



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI DI BARI
ALDO MORO



LE INFEZIONI FUNGINE: UN PROBLEMA EMERGENTE DI SANITÀ PUBBLICA, DALLA EZIOLOGIA ALLA TERAPIA

SHORT MASTER

Prof. Gustavo Giusiano

Direttore Dpto. Micología - Instituto de Medicina Regional - CONICET
Microbiología e Inmunología. Facultad de Medicina
Universidad Nacional del Nordeste – Argentina
gustavogiusiano@yahoo.com.ar – gusianogustavo@gmail.com



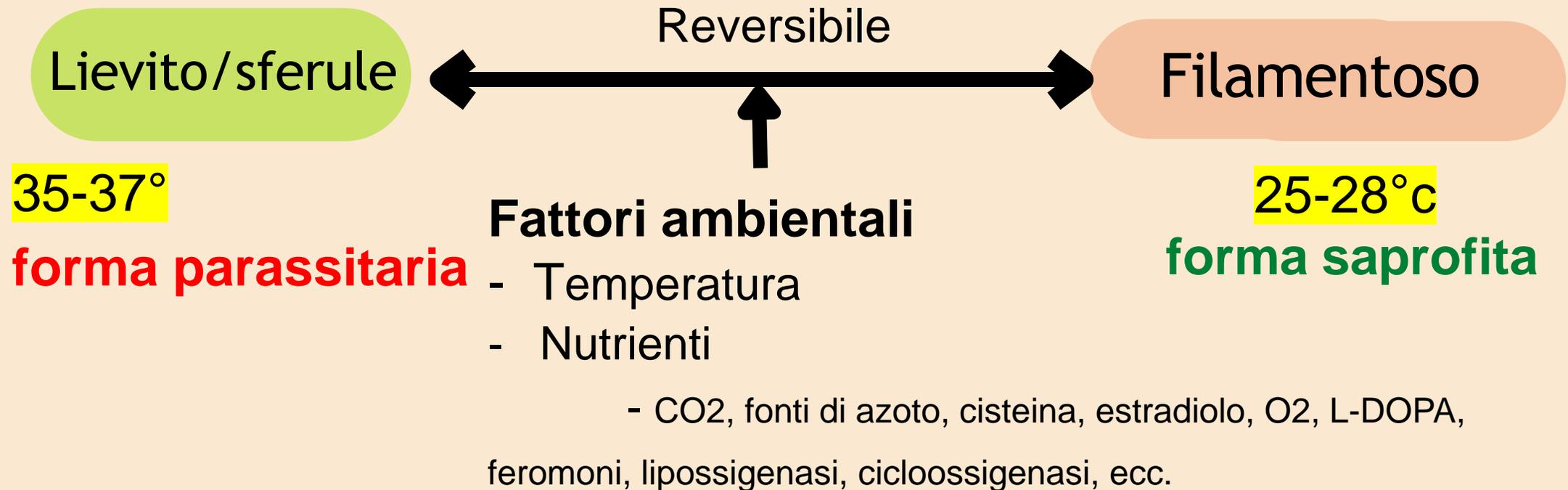
Le Micosi Primarie:
Istoplasmosi
Paracoccidioomicosi
Coccidioomicosi



Funghi dimorfi
"dimorphic switching"

Dimorfismo

Capacità di modificare la sua morfologia in base alle condizioni ambientali



Funghi dimorfi

- Dimorfi termici
- Dimorfi non termici

Il cambiamento morfologico è essenziale per la patogenesi del fungo dimorfo

Table 1. Dimorphic fungal pathogens. *

Fungus	Phylum	Disease	Major stimuli for the morphologic switch
Mammalian pathogens			
<i>Blastomyces dermatitidis</i> ^{†, ‡}	Ascomycota	Blastomycosis	Temperature
<i>Coccidioides immitis</i> [§] & <i>posadasii</i> [†]	Ascomycota	Coccidioidomycosis	Temperature
<i>Histoplasma capsulatum</i> [†]	Ascomycota	Histoplasmosis	Temperature
<i>Emmonsia</i> spp. [†]	Ascomycota	Emmonsiosis	Temperature
<i>Lacazia loboi</i> ^{†, §}	Ascomycota	Lacaziosis	Temperature
<i>Penicillium mameffeii</i> ^{†, ¶}	Ascomycota	Penicilliosis	Temperature
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i> [†] & <i>lutzi</i> [†]	Ascomycota	Paracoccidioidomycosis	Temperature
<i>Sporothrix schenckii</i> [†]	Ascomycota	Sporotrichosis	Temperature
<i>Hortaea werneckii</i>	Ascomycota	Tinea nigra	Temperature, nutrition, inoculum size
<i>Malassezia furfur</i>	Basidiomycota	Pityriasis versicolor	L-DOPA
<i>Mucor</i> spp.	Mucoromycotina [#]	Mucormycosis	O ₂ & CO ₂ tension
<i>Cokeromyces recurvatus</i>	Mucoromycotina [#]	Mucormycosis	Temperature, Nutrients, O ₂ & CO ₂ tension
Plant pathogens			
<i>Ophiostoma ulmi</i> & <i>O. novo-ulmi</i>	Ascomycota	Dutch elm disease	Nitrogen source, quorum sensing
<i>Holleya sinicauda</i>	Ascomycota	Mustard seed rot	Unknown
<i>Taphrina deformans</i>	Ascomycota	Peach & almond leaf curl	Unknown
<i>Ustilago maydis</i>	Basidiomycota	Corn smut	Pheromones, plant lipids, plant hydrophobicity, pH, nitrogen
Insect Pathogens			
<i>Beauveria bassiana</i>	Ascomycota	White muscardinePlant endophyte	Insect hemolymph
<i>Metarhizium</i> spp.	Ascomycota	Green muscardinePlant endophyte	Insect hemolymph
<i>Ophiocordyceps unilateralis</i>	Ascomycota	"Zombie ant"	Insect hemolymph

*This table includes the most common dimorphic fungal pathogens of mammals, plants, and insects; thus, it is not all-inclusive. *Saccharomyces cerevisiae*, which rarely causes human infection, is not included because it converts between yeast and pseudohyphae. Although *Cryptococcus neoformans* converts to a filamentous form during mating, is not traditionally considered dimorphic fungus. *Candida albicans* can be considered a polymorphic fungus because it grows as yeast, pseudohyphae, and hyphae.

† Thermally dimorphic fungi.

‡ Phylogenetic analysis suggests that *Blastomyces* may include two species, *B. dermatitidis* and *B. gilchristii* sp. nov.

§ Although *Lacazia loboi* cannot be grown in vitro, it is phylogenetically related to *P. brasiliensis* and other thermally dimorphic fungi.

¶ *Penicillium mameffeii* has been renamed *Talaromyces mameffeii*.

The taxonomic location of the subphylum mucoromycotina is uncertain (the zygomycota phylum is obsolete).

Funghi dimorfi
“dimorphic switching”

dimorfismo

**Considerato un importante
fattore di virulenza.**

La capacità di sviluppare
diversi tipi di crescita
favorisce **l'adattamento**
all'ospite e facilita **l'evasione**
di meccanismi difensivi come
la fagocitosi e la risposta agli
anticorpi.

Funghi dimorfi

Esempio: *Histoplasma*

Fase saprofita

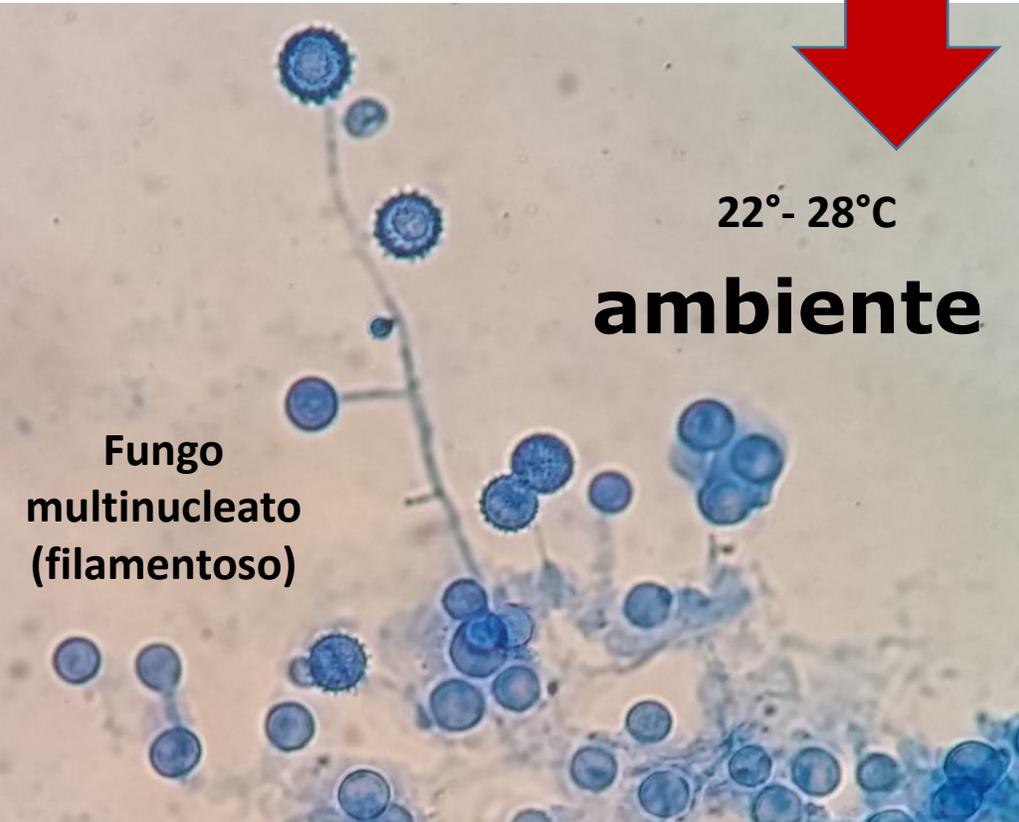
saprobio nel suolo

Resistente a pH, humidit , Temp

22°- 28°C

ambiente

Fungo
multinucleato
(filamentoso)



Fase parassitaria

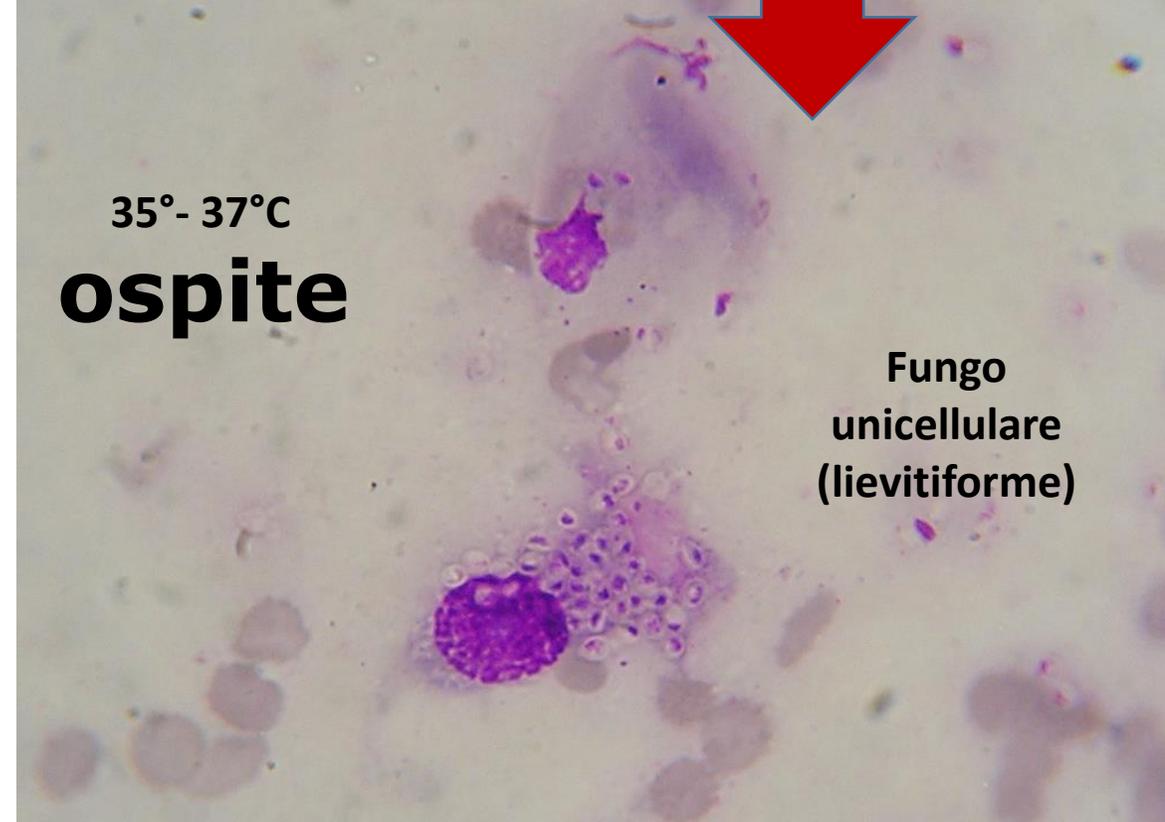
nei tessuti

Capacit  invasora

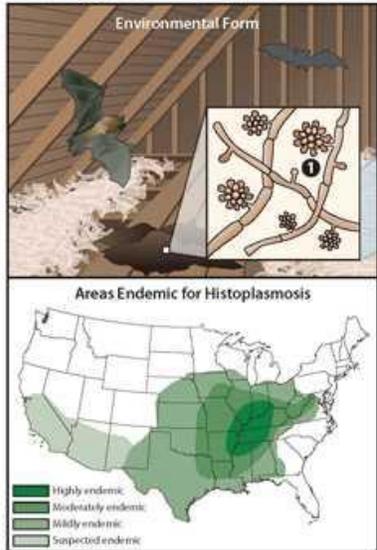
35°- 37°C

ospite

Fungo
unicellulare
(lievitiforme)



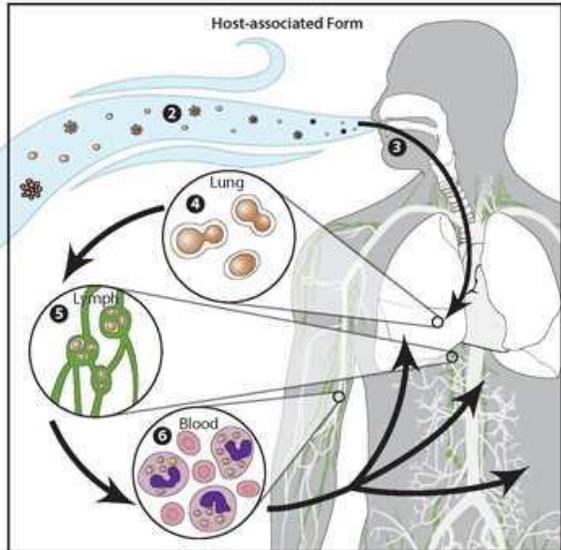
Saprofita o ciclo di vita ambientale
Biology of Histoplasmosis



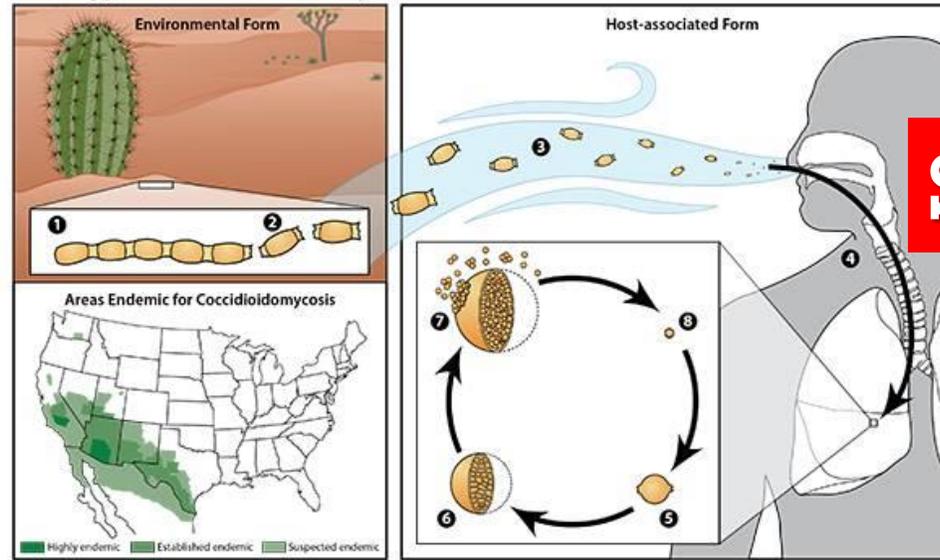
In the environment, *Histoplasma capsulatum* exists as a mold (1) with aerial hyphae. The hyphae produce macroconidia and microconidia (2) spores that are aerosolized and dispersed. Microconidia are inhaled into the lungs by a susceptible host (3). The warmer temperature inside the host signals a transformation to an oval, budding yeast (4). The yeast are phagocytized by immune cells and transported to regional lymph nodes (5). From there they travel in the blood to other parts of the body (6).



Ciclo di vita parassitario



Biology of Coccidioidomycosis



In the environment, *Coccidioides* spp. exists as a mold (1) with septate hyphae. The hyphae fragment into arthroconidia (2), which measure only 2-4 µm in diameter and are easily aerosolized when disturbed (3). Arthroconidia are inhaled by a susceptible host (4) and settle into the lungs. The new environment signals a morphologic change, and the arthroconidia become spherules (5). Spherules divide internally until they are filled with endospores (6). When a spherule ruptures (7) the endospores are released and disseminate within surrounding tissue. Endospores are then able to develop into new spherules (6) and repeat the cycle.



Sapronosi

Via di infezione

The fungus enters the lung by inhalation of conidia or hyphal fragments, which can give rise to a subclinical condition that may go asymptomatic or to an overt disease of variable intensity, depending on the age and immunological condition of the host.

Dissemination occurs via lymphatic or hematic routes



Micosi sistemiche endemiche

Paracoccidioidomicosi

Coccidioidomicosi

Istoplasmosi

Emergomicosi

Blastomicosi

Penicilliosi



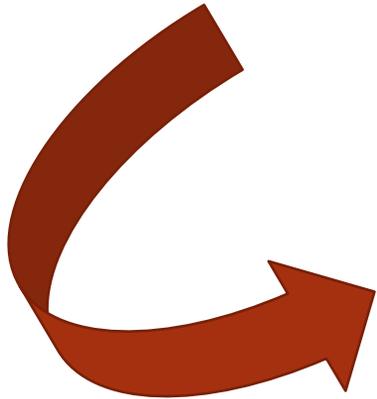
● **non contagiose**

● **prognosi infausta**

● **endemiche / enzootiche**



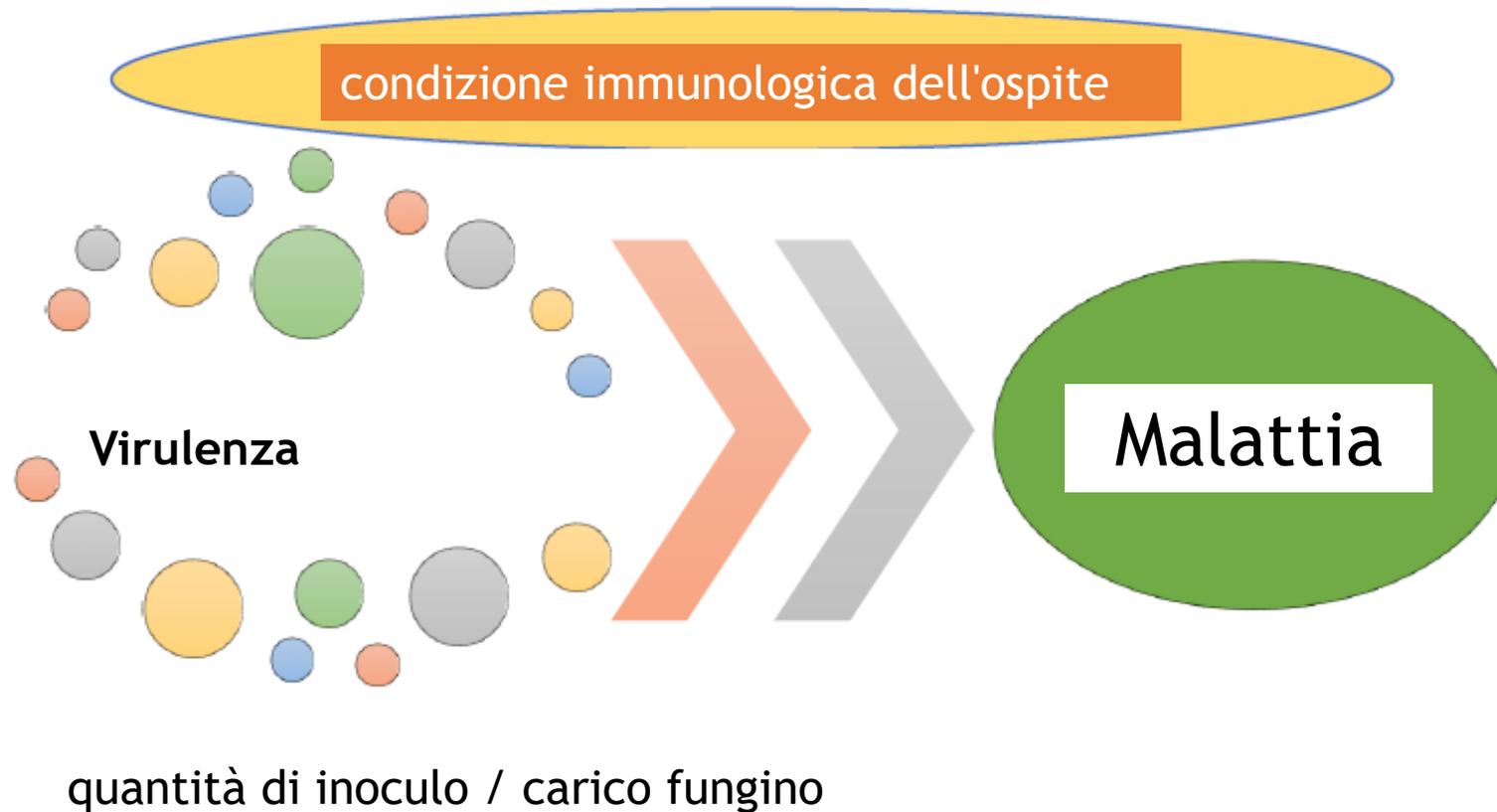
Enzootica è l'equivalente non umano di **Endemico** e significa, in senso lato, "appartenente a" o "nativo di", "caratteristico di" o "prevalente in" una particolare geografia, razza, campo, area o ambiente; nativo di un'area o di un ambito.



- suolo con determinate caratteristiche di pH, salinità, umidità.
- clima, altitudine, tipo di vegetazione, regime delle precipitazioni, ecc.



Fattori favorevoli



- Età
- Sesso
- Abitudini
- Malattia di base
- Lavoro o hobby
- Fattori genetici
- Fattori ormonali

Paracoccidioides

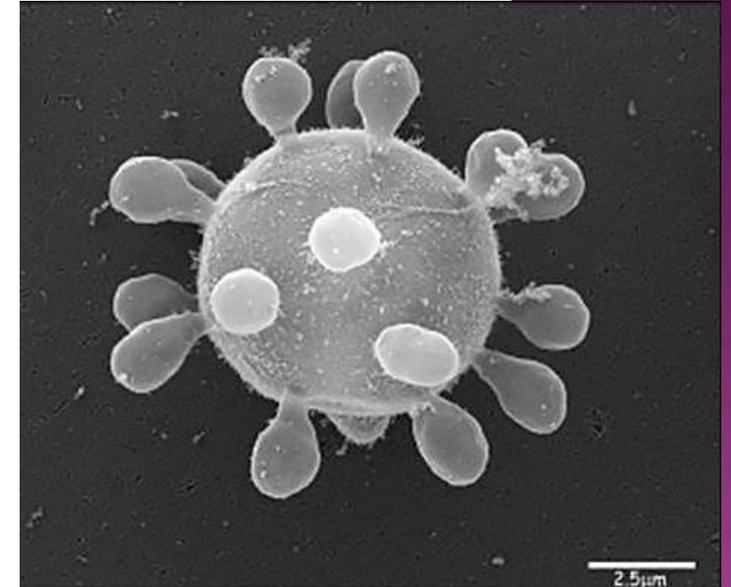
Paracoccidioides brasiliensis (S1a / S1b)

Paracoccidioides americana (PS2)

Paracoccidioides restrepiensis (PS3)

Paracoccidioides venezuelensis (PS4)

Paracoccidioides lutzii



Dal Messico meridionale, al 34° parallelo sud in Argentina e Uruguay.

Nessun caso è stato segnalato in Nicaragua, Belize, Guyana, Suriname e Cile

Massima incidenza in Brasile (80%), Colombia, Venezuela, Paraguay, Argentina, Ecuador, Perù.

