aspergillus

PCR : falta estandarización, contaminación frecuente, escasa cantidad ADN .

PCR en tiempo real

Affirm VPIII : Uso de una sonda comercial detecta ADN de *Candida* en las muestras"

- **< 1 hora**
- *Candida*
  - » S 75-82%, E 96-98%
- *Gardnerella*
  - » S 75-82%, E 96-98%
- *Trichomonas*
  - » S 75-82%, E 96-98%

Desafios: MICROARRAY

Basados en la hibridación de fragmentos de ácidos nucleicos presentes en la muestra clínica con varios de miles de oligonucleótidos fijados en un soporte de vidrio.

Microchips con sondas específicas de agentes infecciosos

Pocillos Muestra

Reacción Computador

Diagnóstico directo de varios agentes simultáneamente