Paracoccidioides

Endemico in America Latina dal Messico all'Argentina

Habitat

aree caratterizzate da un'atmosfera umida (alti indici di piovosità, presenza di foreste umide e corsi d'acqua) e stabile, mild temperatures (17 °C–24 °C)



La paracoccidioidomicosi è la principale micosi sistemica nei paesi dell'America Latina.

In Brasile è all'ottavo posto tra le cause di morte umana per malattie infettive e parassitarie.

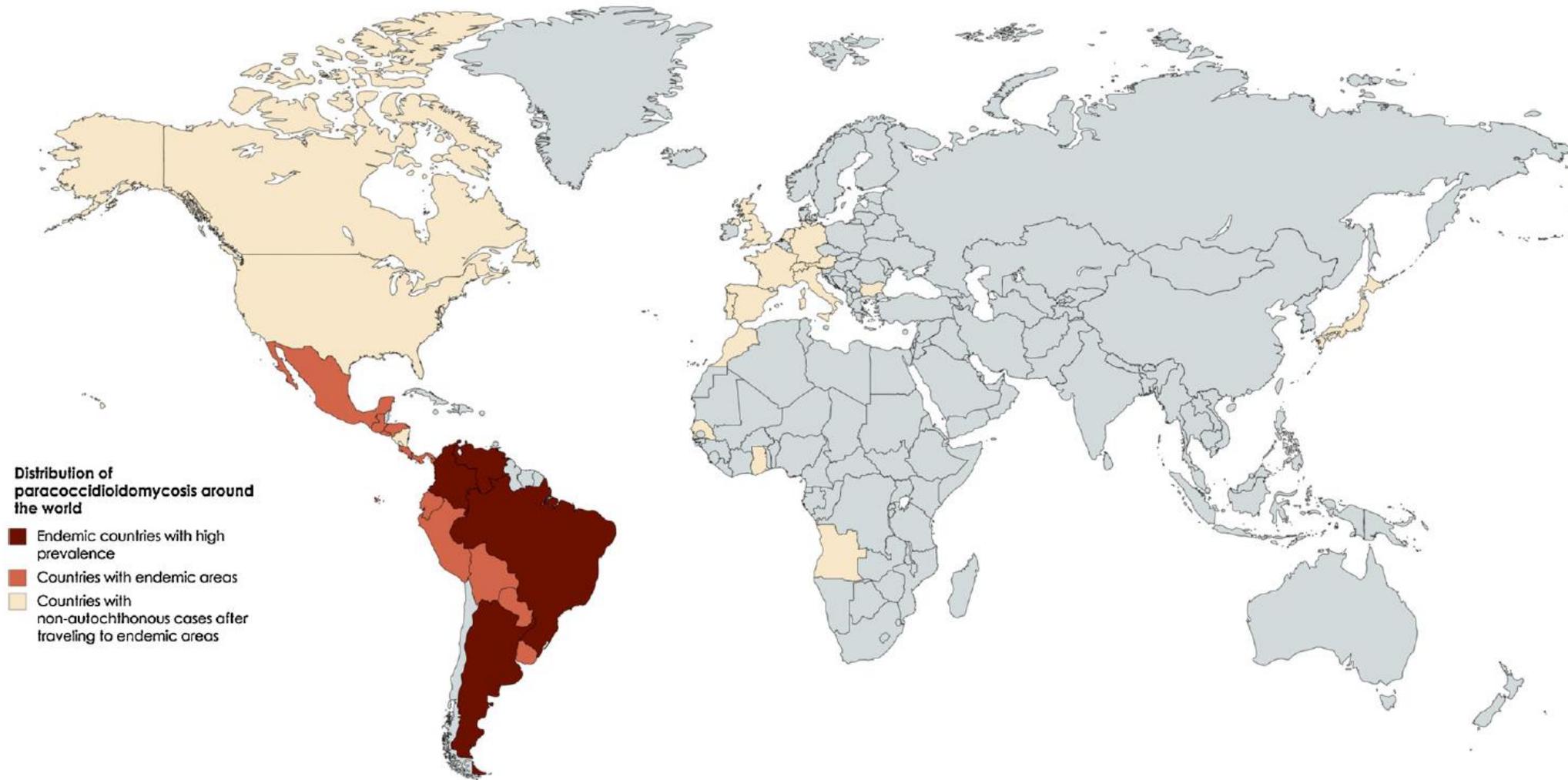
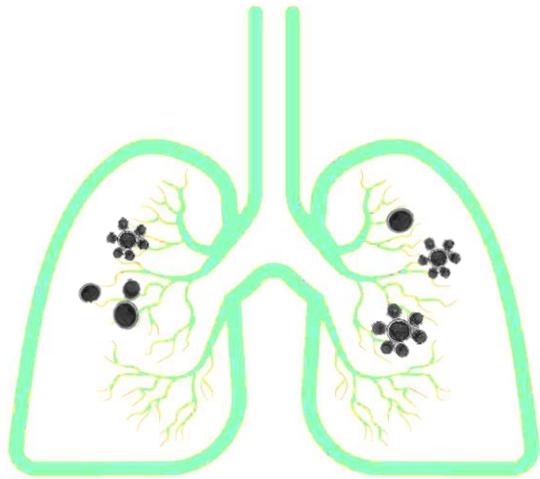


Fig. 1. Worldwide distribution of PCM.

Più di 60 casi sono stati segnalati al di fuori dell'area endemica grazie al suo lungo periodo di latenza/incubazione.

Malattia del viaggiatore

Paracoccidioidomicosi

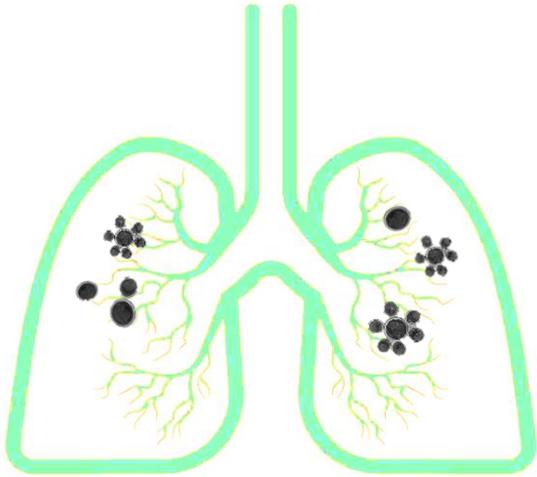


Th1 efficiente
Agent control

- **PCM Infezione:** asintomatica
 - Normal host - Infezione polmonare primaria sintomatica acuta autolimitata (benigna e transitoria) e/o complesso linfonodale polmonare primario



Paracoccidioidomicosi



- **PCM Infezione**: asintomatica
 - Normal host - Infezione polmonare primaria sintomatica acuta autolimitata (benigna e transitoria) e/o complesso linfonodale polmonare primario
-

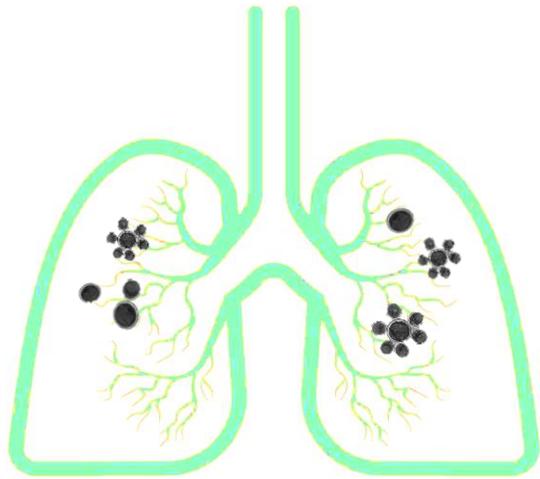
• **PCM malattia**

• **FORMA ACUTA-SUBACUTA (giovanile)**

- Meno del 10% - sotto i 30 anni
- Alti livelli di AC
- Granulomi
- Grave disseminazione – rapido sviluppo di segni e sintomi
- Compromissione multiorgano - meno compromissione polmonare

Th1 inefficace
Elevata esposizione all'agente
Th 2

Paracoccidioidomycosis



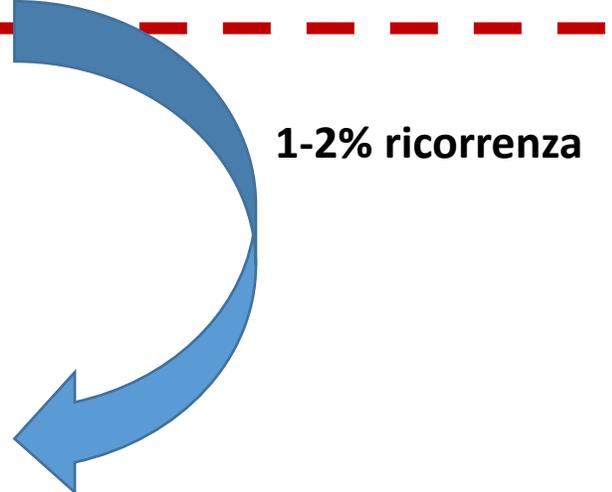
Th1 efficient

Agent control

- **PCM Infezione**: asintomatica
 - Ospite normale - Infezione polmonare primaria sintomatica acuta autolimitata (benigna e transitoria) e/o complesso linfonodale polmonare primario

- **PCM Malattia**

- **FORMA CRONICA (adulto)**
 - Oltre 30 anni
 - AC Formazione
 - Immunità cellulo-mediata attiva
 - Granulomi compatti
 - Diffusi o localizzati – Evoluzione insidiosa
 - Maggiore compromissione polmonare



1-2% ricorrenza

**L'uomo e la donna
sono ugualmente infetti**



**si verifica la malattia
più frequentemente negli
uomini che nelle donne**

Gli estrogeni inibiscono la trasformazione delle ife in lievito

Uomo:Donne = media 12:1

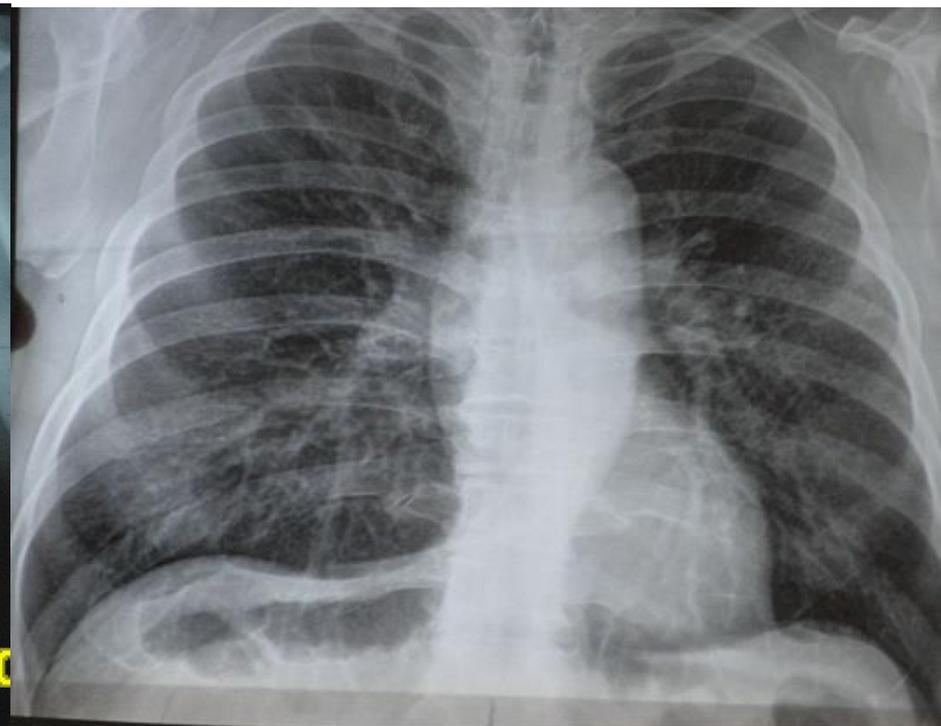
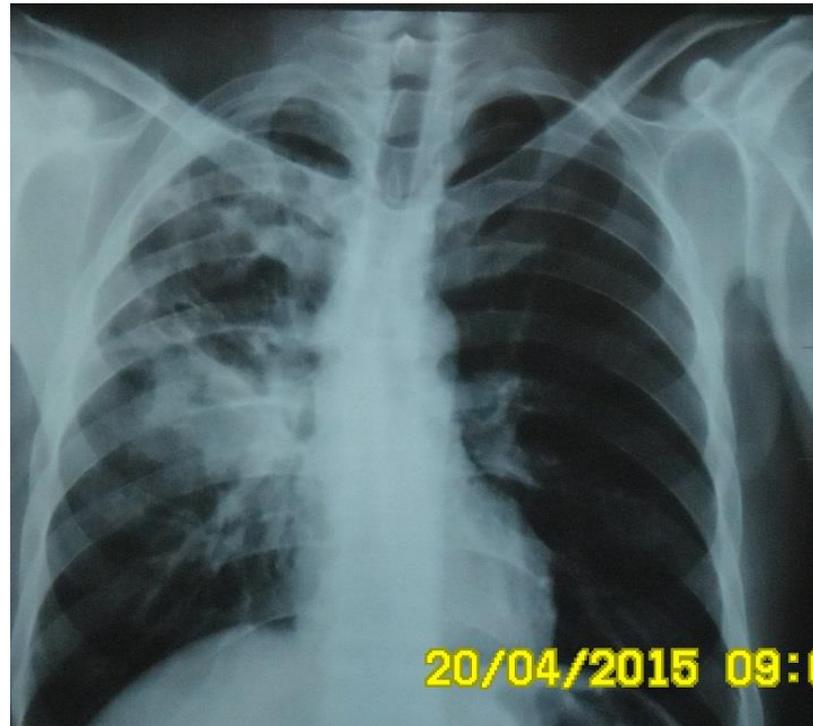
FORMA CRONICA (ADULTO)

Può riattivarsi fino a 10 - 30 anni dopo aver contratto l'infezione

- Oltre 35 anni
- Evoluzione lenta del progresso
- 90-95% delle forme progressive

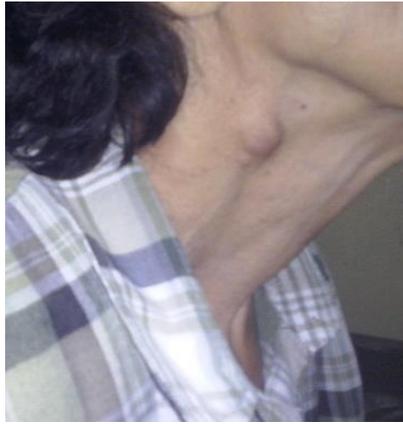
Unifocale/localizzata: con il coinvolgimento di un singolo organo o sistema, di solito i polmoni

Multifocale: con più di un organo e sistema colpito, di solito la pelle e i polmoni.



“ala di farfalla” modello

Coinvolgimento polmonare primario



Att. Yone Chacón

In tutti i casi, il coinvolgimento dei linfonodi può coesistere.

Linfoadenopatia

Può ulcerare e fistolizzare (Sembra una scrofola)



Le lesioni muco-cutanee sono presenti in più dal 50% dei pazienti

Multiple form



**Manifestazioni
extrapolmonare**

In tutti i casi, il coinvolgimento dei linfonodi, del SNC e delle ghiandole surrenali può coesistere.

Lesioni orali - Circa. **50%** di tutte le forme di presentazione

Manifestazioni cutanee - **25%**

Muco-cutanea

infiltrazione edematosa
infiammatoria delle labbra



**Lesioni ulcerative,
con microascessi e
punteggiature
emorragiche**

stomatite moriforme





Colpisce il palato e
setto nasale



Periodontal lesions

Periodontitis with loosening and spontaneous fall of teeth



Lesioni cutanee



FORMA ACUTE-SUBACUTA (GIOVANILE)

- Meno del 10% - sotto i 30 anni
- Grave disseminazione – rapido sviluppo di segni e sintomi
- Compromissione multiorgano - meno compromissione polmonare



- Coinvolgimento digestivo:
epatosplenomegalia, diarrea, ascite, ittero

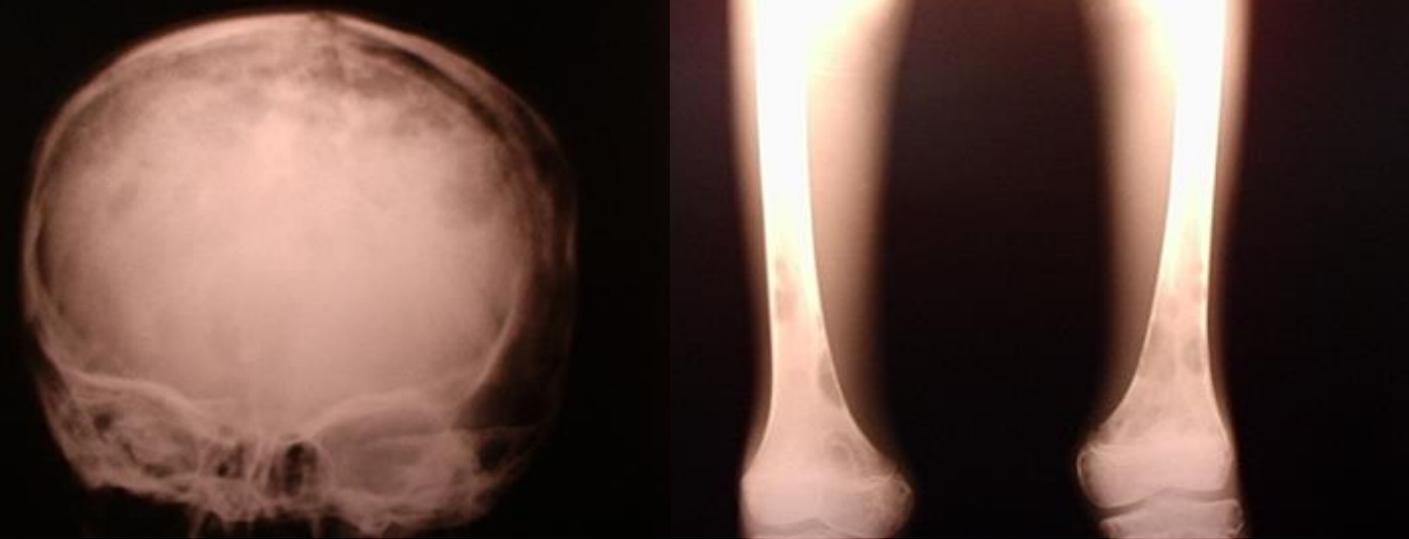


Ricoverato per una sindrome febbrile e lesioni molusco-simili



Grumi/tomori al collo, al cuoio capelluto,
alla palpebra sinistra
e destra mascellare





Casi estremi in cui la rapida evoluzione ha portato alla morte del paziente a causa di compromissione multi-organica e estrema emaciazione

Porta alla morte in meno di 4 mesi

10 anni - Area urbana

Progressi: 4 mesi

Emaciazione estrema

Adenomegalia

Linfonodi sottocutanei ascessi/fistolizzati

Frattura patologica dell'omero

Lesioni osteolitiche nelle ossa lunghe e craniche

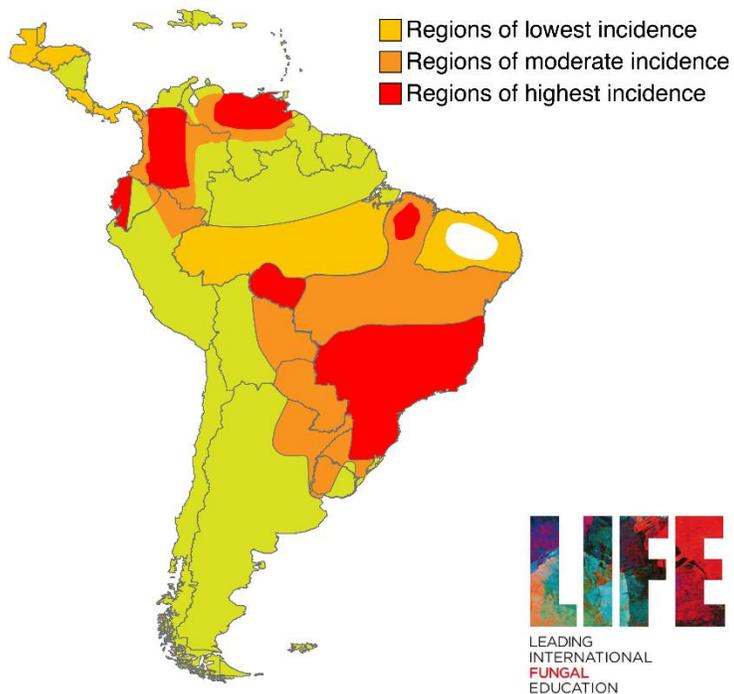
Epatosplenomegalia

Versamento pericardico

Album: 2,3 g/dl.



Paracoccidioidomycosis



Griffiths J et al. 2019. PLoS Negl Trop Dis 13(5): e0007195.

Paracoccidioidomycosis in Latin America

- Almost **10 million people infected** - Only 1-2% will be sick.
- **Infection rates** with *Paracoccidioides* spp. estimated **3 - 30%**/endemic areas inhabitants estimated by surveys with paracoccidioidin
- Clusters of acute/subacute cases have been reported
- **Incidence rates of disease:** 1-3 patients /100.000 inhabitants
Hyperendemic areas: 9-15 patients /100.000 inhabitants

Colombo Queiroz-Telles et al. Med Mycol 2011

Martínez. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 2015

Martínez. J. Fungi 2017

Giusiano et al. Curr Fungal infect Rep, 2018

Paracoccidioidomycosis in Animals

Naturally acquired Paracoccidioidomycosis has been reported in dogs, and other animals.

The disease is relatively common in humans, but poorly known in animals.
PCM disease has been reported in dogs and sloth

The first natural case reported in dogs

Medical Mycology August 2004, **42**, 379–383

 Taylor & Francis
healthsciences

Case Report

Canine paracoccidioidomycosis

G. RICCI*, F. T. MOTA†, A. WAKAMATSU‡, R. C. SERAFIM§, R. C. BORRA* & M. FRANCO*

*Department of Pathology, Federal University of São Paulo (UNIFESP-EPM), †Laboratory of Pathology, Mogi-Guaçu, ‡Adolfo Lutz Institute, and §Department of Biochemistry, Federal University of São Paulo, São Paulo, Brazil

poor general conditions, generalized lymphadenomegaly and hepatosplenomegaly



Paracoccidioidomycosis in wild monkeys from Paraná State, Brazil

**Andreia C. Corte · Walfrido K. Svoboda · Italmar T. Navarro ·
Roberta L. Freire · Luciano S. Malanski · M. M. Shiozawa · Gabriela Ludwig ·
Lucas M. Aguiar · Fernando C. Passos · Angela Maron · Zoilo P. Camargo ·
Eiko N. Itano · Mario Augusto Ono**

Paracoccidioides



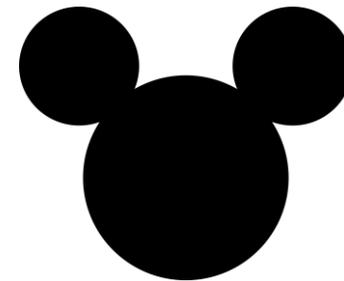
400X



10 – 40 microns



ship's rudder wheel



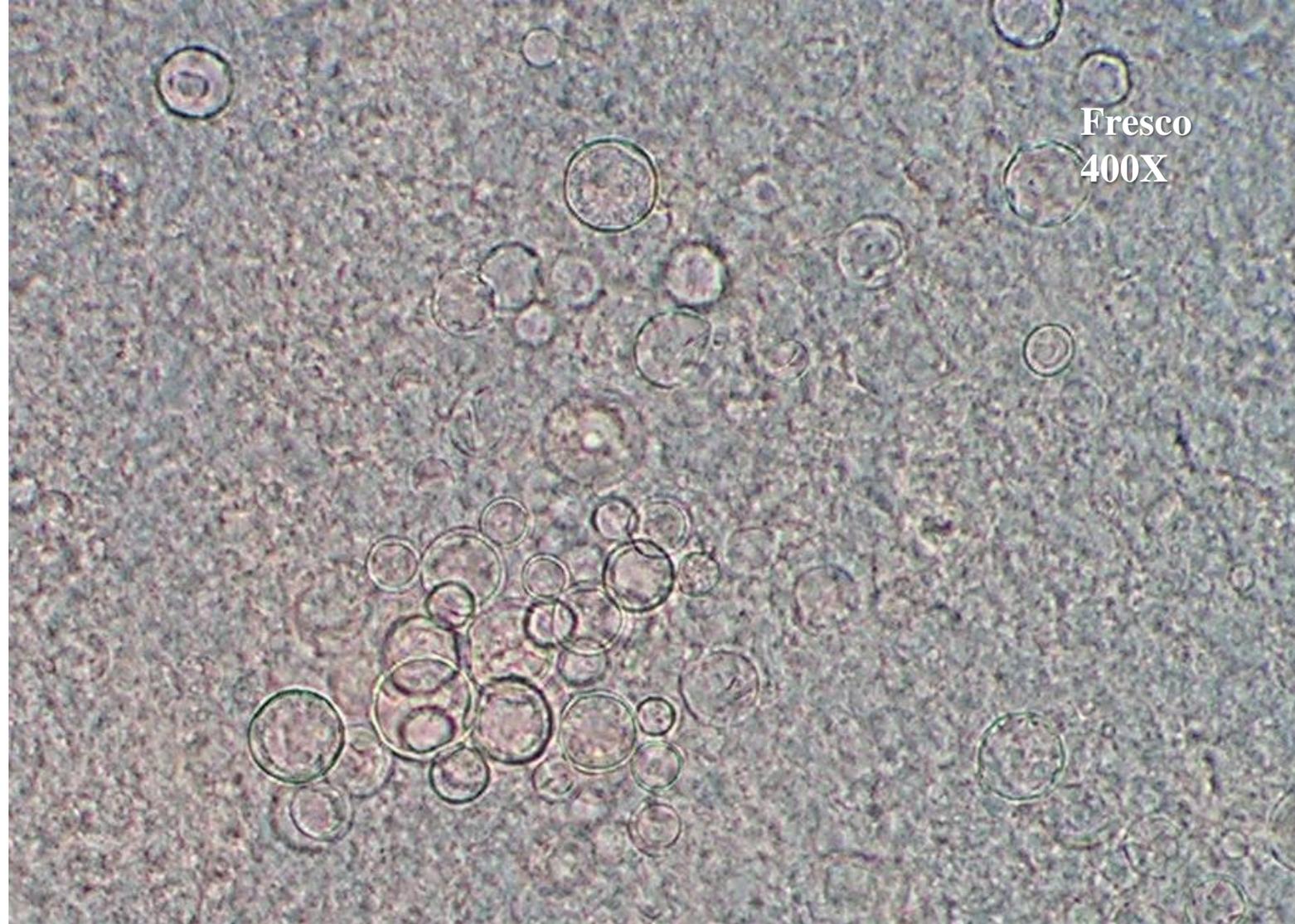
campione clinico

Esame diretto

Lattofenolo - cotton blue



10 – 40 micron



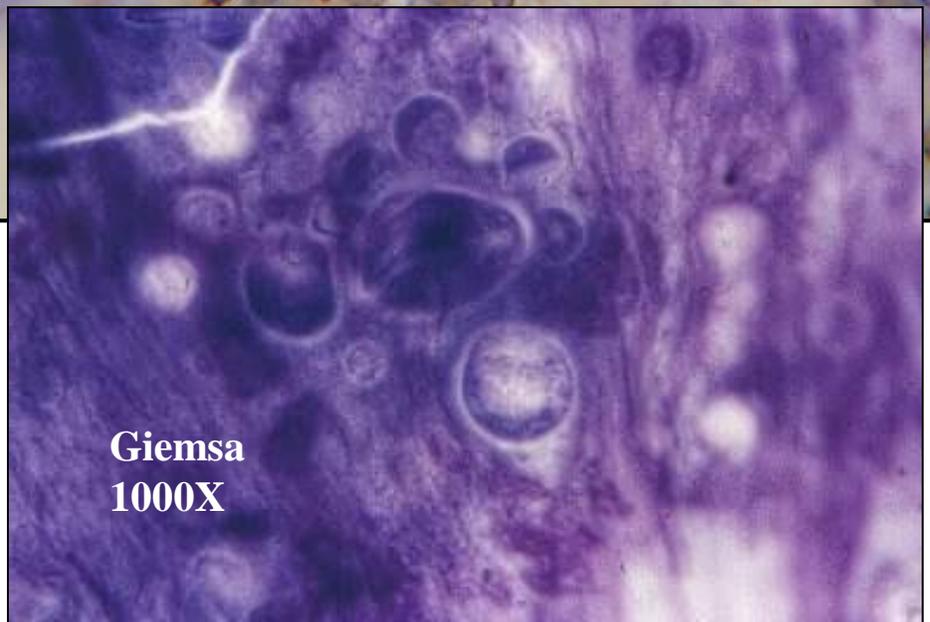
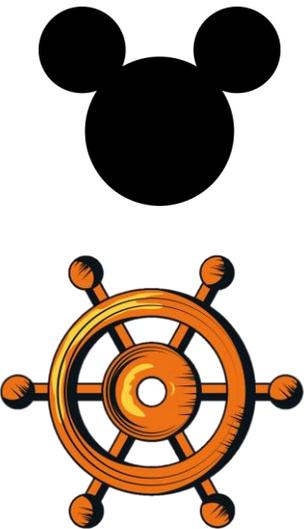
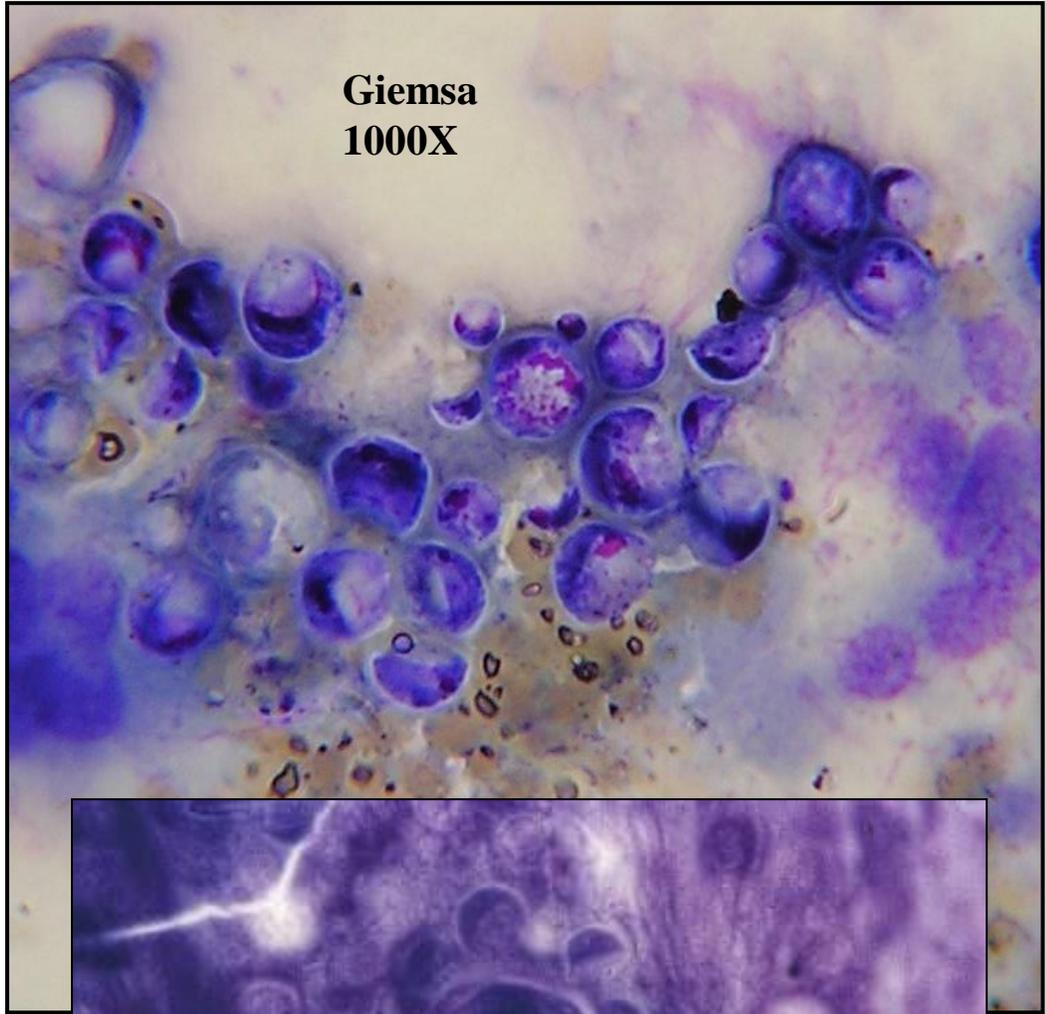
Lievito con gemme multiple

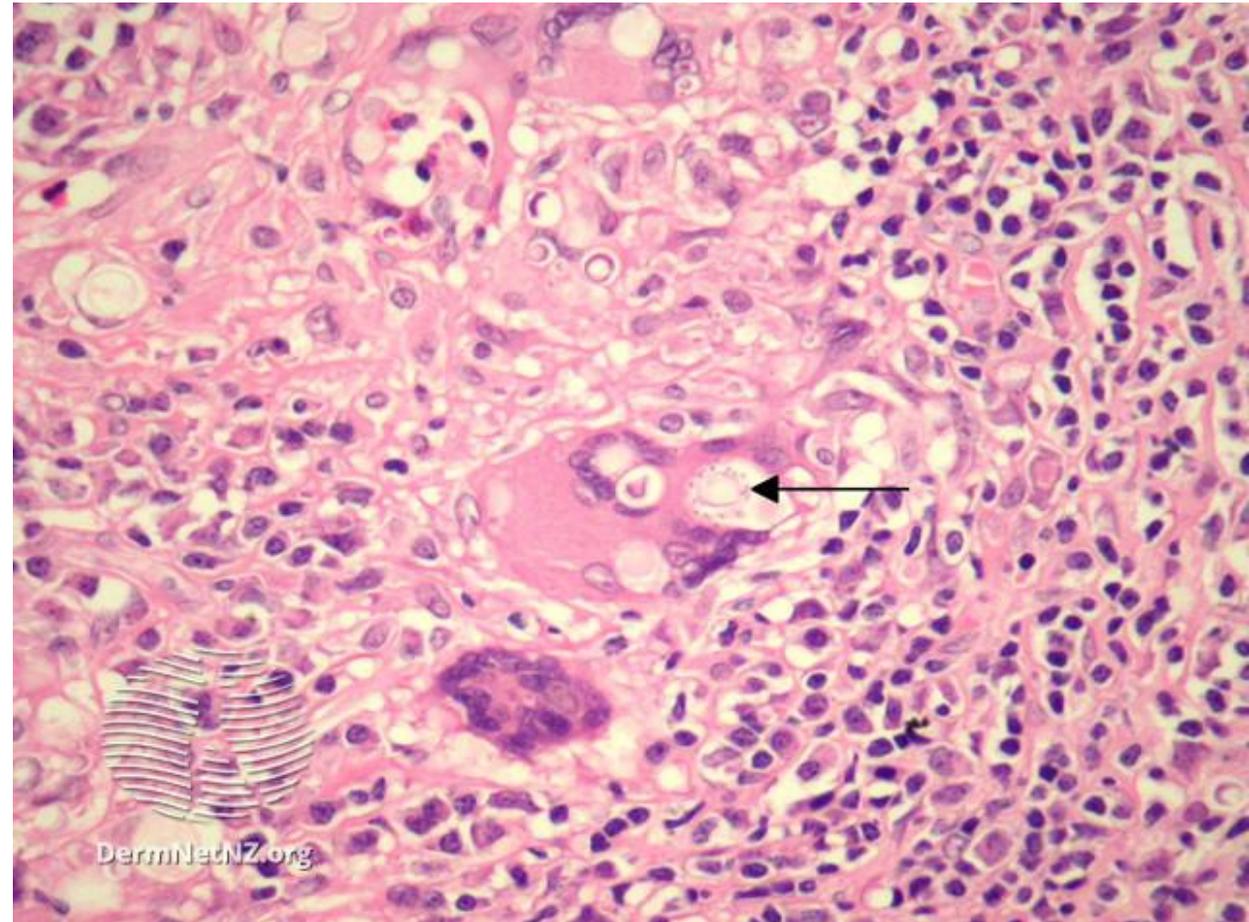
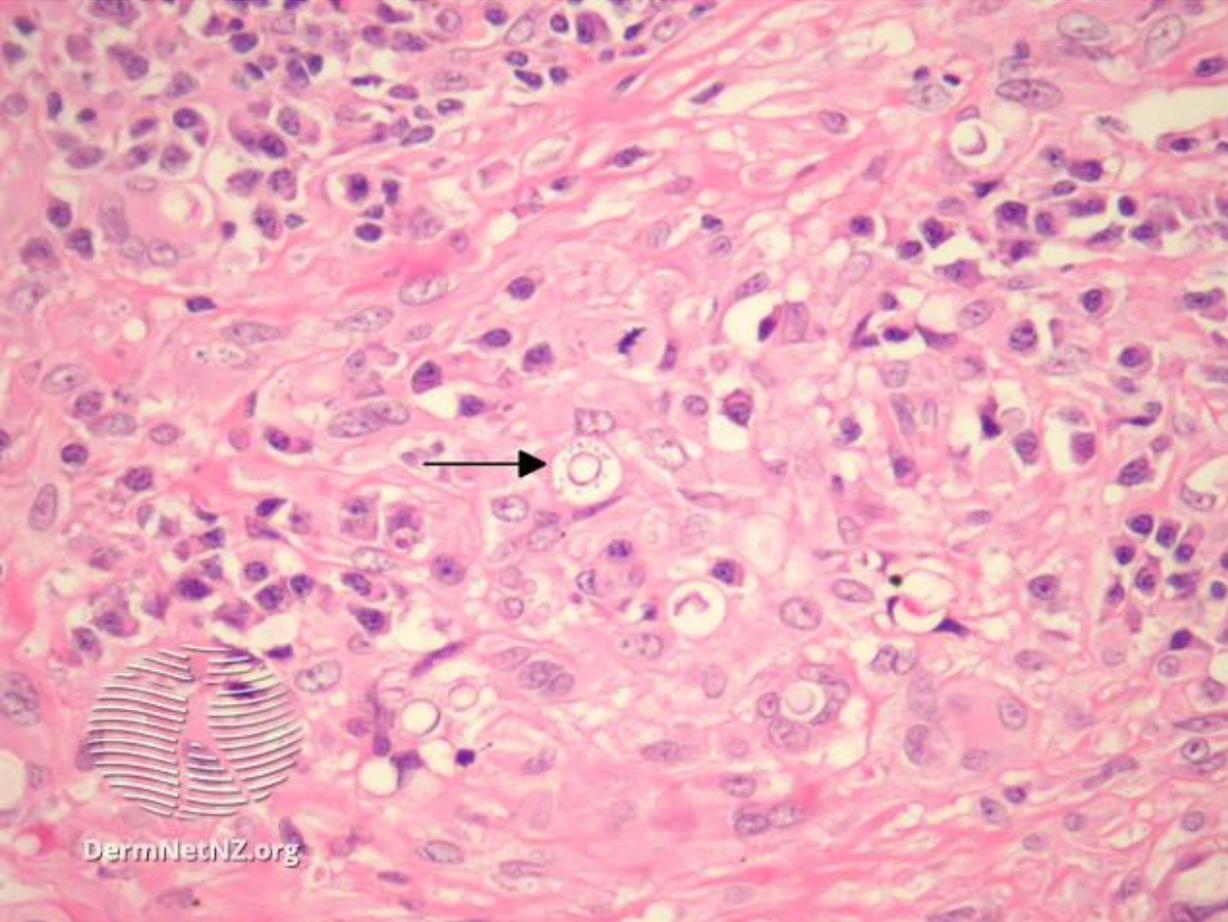
Dopia parete, spessa, rifrangente

campione clinico

Lievito con gemme multiple

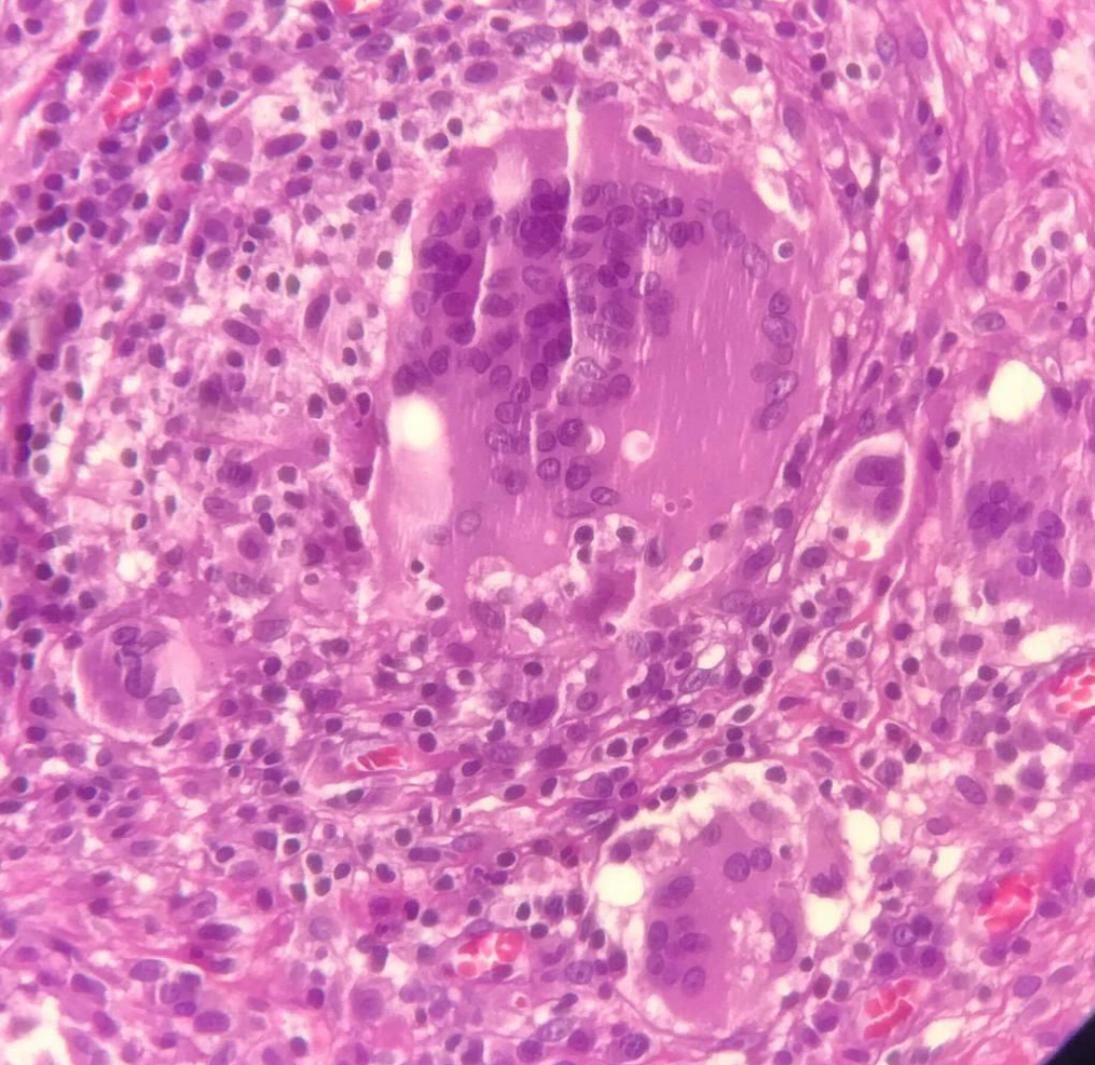
10 – 40 micron



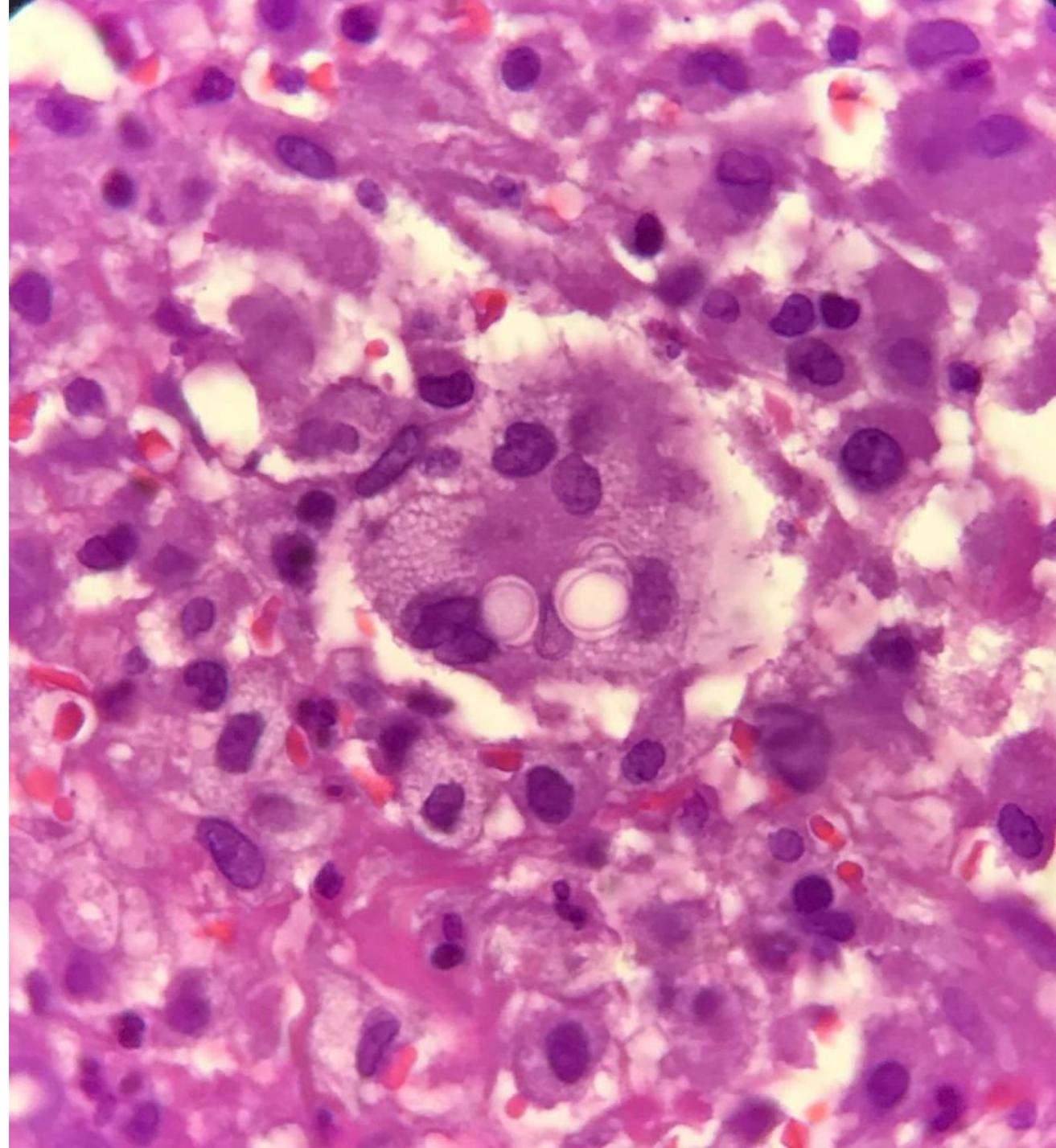


Acute inflammatory and granulomatous reaction pattern.
Granulomas may be surrounded by a dense fibroplasia. Even at low power, numerous fungi can be seen within giant cells and surrounded by inflammation.
Numerous eosinophils is pattern of a Th2 response





H&E: Giant cell containing fungal spores with multiple internal peripheral budding.



Coltivazione

Sempre con antibiotici !!!

cloramfenicolo, gentamicina,
penicillina, streptomina.



• Sabouraud

Da 2 a 3 tubi

Terreno acido-povero: glucosio, peptone, agar-agar.



• Brain Heart Infusion (BHI)

Da 2 a 3 tubi



• Terreni selettivi:

- Mycosel (BBL, Becton Dickinson)
- Mycobiotic (Thermo Fisher Scientific, etc.)

Da 2 a 3 tubi

Cicloheximide

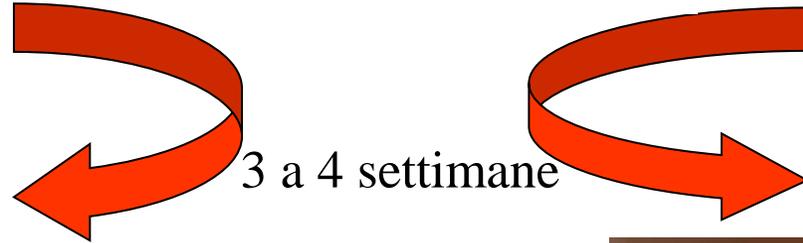


Inibisce specie di *Cryptococcus*, *Scopulariopsis*, *Fusarium*,
Trichosporon, *Aspergillus*, *Mucorales*

T° : 25-28°C

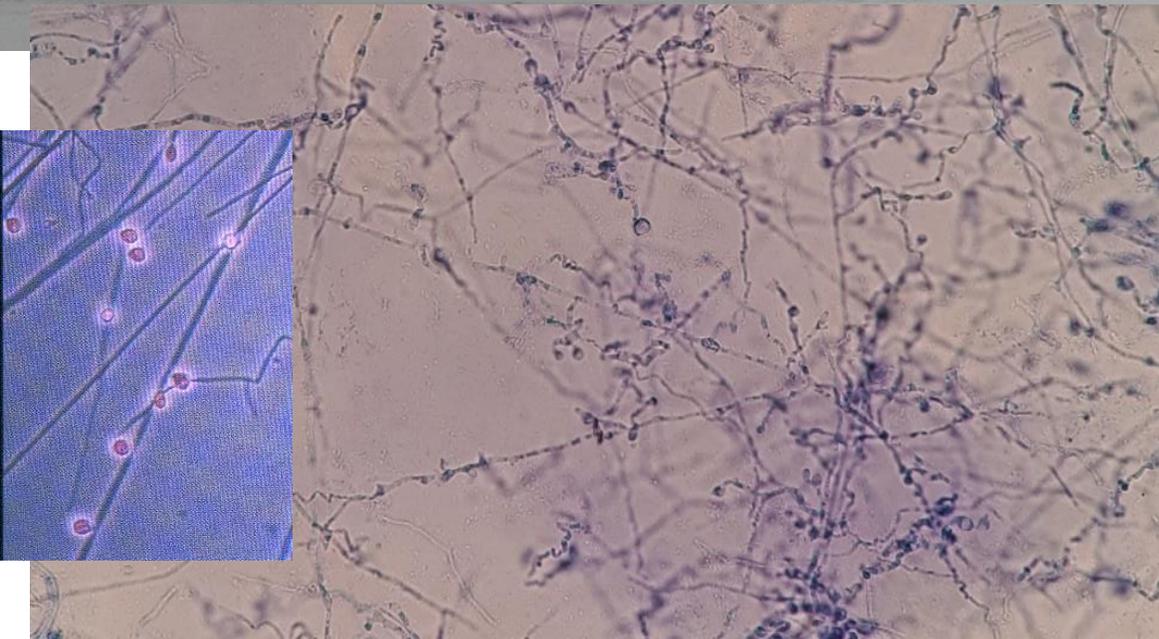
TERMODIMORFICO

T°: 35-37°C



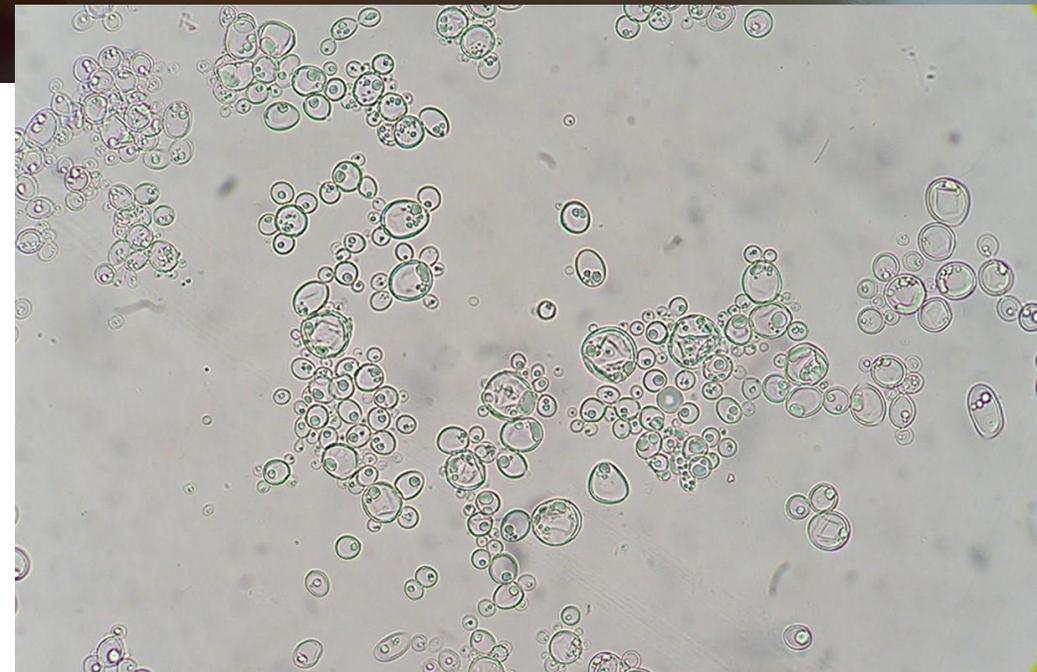
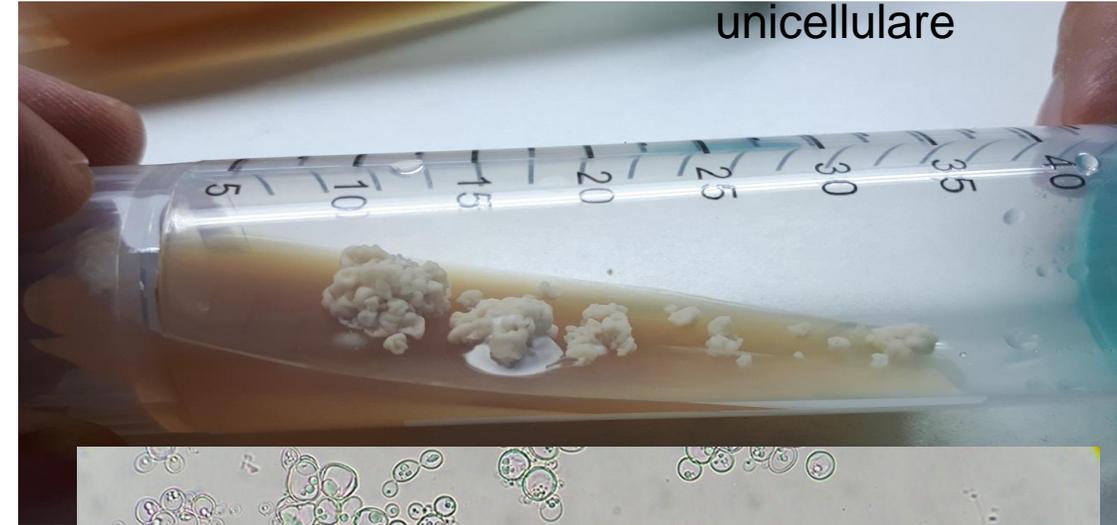
**Fase filamentosa
(saprofita)**

pluricellulare



**Fase di lievito
(parassitaria)**

unicellulare





Genomic diversity of the human pathogen *Paracoccidioides* across the South American continent

Marcus de Melo Teixeira^{a,b,*}, Maria Emilia Cattana^{a,d,1}, Daniel R. Matute^e, José F. Muñoz^f, Alicia Arechavala^g, Kristin Isbell^e, Rafael Schipper^b, Gabriela Santiso^g, Fernanda Tracogna^d, María de los Ángeles Sosa^h, Norma Cechⁱ, Primavera Alvarado^j, Laura Barreto^k, Yone Chacón^l, Juana Ortellado^m, Cleoni Mendes de Limaⁿ, Marilene Rodrigues Chang^o, Gustavo Niño-Vega^p, Maria Aparecida Shikanai Yasuda^q, Maria Sueli Soares Felipe^r, Ricardo Negroni^g, Christina A. Cuomo^f, Bridget Barker^{a,2}, Gustavo Giusiano^{c,*,2}

^a Northern Arizona University, Flagstaff, AZ, USA

^b Universidade de Brasília, Brasília, Brazil

^c Universidad Nacional del Nordeste, Resistencia, Chaco, Argentina

^d Hospital Dr. Julio C. Perrando, Resistencia, Chaco, Argentina

^e Biology Department, University of North Carolina, Chapel Hill, NC, USA

^f Broad Institute of MIT and Harvard, Cambridge, USA

^g Hospital Muñiz, Buenos Aires, Argentina

^h Laboratorio Central De Redes y Programas, Corrientes, Argentina

ⁱ Hospital 4 de Junio, Chaco, Argentina

^j Servicio Autónomo Instituto de Biomedicina Dr. Jacinto Convit, Caracas, Venezuela

^k Instituto Superior de Formación Docente Salome Ureña, Santo Domingo, Dominican Republic

^l Hospital Señor del Milagro, Salta, Argentina

^m Universidad Nacional de Asunción, Asunción, Paraguay

ⁿ Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho, Rondônia, Brazil

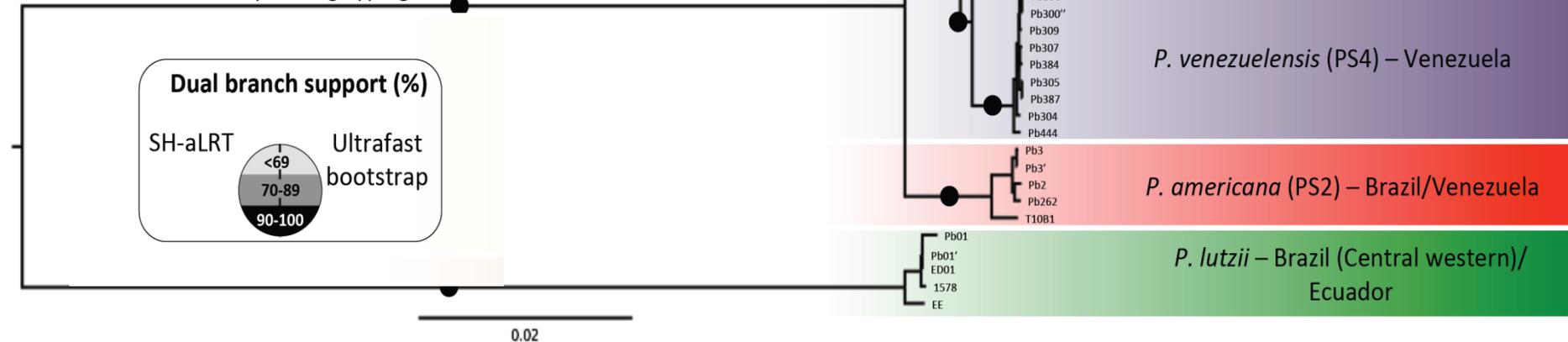
^o Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil

^p Universidad de Guanajuato, Guanajuato, Mexico

^q Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

^r Universidade Católica de Brasília, Brasília, Distrito Federal, Brazil

Maximum Likelihood tree generated by Whole Genome Sequencing Typing



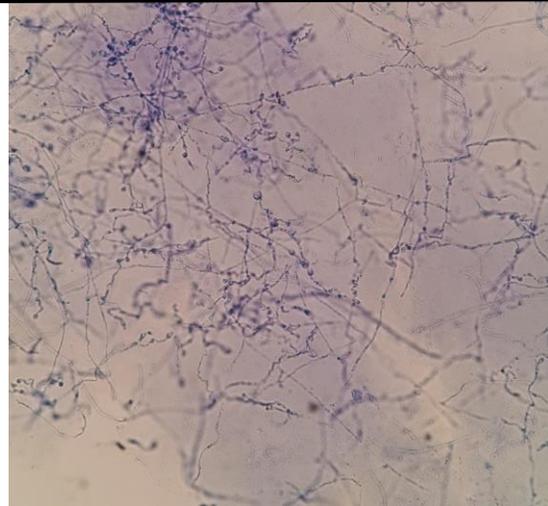
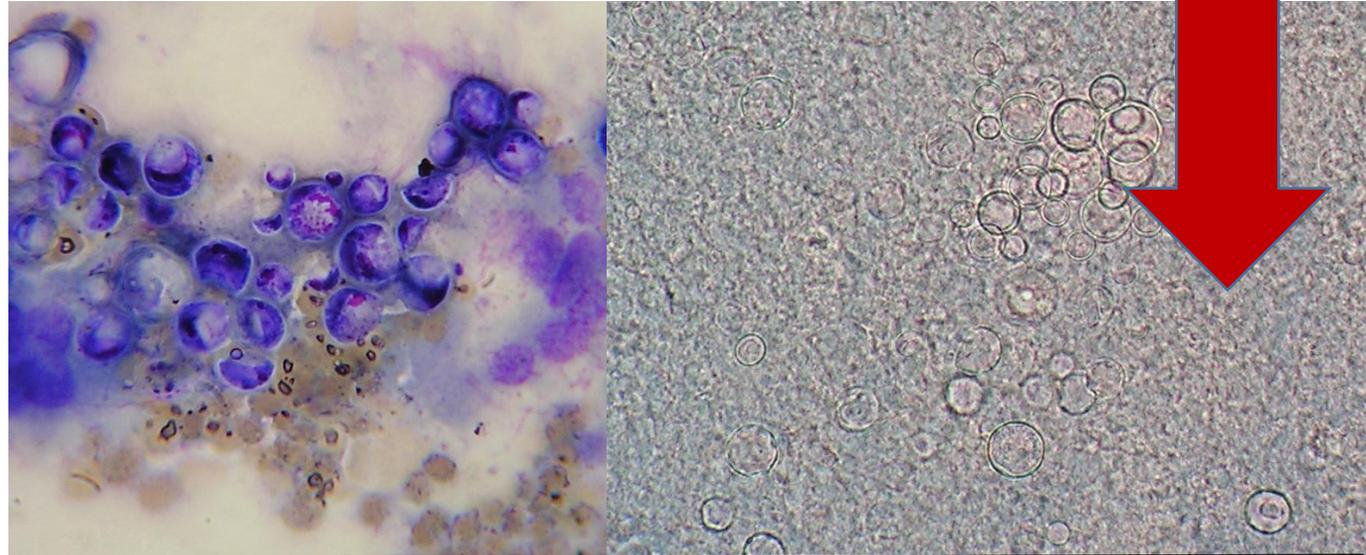
Paracoccidioides – fungo dimorfo

Fase saprofita T° : 25-28°C

T°: 35-37°C **Fase parassitaria**

ambiente

campione clinico



coltura



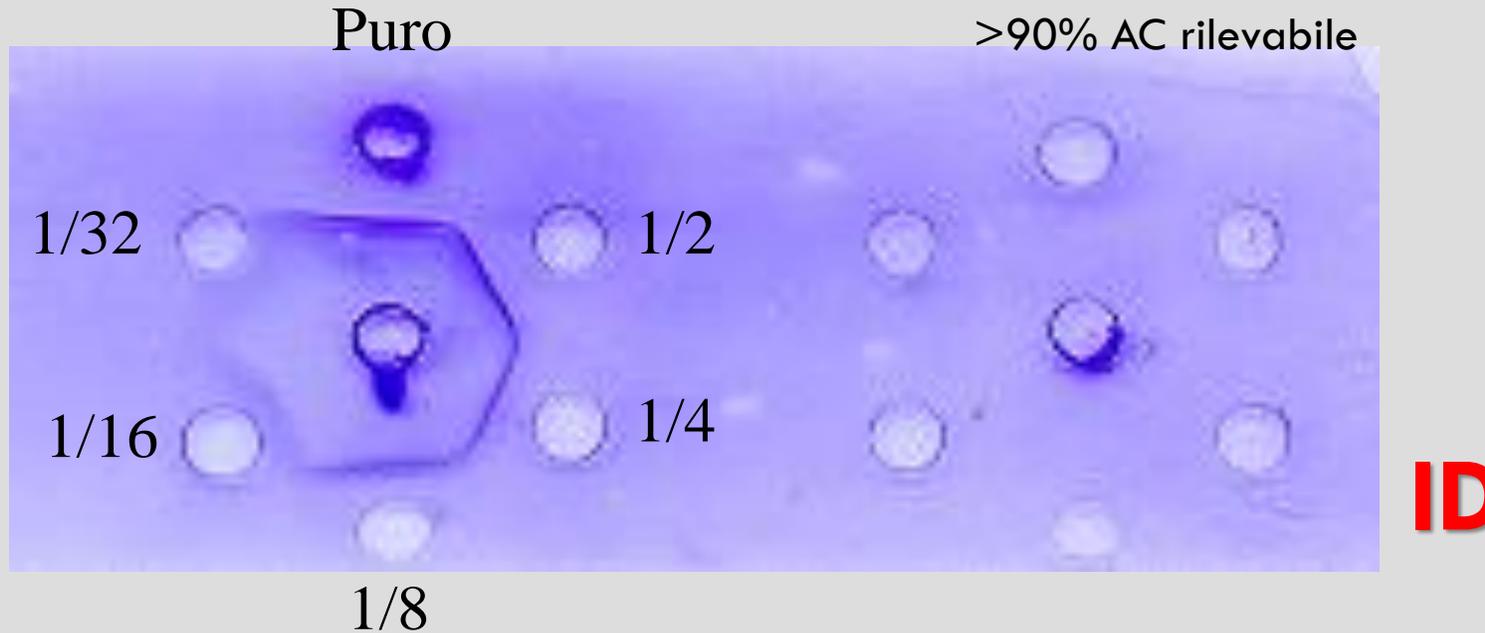
Diagnosi sierologica

Metabolico antigeni
(GP 43 KDa y 70 kDa)

- **ID, CIEF, FC, ELISA, Immunoblot.**

ID alta specificità e sensibilità

>90% AC rilevabile

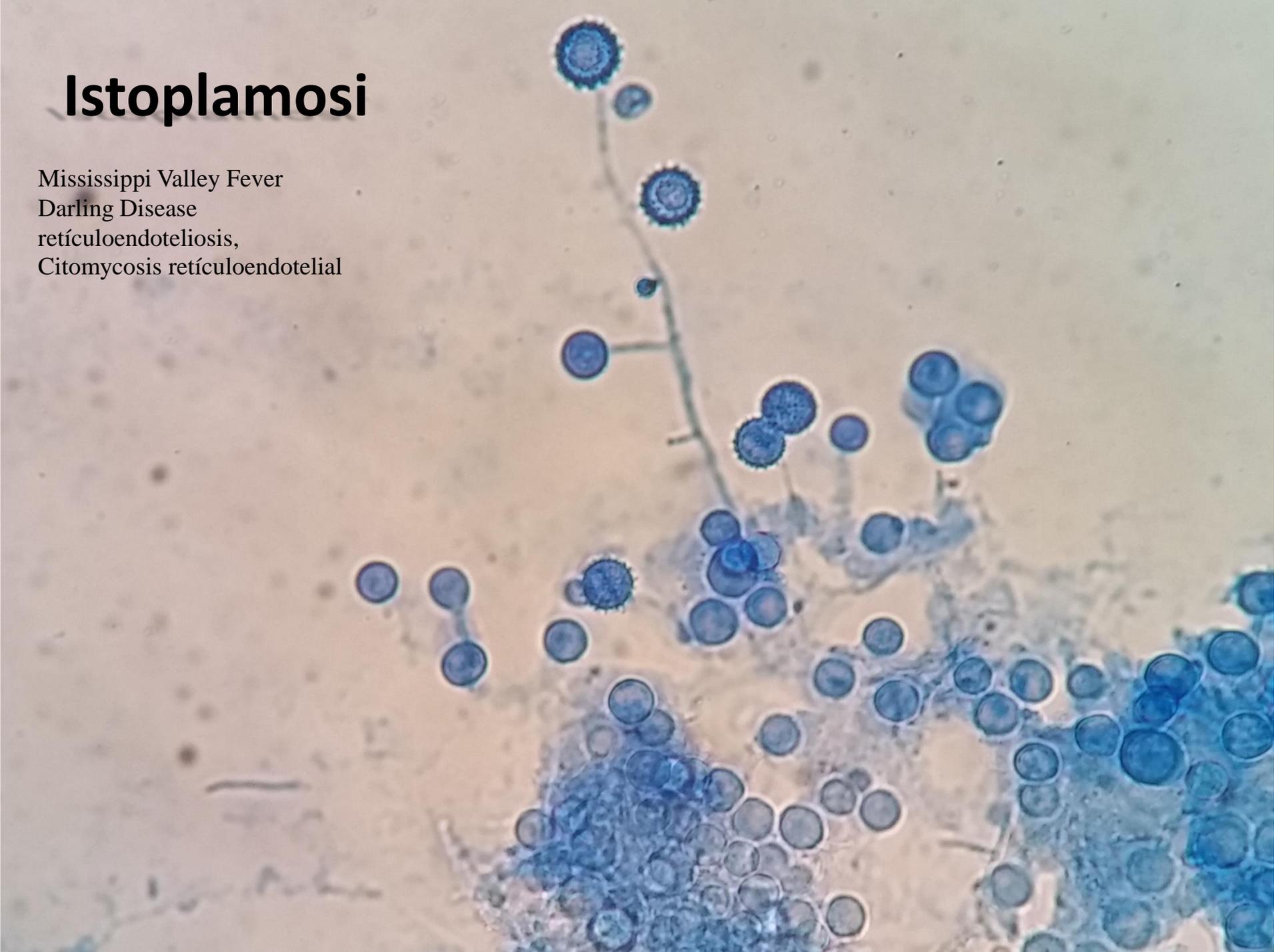


consente il monitoraggio e la valutazione del trattamento

Trattamento fino a quando negativo

Istoplamosi

Mississippi Valley Fever
Darling Disease
retículoendoteliosis,
Citomycosis retículoendotelial



Istoplasmosi capsulatum

Istoplasmosi: agenti eziologici

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

Istoplasmosi americana o istoplasmosi capsulati.

Distribuzione globale che causa infezioni polmonari e sistemiche in una varietà di mammiferi, compresi gli esseri umani - responsabili dell'istoplasmosi classica

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

Istoplasmosi africana duboisii istoplasmosi

Confinato in Africa centrale e occidentale – causa linfadenopatia e diffusione alla pelle e alle ossa, principalmente negli esseri umani e in altri primati

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

Agente di linfangite epizootica di cavalli in varie parti del mondo

Colpisce la pelle e il sistema linfatico sottocutaneo negli equidi (cavalli, asini e muli) ma è stato recuperato anche da esseri umani, cani, gatti e tassi.

Nicchia ecologica: *Sviluppo della fase miceliale (saprofita)*

- Fonti di infezione: Favorito il suo sviluppo in terreni ad alto contenuto di azoto e fosfati

Suoli contaminati da escrementi di pipistrelli e/o uccelli, alberi, concimi



Correlati a - pipistrelli - pollai
spesso isolati da caverne, grotte, miniere, tunnel, pollai e case abbandonate

Focolai microepidemici

T° 22 a 29°C

Precipitazione annuale 800 -1200 mm

Umidità 67-87%

AEROSOLizzazione

Dove si trova Histoplasma??



**Ambienti a rischio
di infezione**



AEROSOLizzazione

Dove si trova Histoplasma??



Demolizione e trasporto di detriti



Abbattimento di alberi



Rimozione del suolo



Uso di fertilizzanti organici

Ci sono segnalazioni di isolamento in spazi aperti nelle aree urbane dove l'agente patogeno si riprende dalle feci degli uccelli nei parchi pubblici e dalle feci dei pipistrelli nelle unità abitative.



Endemico in America e Africa

Aree iperendemiche nelle Americhe (compresi i Caraibi) e Sud-est asiatico

L'istoplasmosi è un'infezione fungina con un'ampia distribuzione geografica,
più di 60 paesi / maggiore incidenza in America.

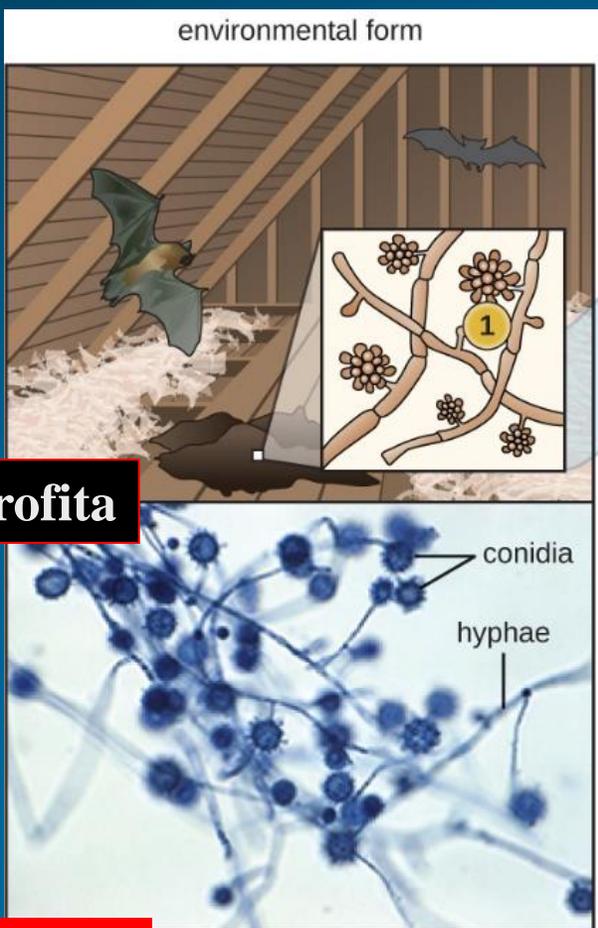
Via di infezione

inalazione di microconidi o frammenti miceliali

Fagocitosi da macrofagi: alveolite
Trasformazione in lievito

25°C

Forma saprofitica

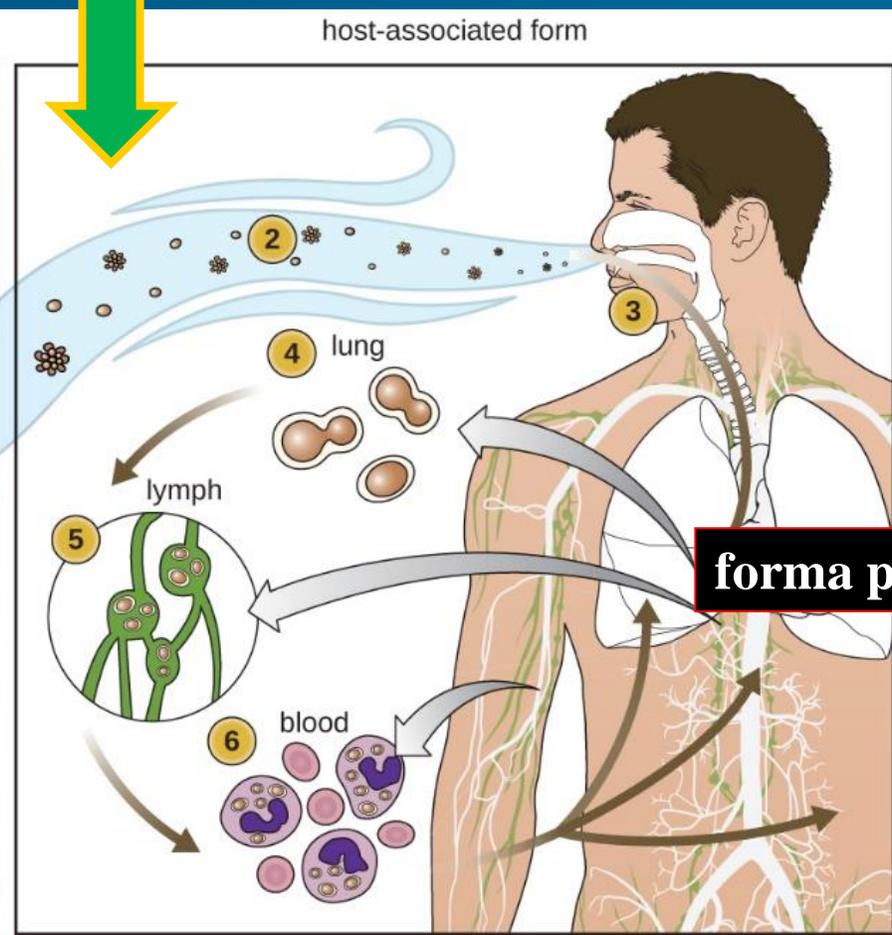


37°C



disseminazione ematica
infezioni polmonari e sistemiche
RES: Milza, midollo osseo, fegato e ghiandole surrenali

forma parassitaria



Sapronosi

Lieviti intracellulari nei macrofagi
Risposta immunitaria cellulare
Granuloma
Calcificazione

Istoplasmosi



ENVIRONMENTAL EXPOSURE

Low

High (frequently reported in outbreaks)

• Patient HIV

- Higher in patients with CD4 < 150 cel/mm³

• Patient NO HIV

- Oncohematological
- transplanted (> SOT)
- Treatment with corticosteroids or immunomodulators

Chronic disseminated histoplasmosis
Subacute disseminated histoplasmosis
Acute disseminated histoplasmosis

Host **WITHOUT** risk factors

immunoCOMPETENT

Host **WITH** risk factors

immunoSUPPRESSED

Forma cronica disseminata

Lesioni cutanee-mucose

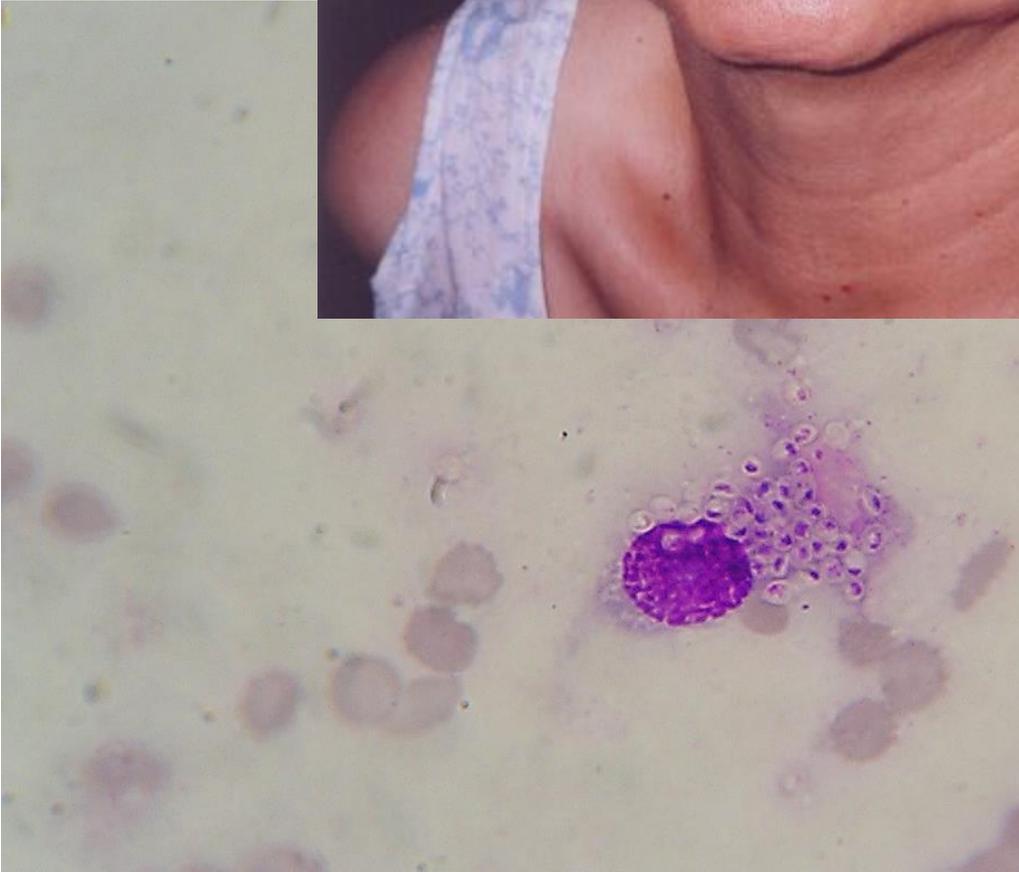
Mucosa:

orofaringea, lingua,
laringe e setto nasale



Stenosi della gliottide:
disfagia, disfonia





Lesioni mucocutanee frequenti

papule cutanee ulcerate o "molluscoidi"
e
ulcerazioni della mucosa orale



Consenso EORTC/MSGERC

CID 2020:71 (15 September) • Donnelly et al

Clinical Infectious Diseases
MAJOR ARTICLE



Revision and Update of the Consensus Definitions of Invasive Fungal Disease From the European Organization for Research and Treatment of Cancer and the Mycoses Study Group Education and Research Consortium

Table 1. Criteria for Proven Invasive Fungal Disease

Fungus	Microscopic Analysis: Sterile Material	Culture: Sterile Material	Blood	Serology	Tissue Nucleic Acid Diagnosis
Endemic mycoses	Histopathology or direct microscopy of specimens obtained from an affected site showing the distinctive form of the fungus	Recovery by culture of the fungus from specimens from an affected site	Blood culture that yields the fungus	Not applicable	Not applicable



Micosi endemica confermata

- Istopatologia o microscopia diretta di campioni ottenuti da un sito affetto che mostra la forma distintiva del fungo
- Recupero mediante coltura del fungo da sangue o campioni clinici da un sito interessato

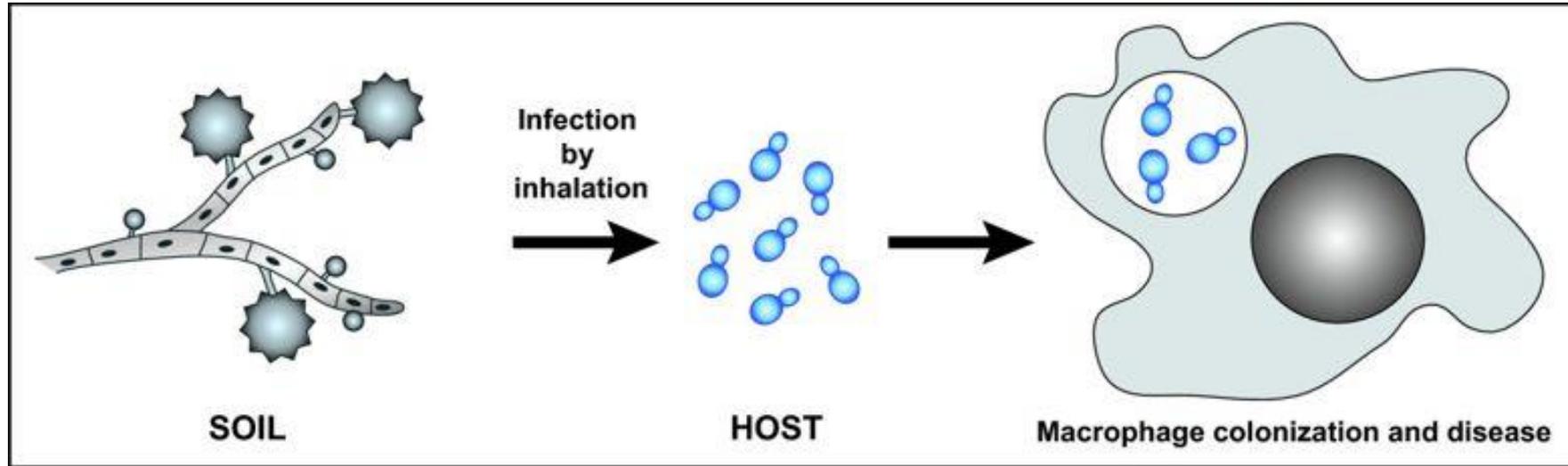
Guidelines CMM/ISHAM

Global guideline for the diagnosis and management of the endemic mycoses: an initiative of the European Confederation of Medical Mycology in cooperation with the International Society for Human and Animal Mycology



Lancet Infect Dis 2021 Dec;21(12):e364-e374.

Diagnosi



Histoplasma

Esame diretto

Giemsa

1-5 micron

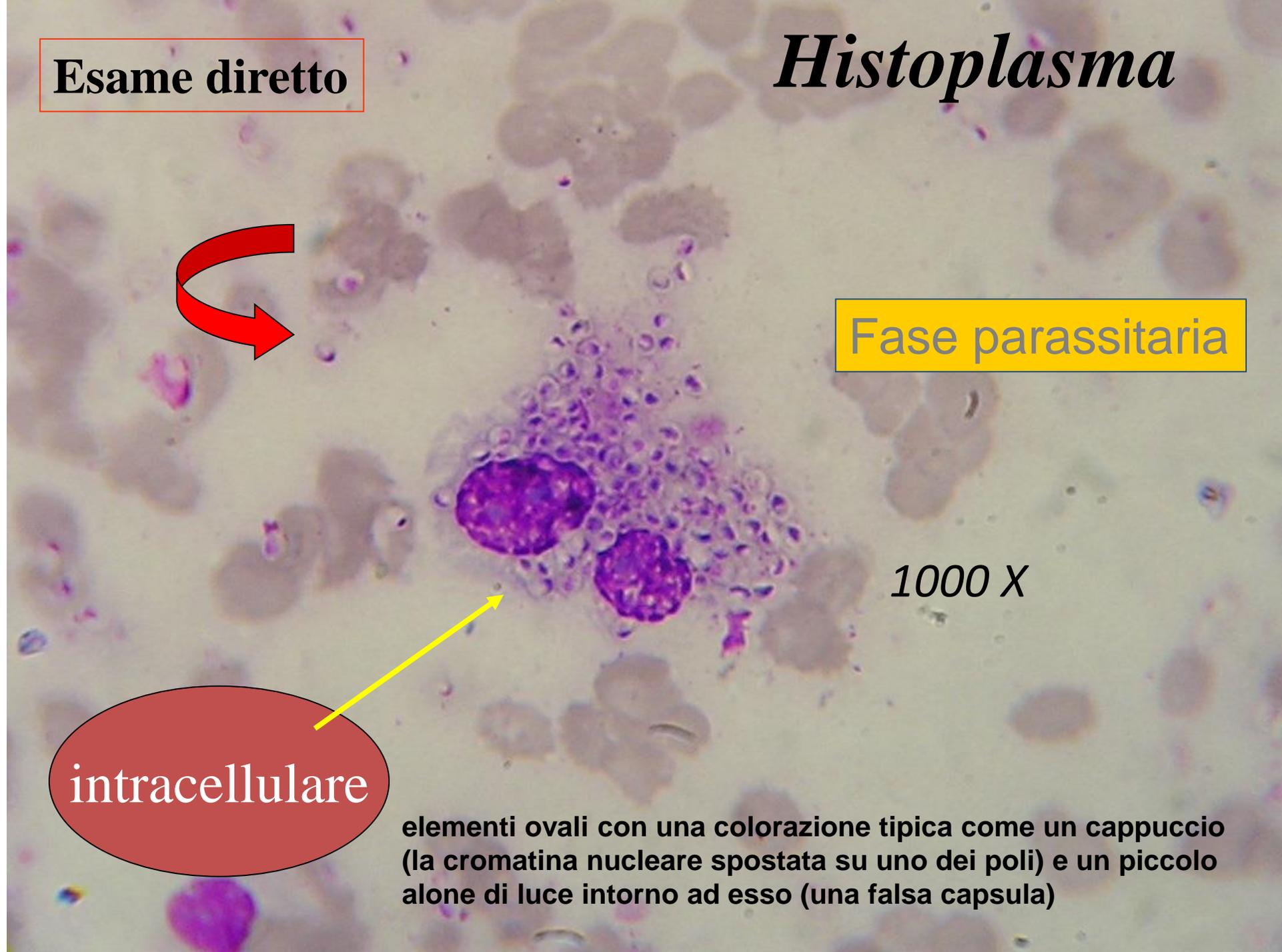
La sensibilità dell'esame varia a seconda del carico della malattia e dipende in gran parte dal grado di immunosoppressione dell'ospite

Fase parassitaria

1000 X

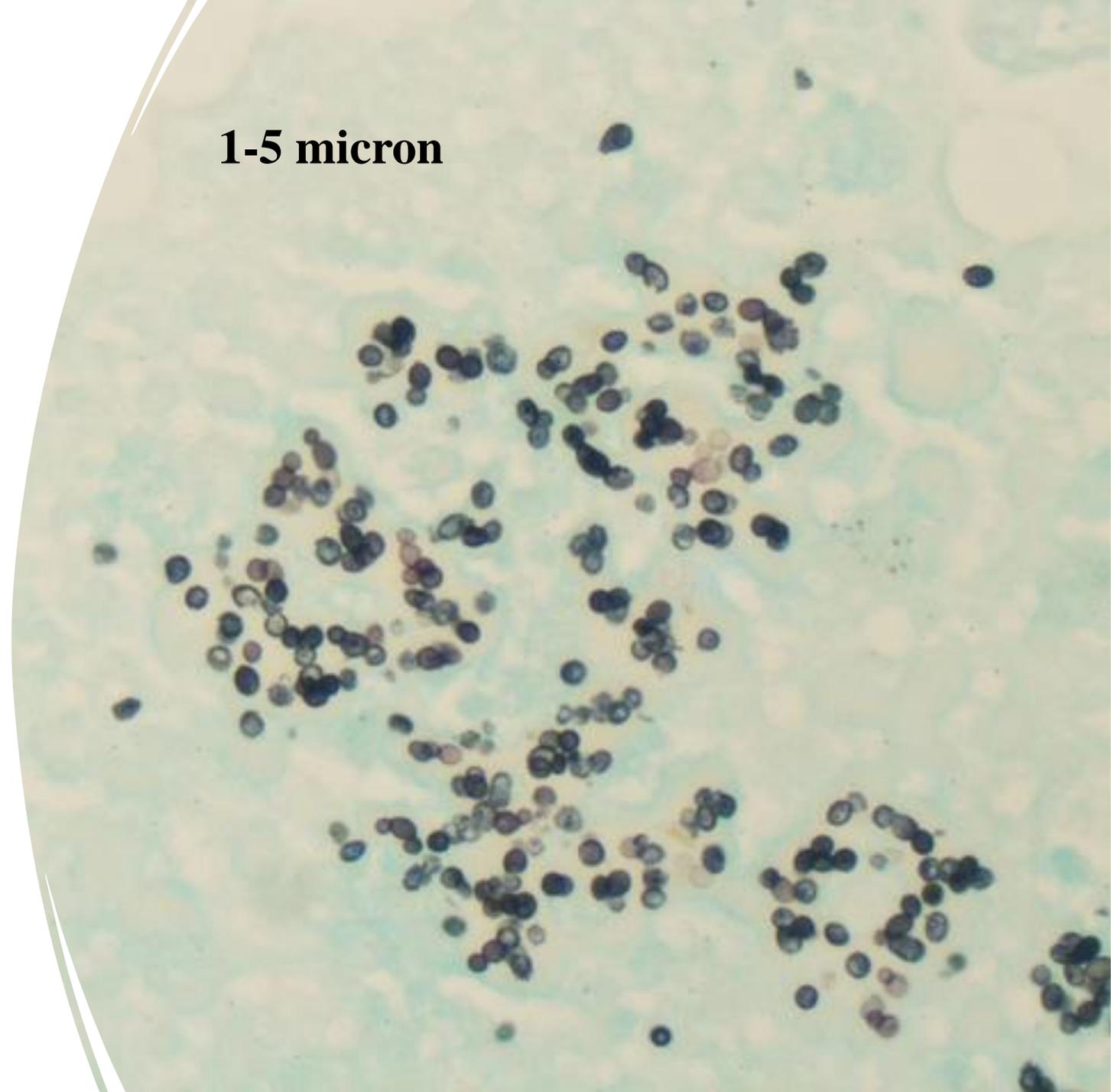
intracellulare

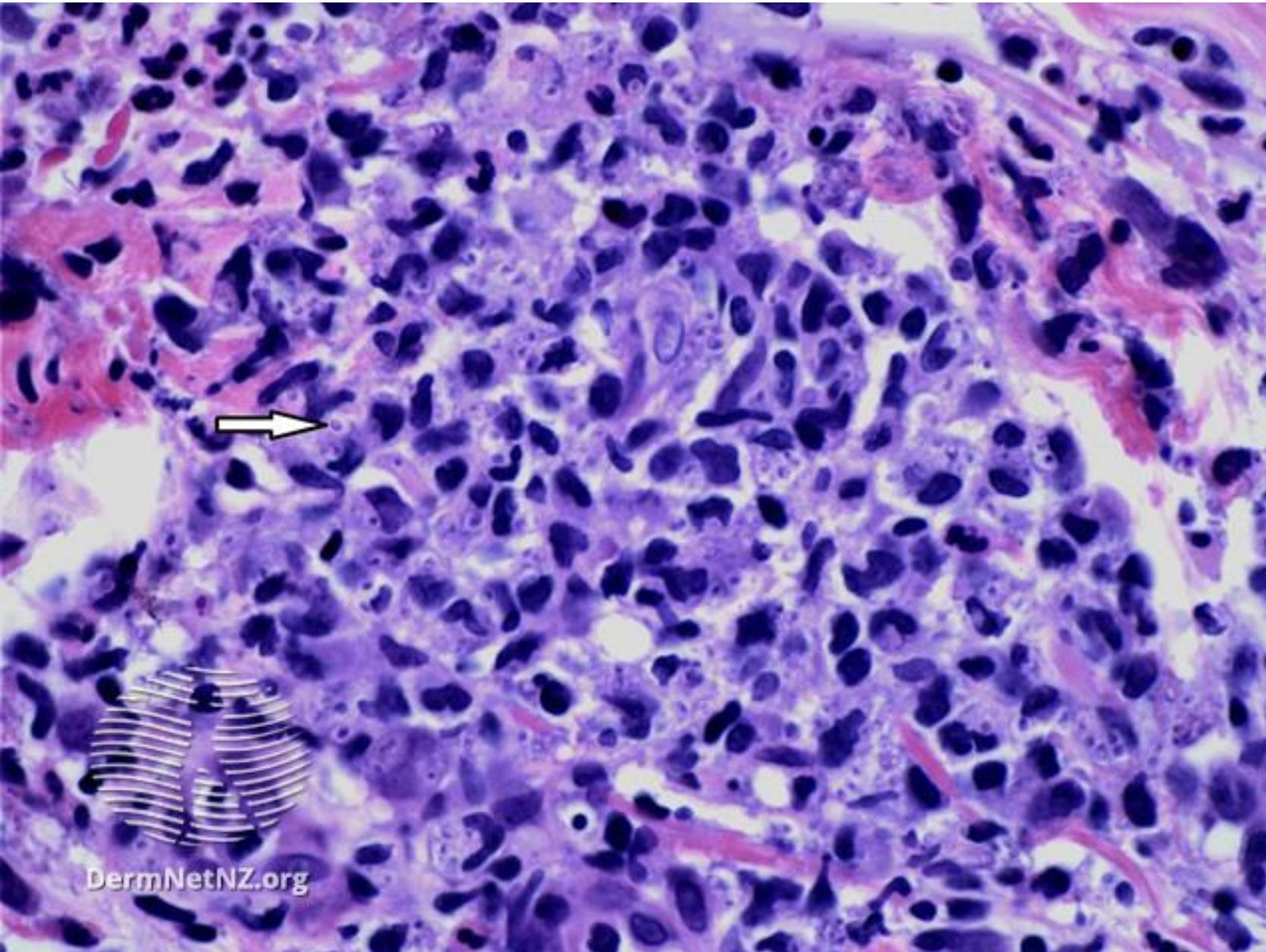
elementi ovali con una colorazione tipica come un cappuccio (la cromatina nucleare spostata su uno dei poli) e un piccolo alone di luce intorno ad esso (una falsa capsula)



1-5 micron

-
- **Grocott**





Immunosuppressed patient.
Dermal infiltrate is revealed to contain numerous plasma cells, histiocytes and lymphocytes.

Depending on the state of the host and stage of the lesions there may be extensive granulomas.

Accompanying the infiltrate there are **numerous budding yeast forms**, predominantly within histiocytes, and few organisms residing extracellularly

A clear space or artifactual “halo” may be evident due to the retraction of the basophilic fungal cell cytoplasm from the poorly stained cell wall

PAS

Coltivazione

Sempre con antibiotici !!!

cloramfenicolo, gentamicina,
penicillina, streptomina.



• Sabouraud

Da 2 a 3 tubi

Terreno acido-povero: glucosio, peptone, agar-agar.



• Brain Heart Infusion (BHI)

Da 2 a 3 tubi



• Terreni selettivi:

- Mycosel (BBL, Becton Dickinson)
- Mycobiotic (Thermo Fisher Scientific, etc.)

Da 2 a 3 tubi

Cicloheximide

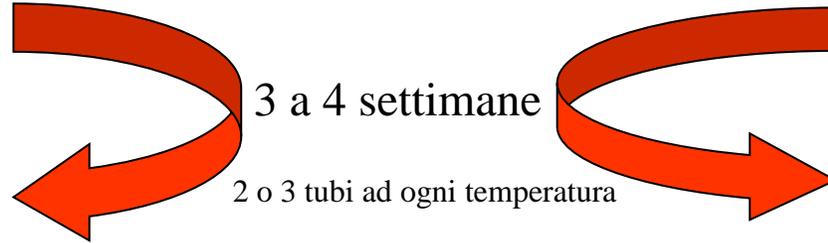


Inibisce specie di *Cryptococcus*, *Scopulariopsis*, *Fusarium*,
Trichosporon, *Aspergillus*, *Mucorales*

TERMODIMORFICO

T° : 25-28°C

T°: 35-37°C



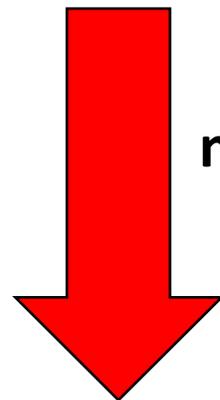
Fase filamentosa (saprofita)

pluricellulare



Colonie a crescita lenta
(2 o 4 settimane)

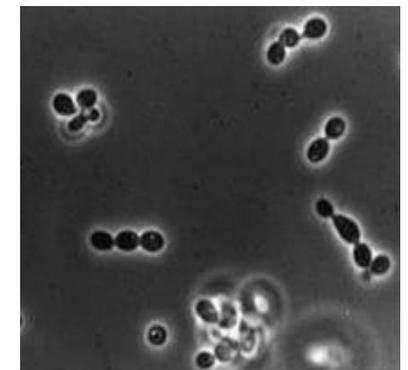
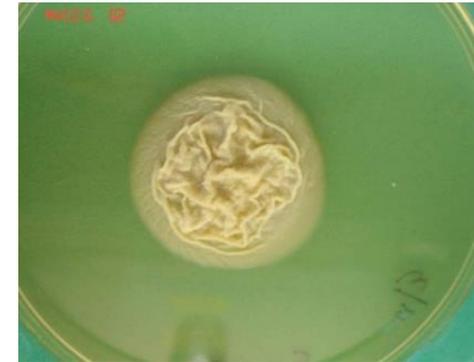
Colonie cotonate
Biancastro poi marrone



microscopia

Fase di lievito (parassitaria)

unicellulare



Lieviti (1-5 micron)
(unicellulare) ovoidale
con una singola gemma

Multicellulare in natura e in vitro

25-28 °C

**Forma filamentosa
(saprofita)**

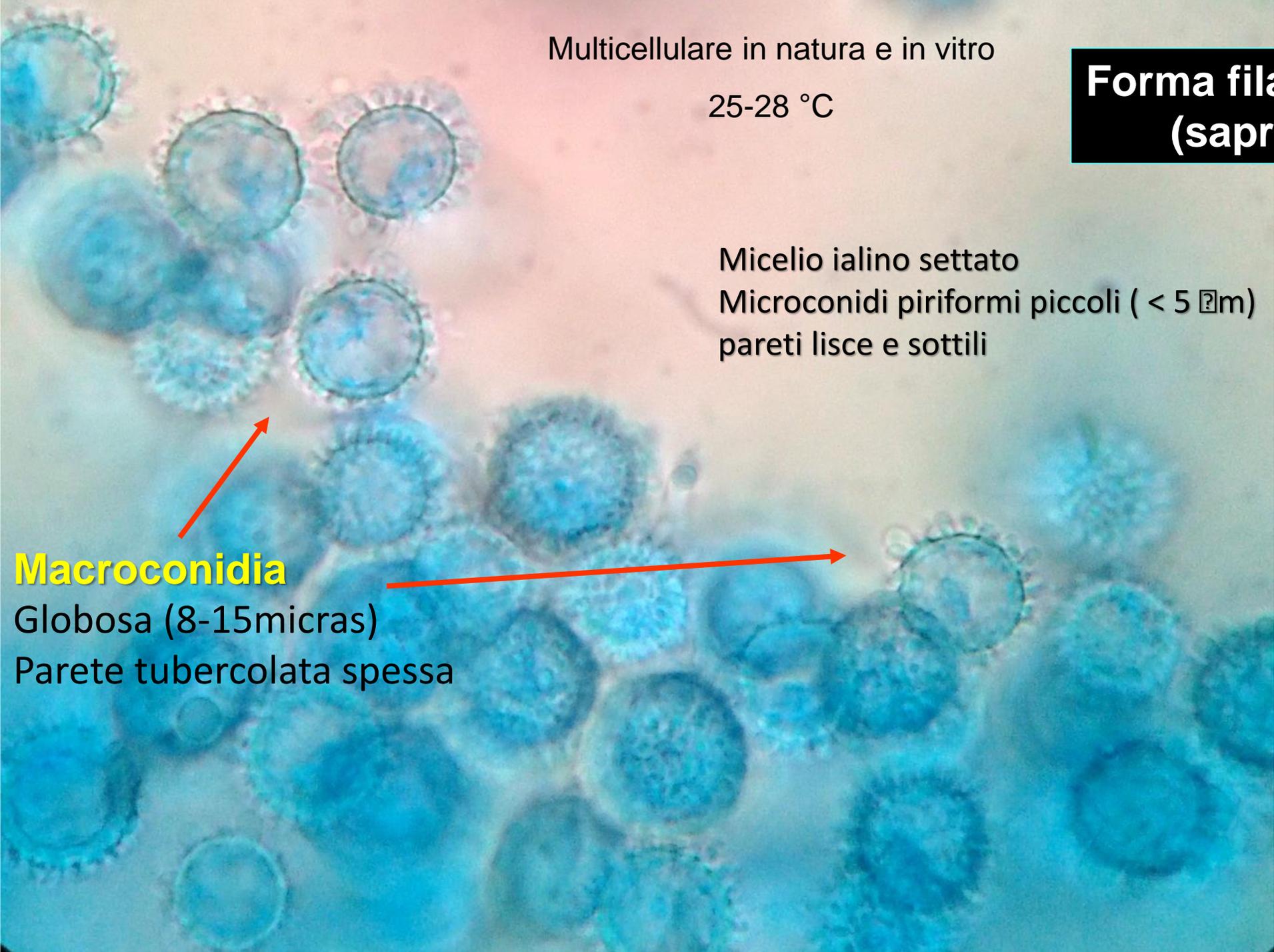
Micelio ialino settato

Microconidi piriformi piccoli (< 5 µm)
pareti lisce e sottili

Macroconidia

Globosa (8-15micras)

Parete tuberculata spessa



Histoplasma – fungo dimorfo

Fase saprofita

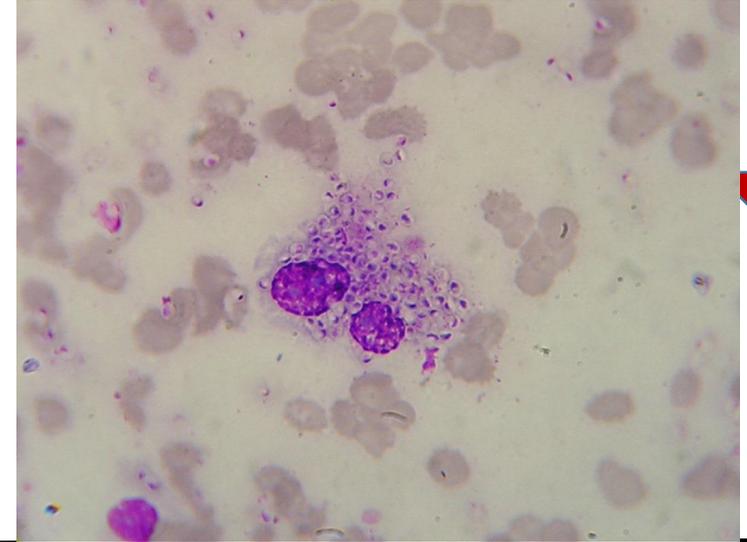
T° : 25-28°C

T°: 35-37°C

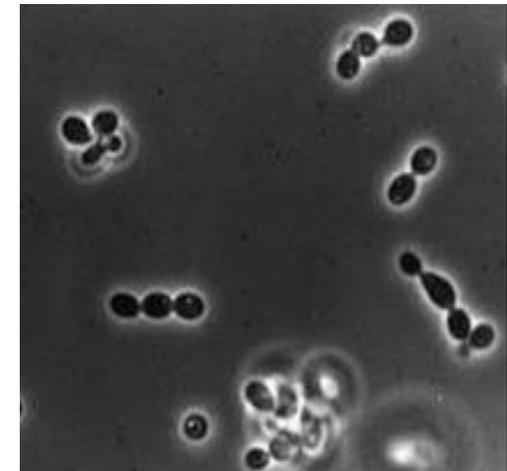
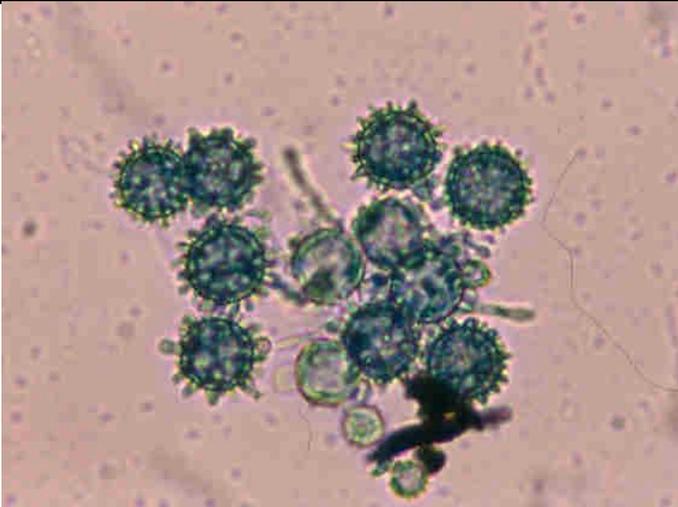
Fase parassitaria

ambiente

campione clinico



coltura



Consenso EORTC/MSGERC

CID 2020:71 (15 September) • Donnelly et al

Clinical Infectious Diseases

MAJOR ARTICLE



Revision and Update of the Consensus Definitions of Invasive Fungal Disease From the European Organization for Research and Treatment of Cancer and the Mycoses Study Group Education and Research Consortium

Micosi endemica Probabile



Table 3. Other Probable Invasive Diseases

Histoplasma or *Blastomyces* antigen in urine, serum, or body fluid

Antibody to *Coccidioides* in cerebrospinal fluid or 2-fold rise in 2 consecutive serum samples

- Evidenza di esposizione ambientale al fungo
- Clinica compatibile
- presenza di antigeni *Histoplasma* in qualsiasi fluido corporeo
- poiché il recupero mediante coltura e l'evidenza istopatologica dell'infezione sono di solito carenti

Guidelines CMM/ISHAM

Global guideline for the diagnosis and management of the endemic mycoses: an initiative of the European Confederation of Medical Mycology in cooperation with the International Society for Human and Animal Mycology



Lancet Infect Dis 2021 Dec;21(12):e364-e374.



ANTIGEN / PCR / ELISA

ANTIBODYE - ID/CIEF

CULTURE / IDENTIFICATION



3/4 h a 24/48 hs

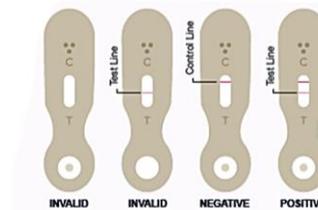
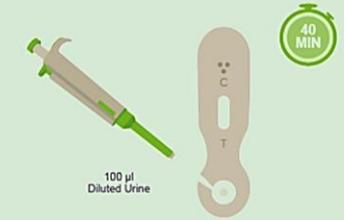
48 / 72 hs

2 – 4 weeks

less sensitive in immunosuppressed

La histoplasmosis es una infección sistémica causada por el hongo dimorfo *Histoplasma capsulatum*. Se ha demostrado que la detección de antígeno es útil para un diagnóstico rápido de esta micosis.

Con un diagnóstico temprano y un tratamiento adecuado el 80 a 95 % de los pacientes pueden tener una evolución favorable en las formas graves, diseminadas y progresivas, de esta infección.



Absence of a control line indicates an INVALID result. Presence of both a test and a control line indicates a POSITIVE result. Absence of a test line and presence of a control line indicates a NEGATIVE result.

Laboratorios Miravista Diagnostics (USA) desarrolló un ensayo inmunocromatográfico de flujo lateral (LFA) para la detección cualitativa del antígeno galactomanano de *Histoplasma* en orina en sólo 3 pasos rápidos, con lectura visual del resultado: una línea: negativo; dos líneas, positivo.

Este nuevo ensayo de flujo lateral ofrece un método diagnóstico rápido y la posibilidad de reducir la morbilidad y las muertes causadas por la histoplasmosis.

SENSIBILIDAD: 93,18% /ESPECIFICIDAD: 96,97% / PRODUCTO CE MARK.

VENTAJAS

- No requiere incubación previa ni instrumentos de lectura.
- Tres simples pasos: Diluir, mezclar y dispensar.
- Resultados en 40 minutos.
- Utilización en muestras no invasivas.
- Almacenamiento a temperatura ambiente.

PARA SOLICITAR ESTE PRODUCTO:

Item	Descripción
1010	Histoplasma Urine Ag. LFA Kit x 25 det.

Para control:

1020-	Histoplasma Urine Ag. LFA Control Kit
-------	---------------------------------------

Importa y distribuye para Argentina MedicaTec SRL en forma directa y a través de su red de distribuidores en todo el país.

Para más información y/o pedido de cotización: ventas@medica-tec.com.ar



Av. Triunvirato 2789 - c1427aaa, Bs. As., Argentina.
Tel.: (54 11) 4554.4600 Fax: (54 11) 4555.0416
ventas@medica-tec.com.ar · www.medica-tec.com



Article

Diagnosis of Progressive Disseminated Histoplasmosis in Advanced HIV: A Meta-Analysis of Assay Analytical Performance

Diego H. Caceres ^{1,2,*}, Martha Knuth ³, Gordana Derado ¹ and Mark D. Lindsley ¹

J. Fungi 2019, 5(3), 76; <https://doi.org/10.3390/jof5030076>



“Antigen detection assays, Sen 95% Spe 97%”

Additionally:

- Commercial kit
- More evidence of validations
- No need for high lab capacity
- Does not use invasive samples
- Quick availability of results

HISTOPLASMA GM ENZYME IMMUNOASSAY



REF: HGM201



BENEFITS

- High sensitivity and specificity
- Qualitative detection of *Histoplasma* galactomannan
- Greatly reduces cost over send-outs (which run about \$100/patient)
- Reduce time-to-results and send-outs
- No pretreatment required

TIME ADVANTAGE



MYCOLOGY



Multicenter Validation of Commercial Antigenuria Reagents To Diagnose Progressive Disseminated Histoplasmosis in People Living with HIV/AIDS in Two Latin American Countries

Diego H. Cáceres,^{a,b} Blanca E. Samayoa,^{c,d} Narda G. Medina,^e Angela M. Tobón,^{a,f} Brenda J. Guzmán,^g Danicela Mercado,^e Angela Restrepo,^a Tom Chiller,^b Eduardo E. Arathoon,^{c,e} Beatriz L. Gómez^{a,g}

clarus
HISTOPLASMA GM
ENZYME IMMUNOASSAY



REF: HGM201

IMMY'S MONOCLONAL ANTIBODY vs POLYCLONAL SEND OUT¹

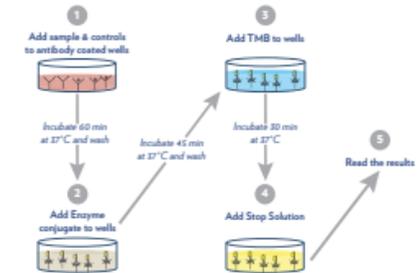
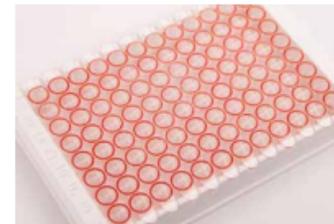
IMMY's monoclonal antibody-based assay appears to provide improved analytical performance for management of immunocompromised histoplasmosis patients.

IMMY's Monoclonal Antibody		IMMY	
		Positive	Negative
SEND OUT	Positive	19	2
	Negative	3	79
Overall Agreement		95%	

¹ Zhang X, Gibson B, Daly TM. Evaluation of commercially available reagents for diagnosis of histoplasmosis infection in immunocompromised patients. J Clin Microbiol. 2015;53(12):4095-101.

REF	Description	Tests
HGM201	<i>Histoplasma</i> Galactomannan EIA	96

Simplified Procedure Results in 2 hours, 15 minutes



589 samples

- *63 HIV-histoplasmosis
- *483 HIV-non histoplasmosis
- *43 non-HIV

Sensitivity **98%** (95% CI, 95-100)

Specificity **97%** (95% CI, 96-99)

FDA and CE labels

Diagnosi

Necesidad de equipamiento de media / alta complejidad

Consenso EORTC/MSGERC
Non incluso

ANTIGENE / PCR / EIA-ELISA

3/4 ore a 24/48 ore

ANTICORPI - ID/CIFF

48 / 72 ore
meno sensibile in
persone immunocompromesse

*Più utile per i pazienti con
istoplasmosi polmonare
cronica e potrebbe non
essere utile nei pazienti con
immunosoppressione grave.*

COLTURA / IDENTIFICAZIONE

2 – 4 settimane



News + Events

Holidays

News

From the Desk of Dr. Wheat

Insights

Past Events

Testimonials

Events

Histoplasma Antigen Detection for Diagnosis of Histoplasmosis in Cats: Comparison of the MiraVista and ImmunoMycologics [IMMY(R)] Enzyme Immunoassays

A monoclonal antibody-based *Histoplasma* antigen EIA [IMMY(R)] was introduced by ImmunoMycologics in 2019. This assay was evaluated in cats at Oklahoma State University (OSU) [5]. Urine samples were tested from 40 cats with cytopathology or histopathology proven histoplasmosis and 59 controls cats. The specimens were tested at OSU using the IMMY(R) EIA and at MiraVista using the MiraVista EIA. Results are presented in the table. Specimens containing less than 1.1 ng/mL were negative in the IMMY(R) EIA and positive in the MiraVista EIA. Attempts were made to increase the sensitivity of the IMMY(R) EIA by lowering the cut off for positivity and heating the urine at 120°C for 3 minutes, without improvement.

Elevata accuratezza diagnostica, sensibilità e specificità

Performance	MiraVista EIA	IMMY ASR EIA	P value
Sensitivity	94% (30/32)	77% (27/35)	.01
Specificity	97% (59/61)	97% (57/59)	.65

Micosi negli immunocompromessi

- Scarsa capacità di formare CA

Tecniche diagnostiche sierologiche
convenzionali con bassa sensibilità + fasi
con emocolture negative



Rilevamento degli anticorpi

S:90% polmonare acuta

S:80% cronica disseminata

Istoplasmosi

metabolico (H y M)

CIEF

IDD

M (70% de los pacientes)

Appare per primo – Fase iniziale o di recupero

H (Vicino al siero) Infezione attiva

Ac contro questo Ag può essere rilevato fino a 2 anni dopo l'infezione.

Entrambe le bande hanno valore semiologico

2 settimane per avere un risultato +.

Falso +: Pb, Hc, Bd y Ci

Trattamento

La scelta dell'antifungino, così come la dose e la sua forma di somministrazione, dipendono dalle manifestazioni cliniche del paziente e dalle patologie associate o dai loro trattamenti.

Forma clinica	Droga	Amministrazione	Dose giornaliera	Durata
cronica disseminata	Itraconazol	Oral	200 mg	6 meses
	Anfotericina B	Intravenosa	0,7 mg/kg	2 a 3 meses
	Anfotericina B liposomal		3 a 5 mg/kg/día	
subacuta disseminata	Itraconazol	Oral	600 mg/dia 400 mg/dia 200 mg/día	2 ó 3 días 3 meses lapsos variables
	Anfotericina B	Intravenosa	0,7 mg/kg hasta 40mg/kg	2 a 3 meses
acuta disseminata	Anfotericina B Anfotericina B liposomal	Intravenosa	0,7 mg/kg hasta 40mg/kg 3 a 5 mg/kg/día	2 a 3 meses

Voriconazolo non è raccomandato di routine

Lancet Infect Dis 2021 Dec;21(12):e364-e374.

Motivi per indicare AMB invece di itraconazolo: evoluzione acuta, gravità estrema, coinvolgimento del SNC, vomito e/o diarrea e tubercolosi attiva, che richiedono rifampicina per il trattamento.

Nell'istoplasmosi del SNC, il farmaco di scelta è l'AMB liposomiale a dosi da 2 a 3 mg/kg/g.

ECOLOGIA E DISTRIBUZIONE GEOGRAFICA

I patogeni causali della malattia si trovano in particolare nelle aree calde, aride e desertiche del continente americano (degli Stati Uniti sudoccidentali, Messico, e Centro e Sud America).

Il suolo è il serbatoio naturale per le spore

Le spore fungine diventano disperse nell'aria quando il terreno è disturbato dai venti, dalla costruzione, dall'agricoltura e da altre attività.



WHO IS MOST LIKELY TO GET COCCIDIOIDOMYCOSIS?

- Le persone **che sono a rischio** di infezione da *Coccidioides* sono
 - Chiunque viva, visiti o viaggi attraverso le aree endemiche.
 - Persone le cui occupazioni comportano l'essere all'aperto o disturbare il suolo, come agricoltori, archeologi, personale militare e lavoratori edili.
- Il rischio di infezione aumenta quando aumenta la quantità di polvere nell'aria, ad esempio dopo terremoti, tempeste di sabbia, siccità o altri disastri naturali.



Nel 2019, oltre 20.000 casi umani di coccidioidomicosi sono stati segnalati negli Stati Uniti dai Centers for Disease Control and Prevention (CDC);



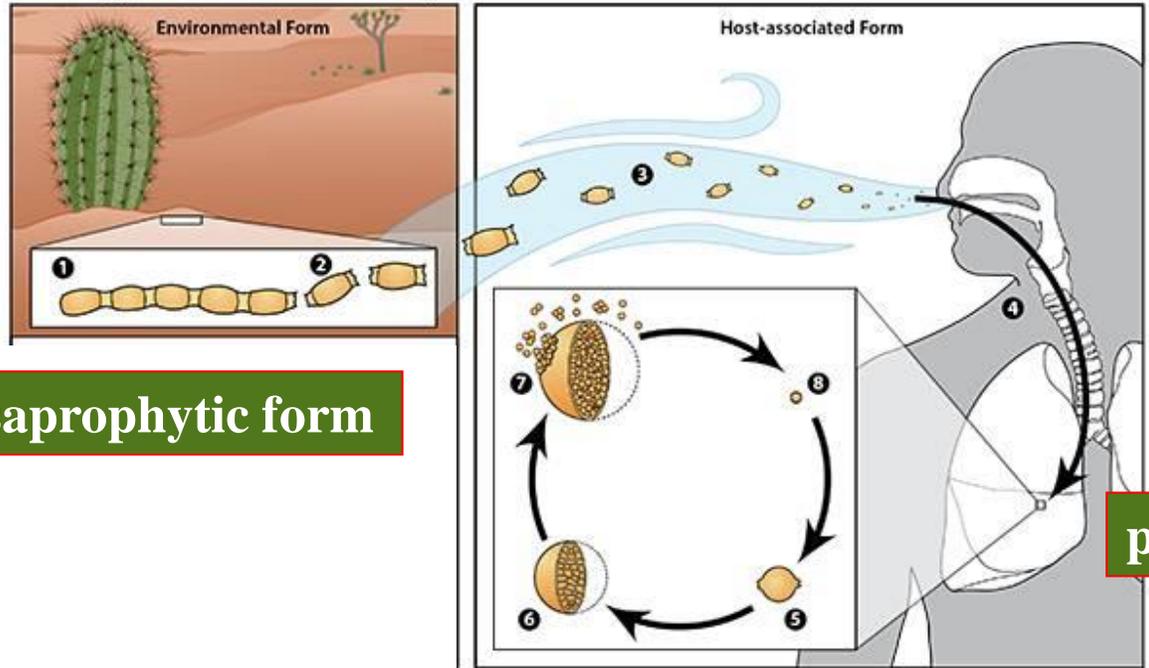
Due specie criptiche all'interno del genere *Coccidioides*

***Coccidioides immitis* (San Joaquin Valley)**

***Coccidioides posadasii* (USA- Mexico- Latinamerica)**

Infection occurs when microconidia or mycelial fragments is inhaled

Biology of Coccidioidomycosis



saprophytic form

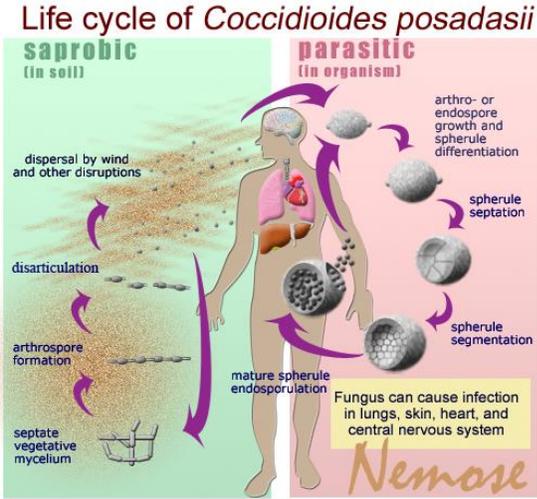
parasitic form

- Sintomi: febbre, tosse, mal di testa, dolori muscolari, dolori articolari alle ginocchia e alle caviglie e un'eruzione cutanea sulla parte superiore del tronco o delle estremità. Le persone infette possono avere nessuno, alcuni o tutti questi sintomi.
- Se la malattia avanza, può causare lesioni cutanee, polmonite cronica, meningite e infezione ossea e articolare.

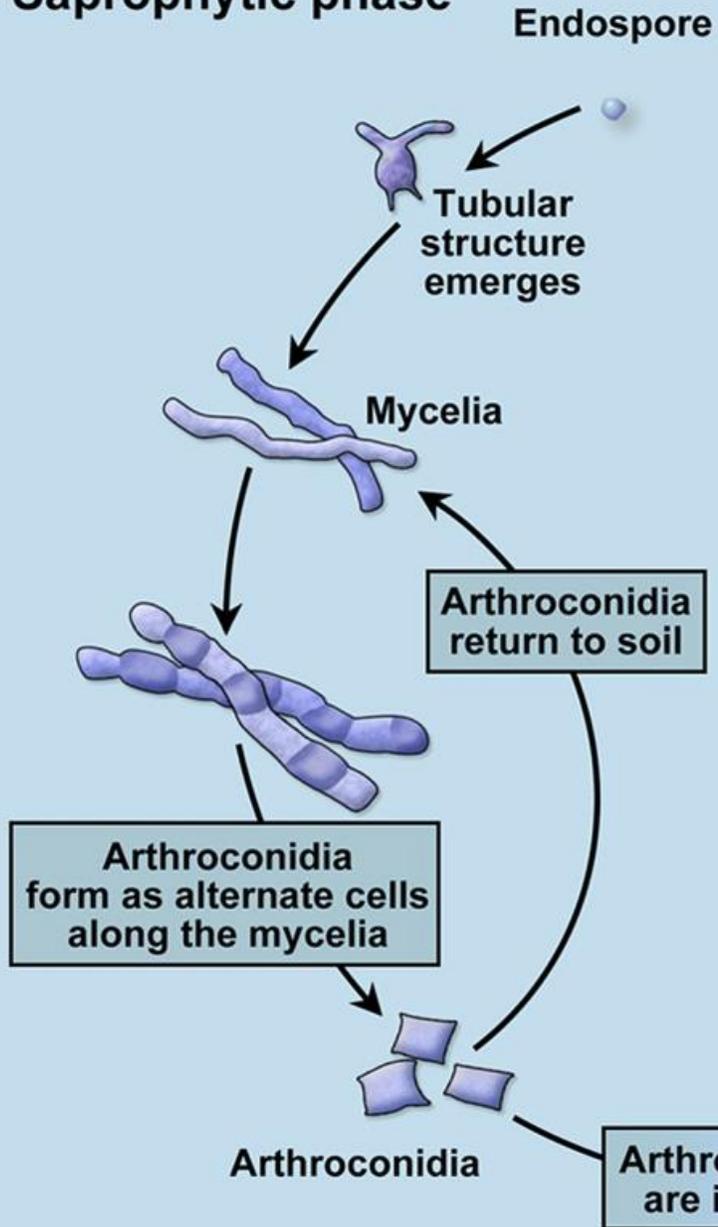
Sapronosi

I sintomi di solito compaiono tra 1 - 3 settimane dopo l'esposizione al fungo.

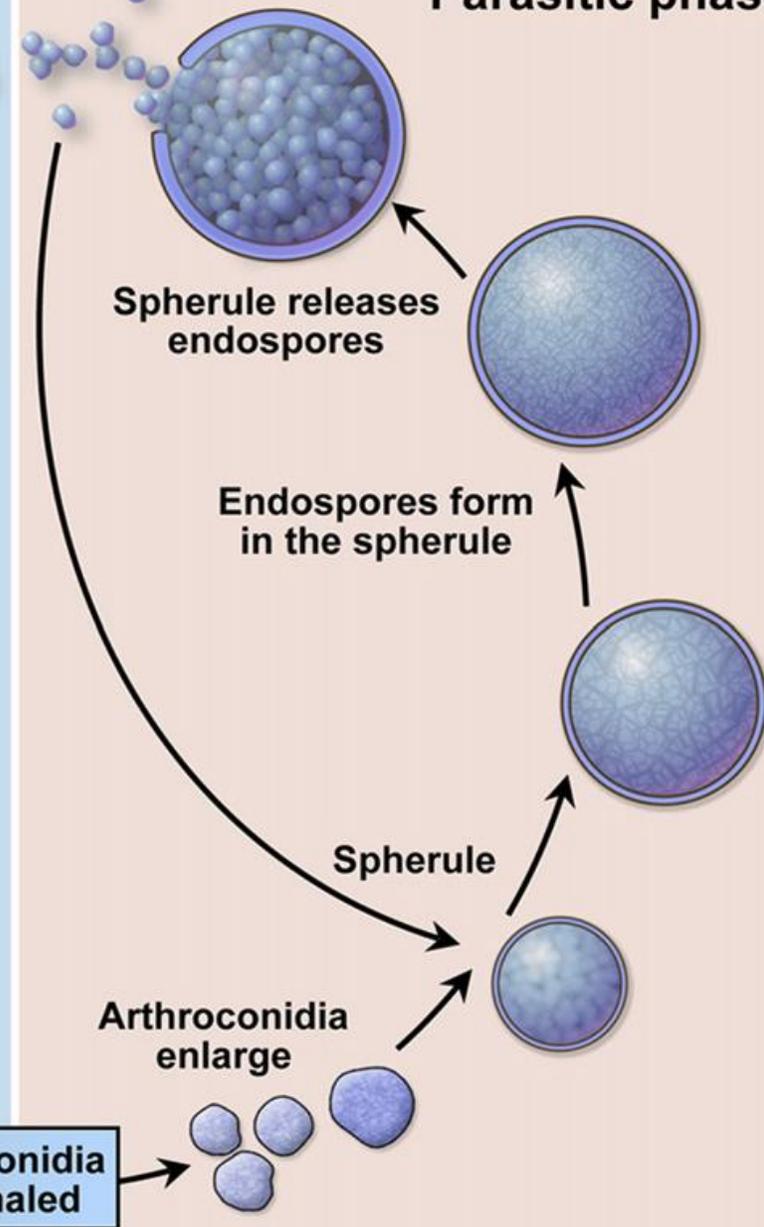




Saprophytic phase

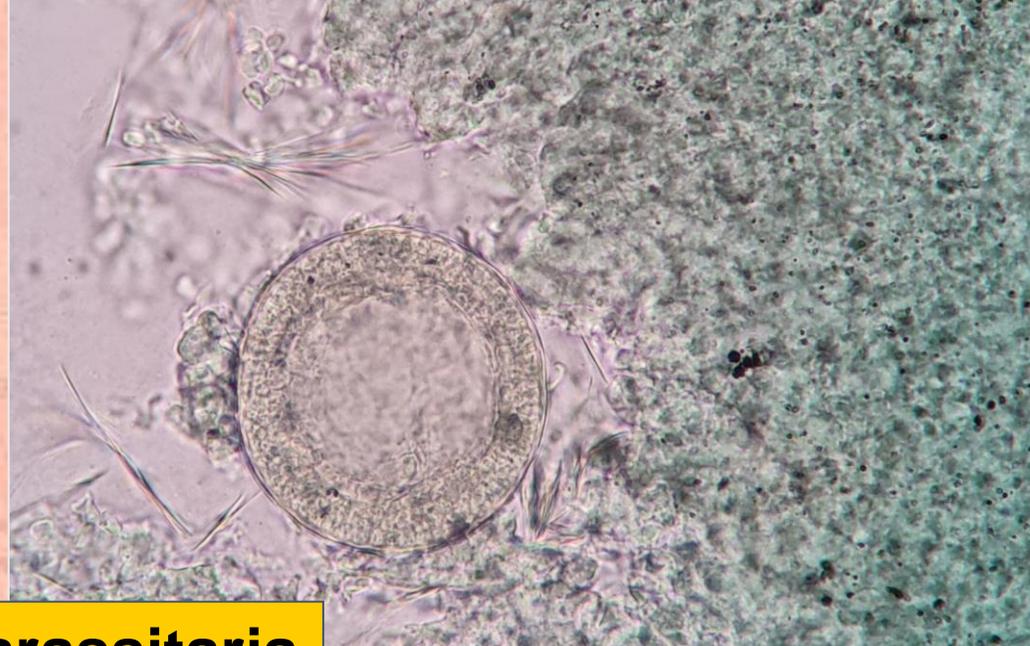


Parasitic phase



La sferula nel polmone crescerà e, alla fine, scoppierà rilasciando endospore, che si sviluppano in più sferule.

All'interno del polmone, la spora si trasforma in una struttura multicellulare più grande chiamata sferula



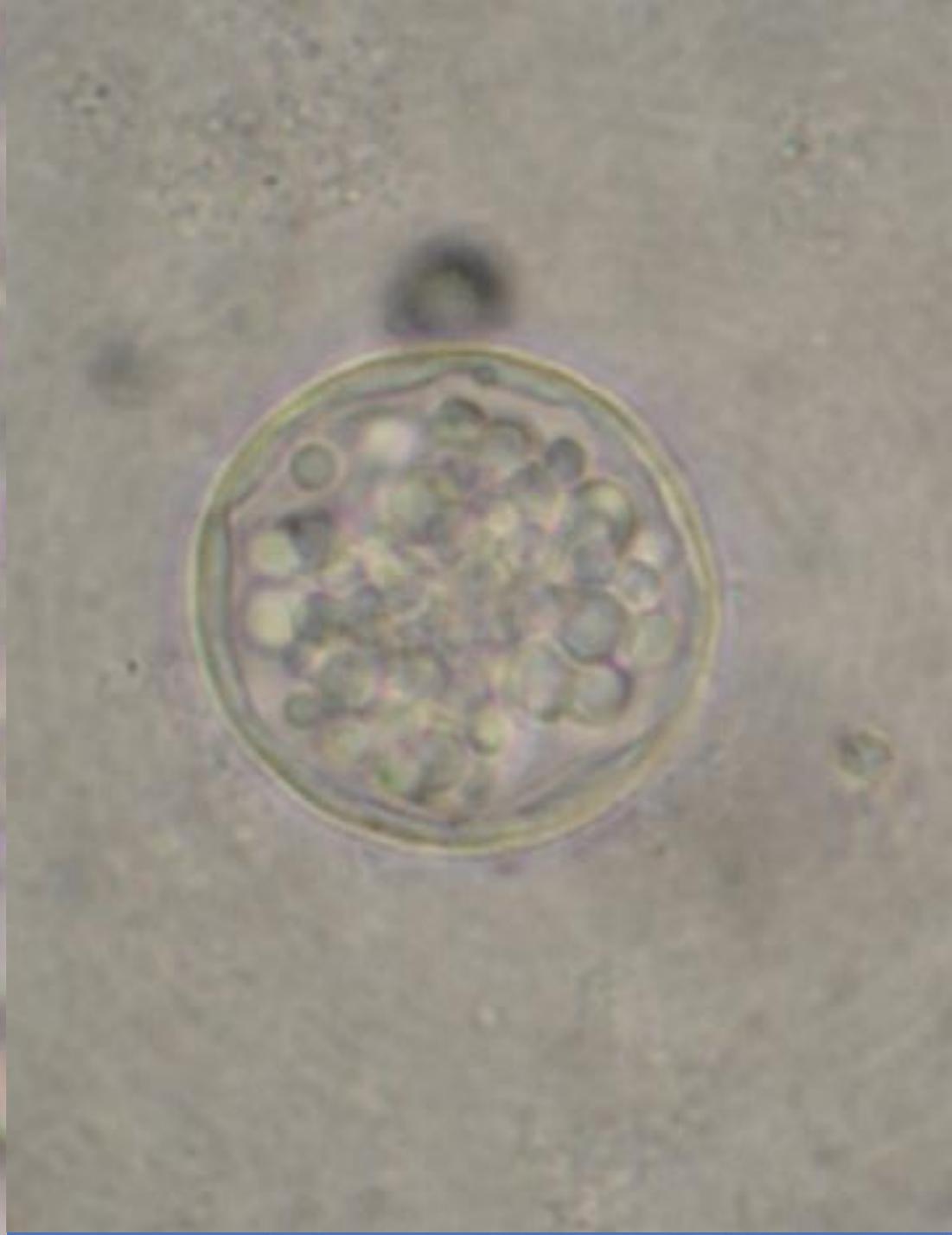
Fase parassitaria

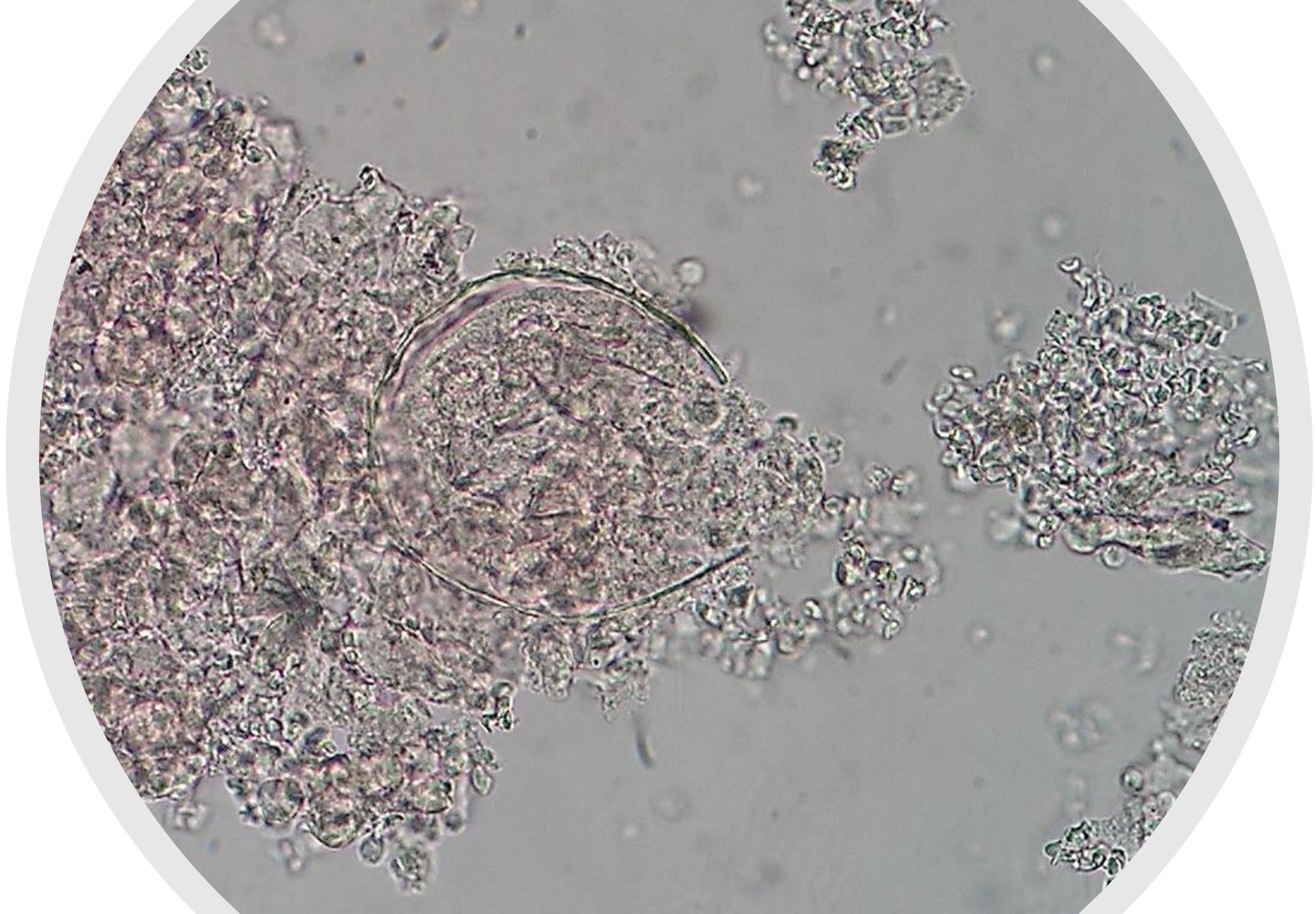


Esame diretto

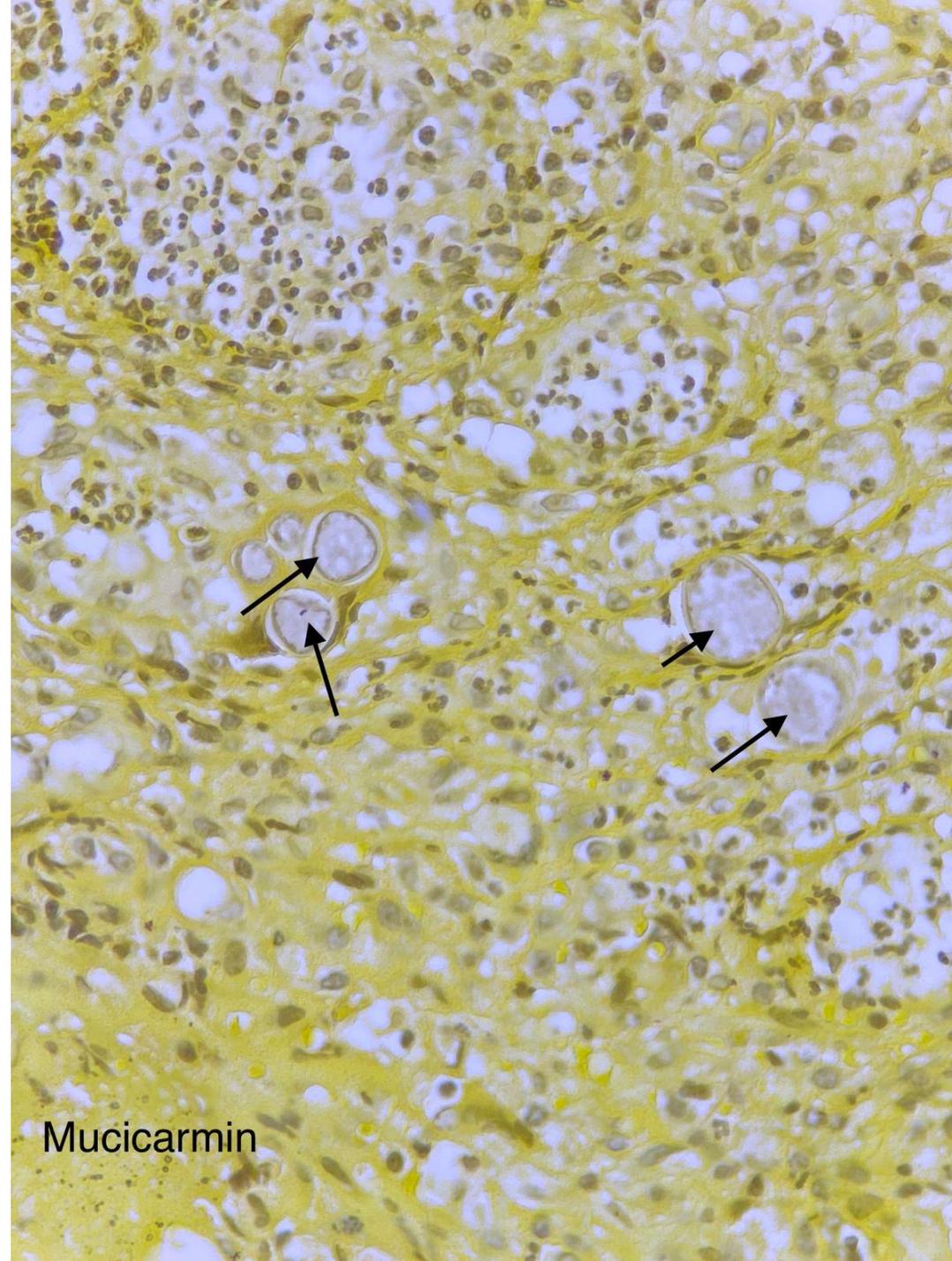
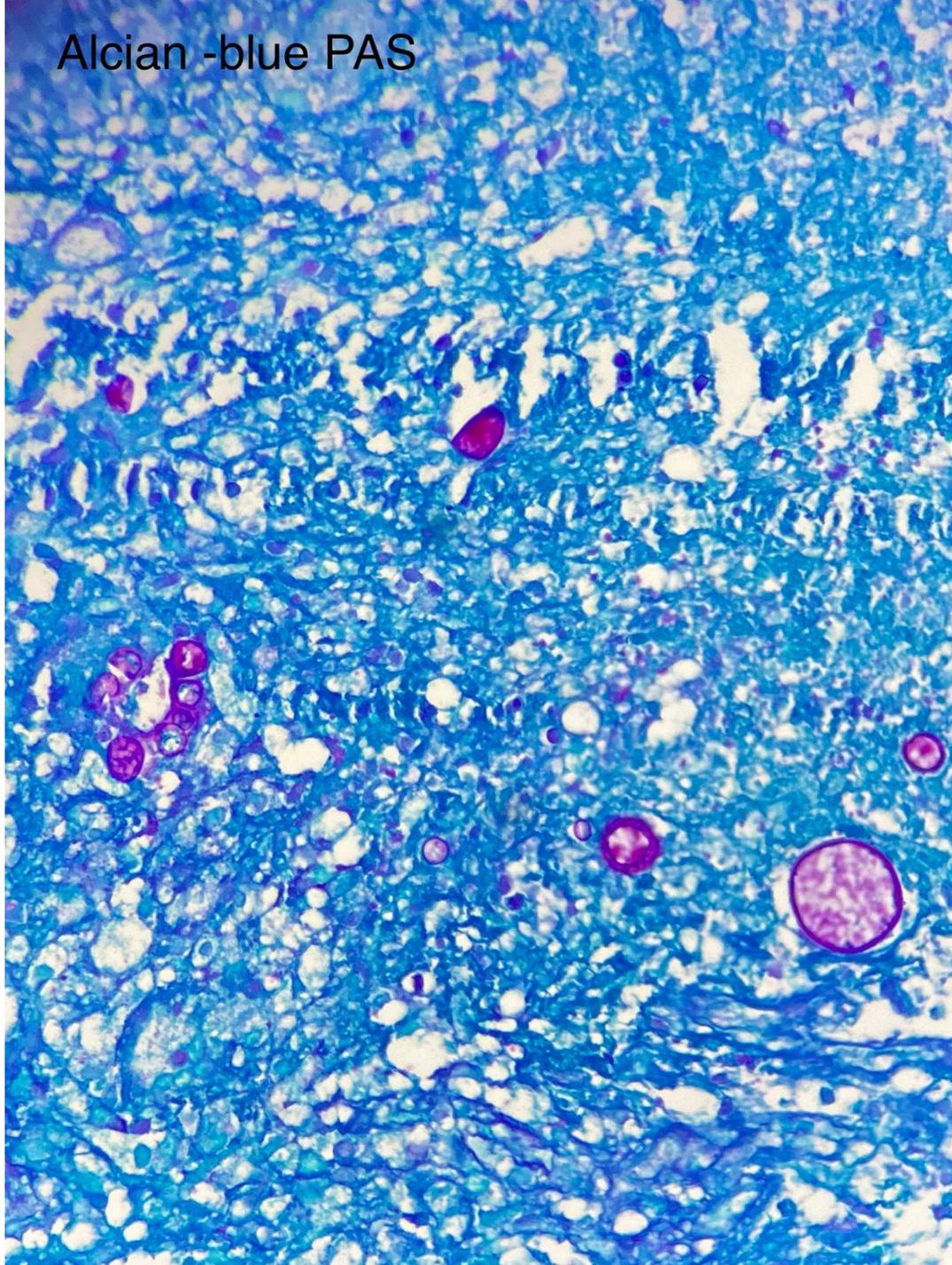
Blue di lattofenolo

Da 20 a 80 μ di diametro. Parete **spessa**,
con endospore all'interno

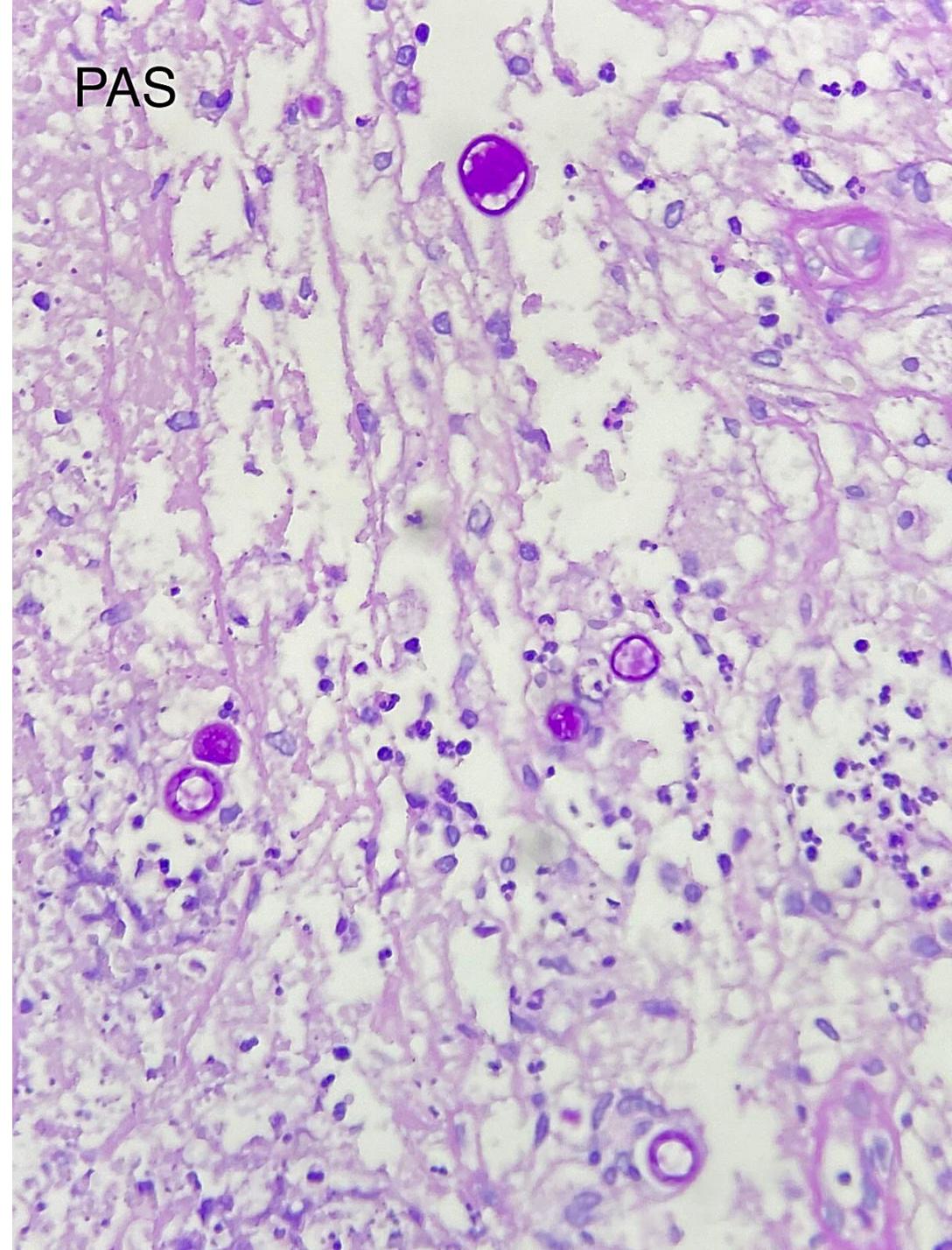
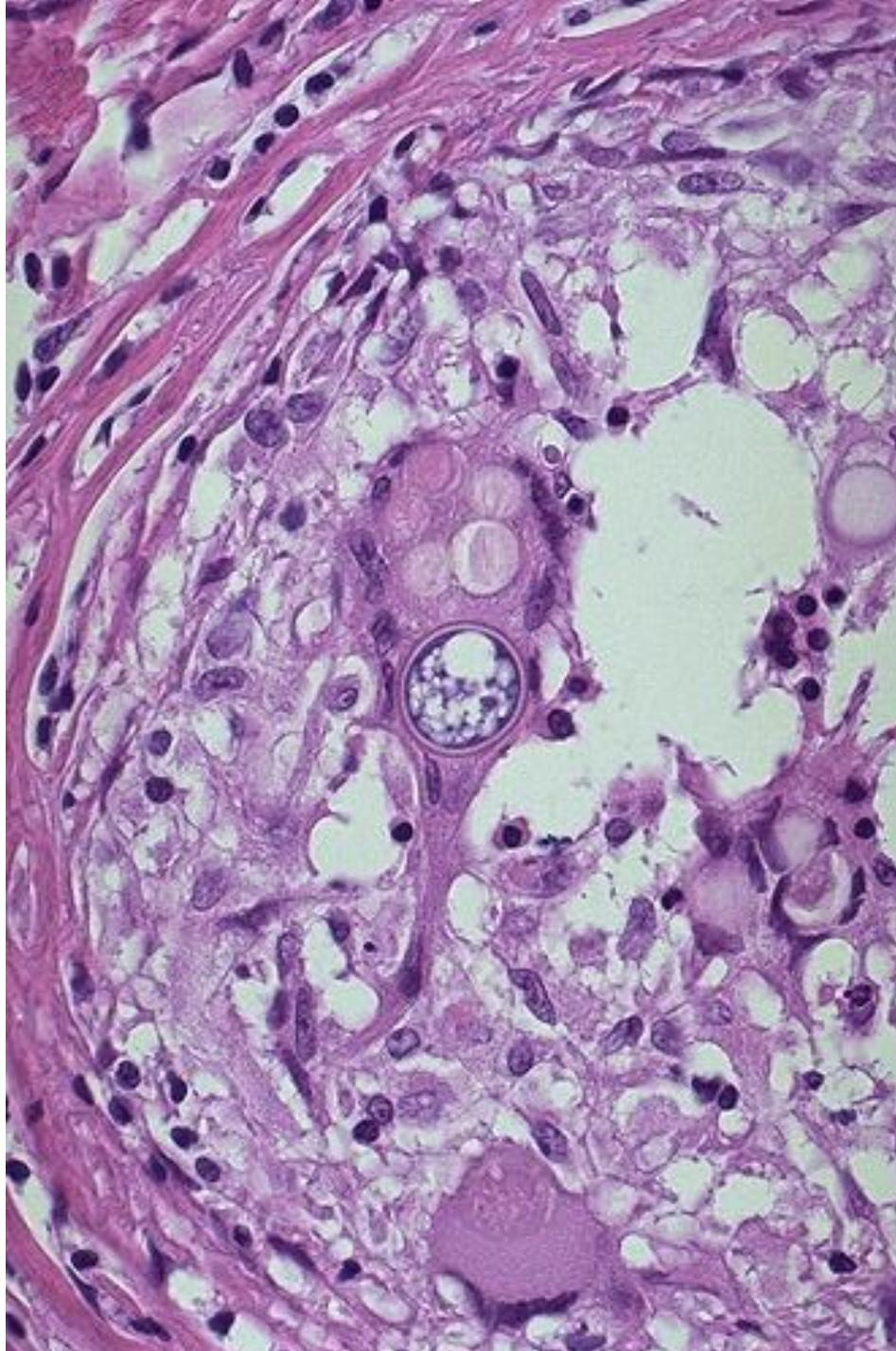




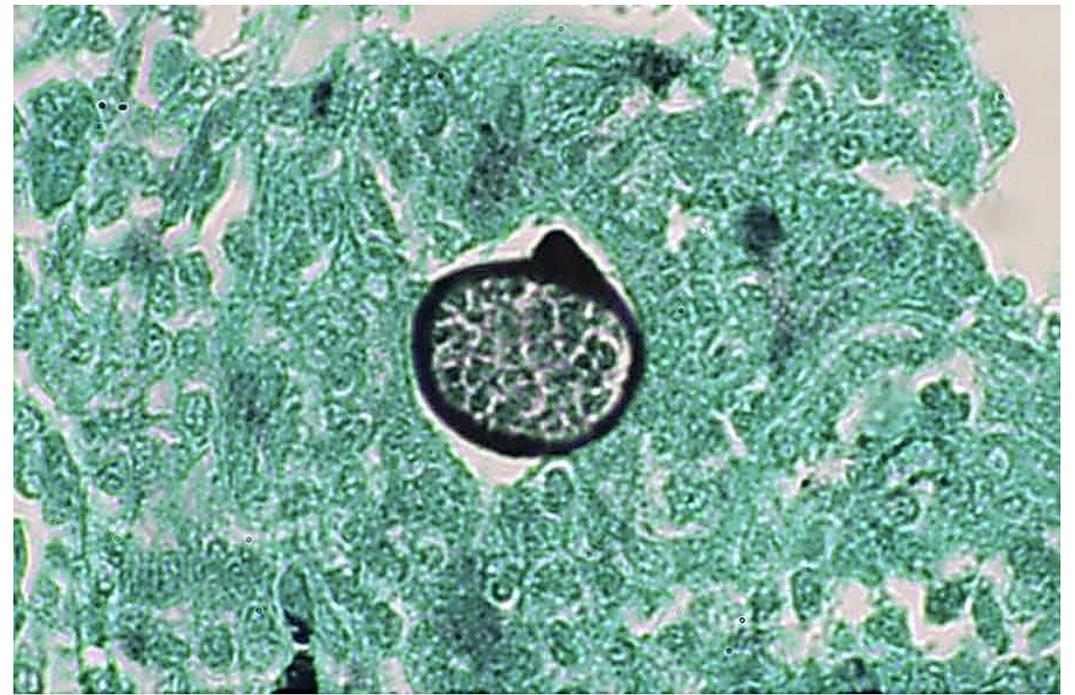
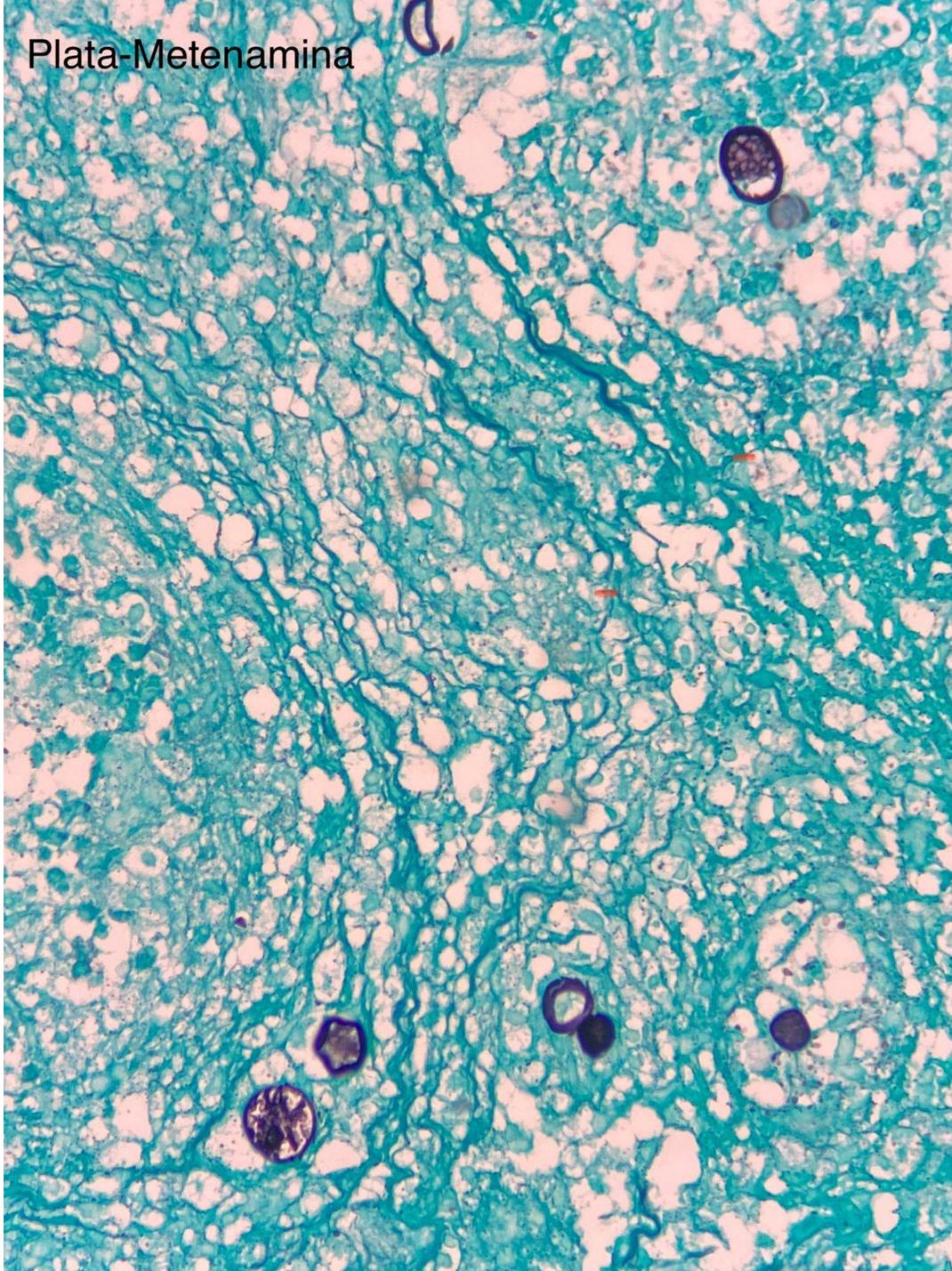
Alcian -blue PAS



Mucicarmin



Plata-Metenamina



Actas Dermosifiliogr. 2014;105:5-17

Grocott



Coltivazione

Sempre con antibiotici !!!

cloramfenicolo, gentamicina,
penicillina, streptomina.



• Sabouraud

Da 2 a 3 tubi

Terreno acido-povero: glucosio, peptone, agar-agar.



• Brain Heart Infusion (BHI)

Da 2 a 3 tubi



• Terreni selettivi:

- Mycosel (BBL, Becton Dickinson)
- Mycobiotic (Thermo Fisher Scientific, etc.)

Da 2 a 3 tubi

Cicloheximide



Inibisce specie di *Cryptococcus*, *Scopulariopsis*, *Fusarium*,
Trichosporon, *Aspergillus*, *Mucorales*

NO - TERMODIMORFO

35-37°C

**Fase filamentosa
(saprofita)**

pluricellulare



25-28°C

**Fase filamentosa
(saprofita)**

pluricellulare



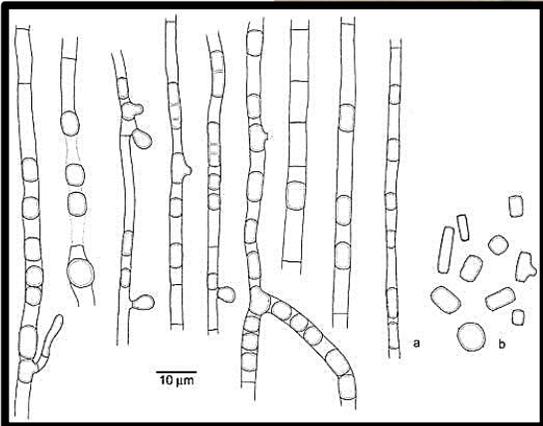
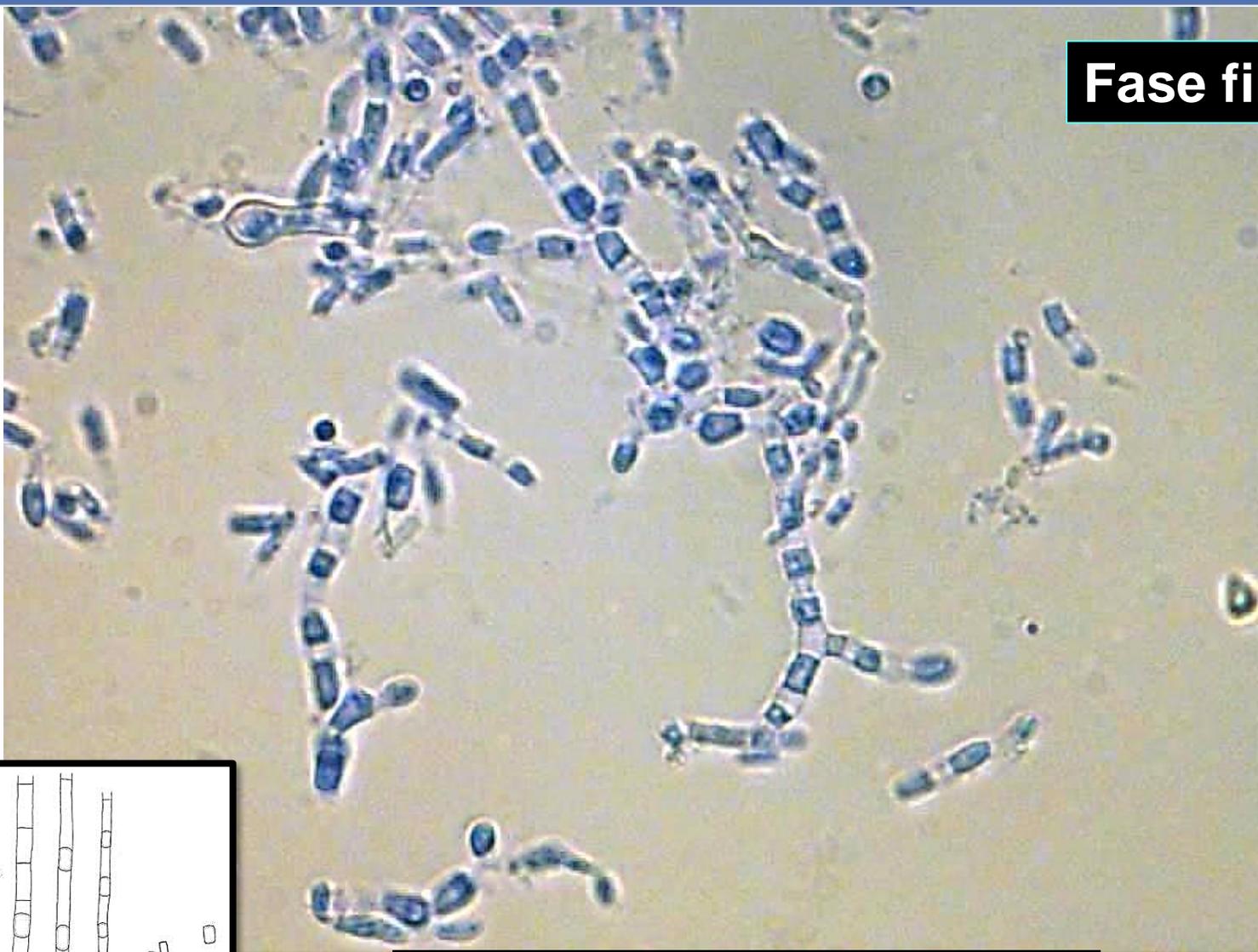
2 o 3 tubi ad ogni temperatura

Tra 4-5 giorni a
più di 30 giorni

Caratteristiche:

Colonie bianco-grigie sul retro del colore crema

Fase filamentosa



Micromorfologia

Fase saprofita:

Ife fertili che crescono ad angolo retto e producono Chlamydo-arthrochoidia ialina di una cellula sotto forma di barilotto di pareti lisce e spesse che si alternano a celle interruttori automatici vuoti. (Elementi infettivi)

T° : 25-28°C y 35-37°C



Fase filamentosa

Alto rischio in laboratorio



Le colture di questi funghi rappresentano un grave rischio biologico per il personale di laboratorio e devono essere maneggiate con estrema cautela in una cappa adatta alla manipolazione di agenti patogeni.



la coltura deve essere manipolata in una cappa di biosicurezza di classe II tipo B2

Coccidioides – fungo dimorfico

Fase saprofita

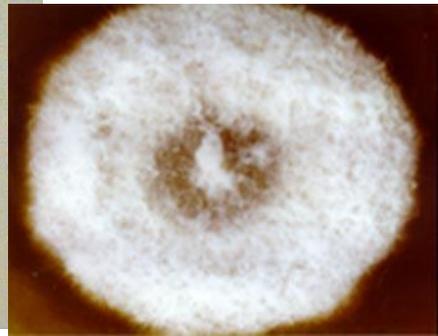
T° : 25-28°C

T°: 35-37°C

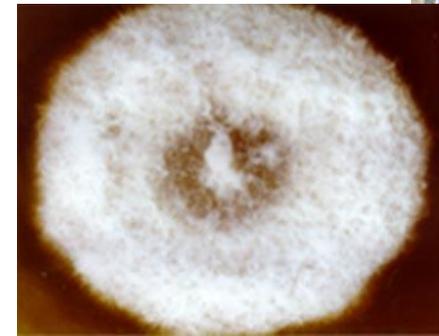
Fase parassitaria

ambiente

campione clinico



coltura



Confronto delle strutture

Coccidioides – Rhinosporidium – Emmonsia

Coccidioides

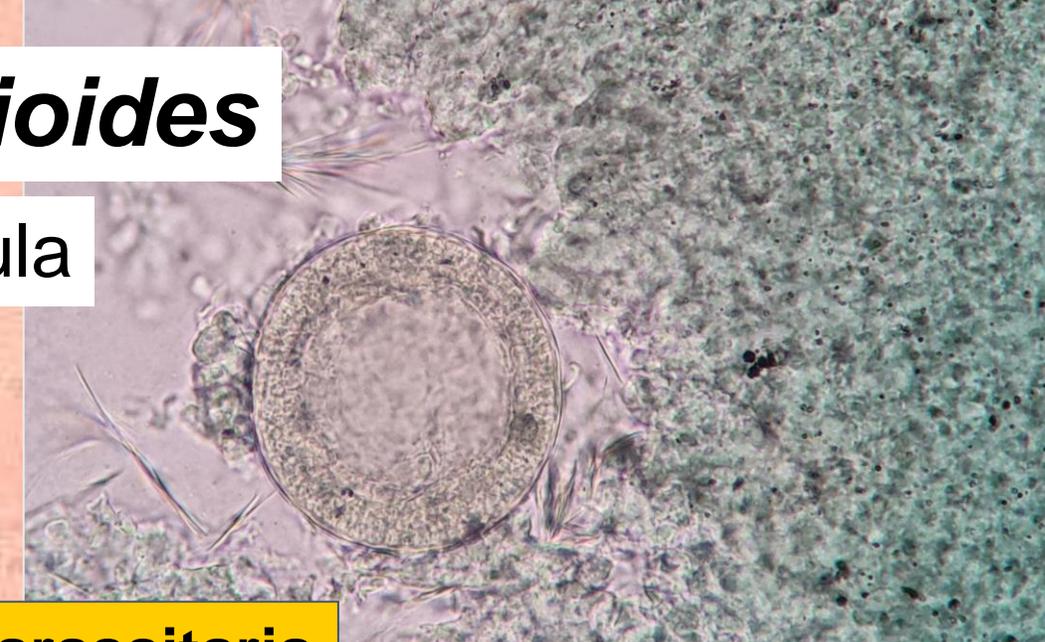
sferula

Fase parassitaria

Esame diretto

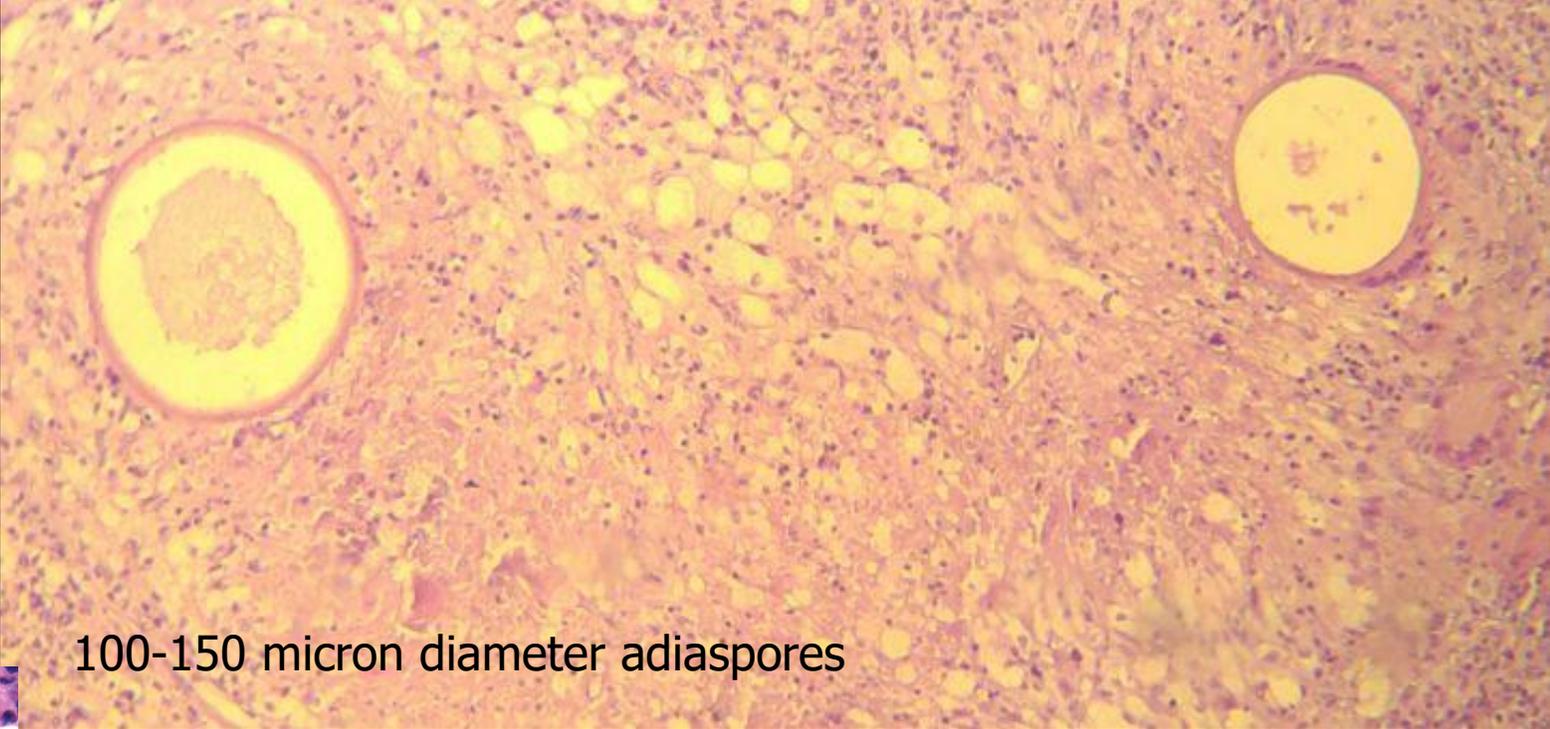
Blue di lattofenolo

Da 20 a 80 μ di diametro. Parete spessa,
con endospore all'interno

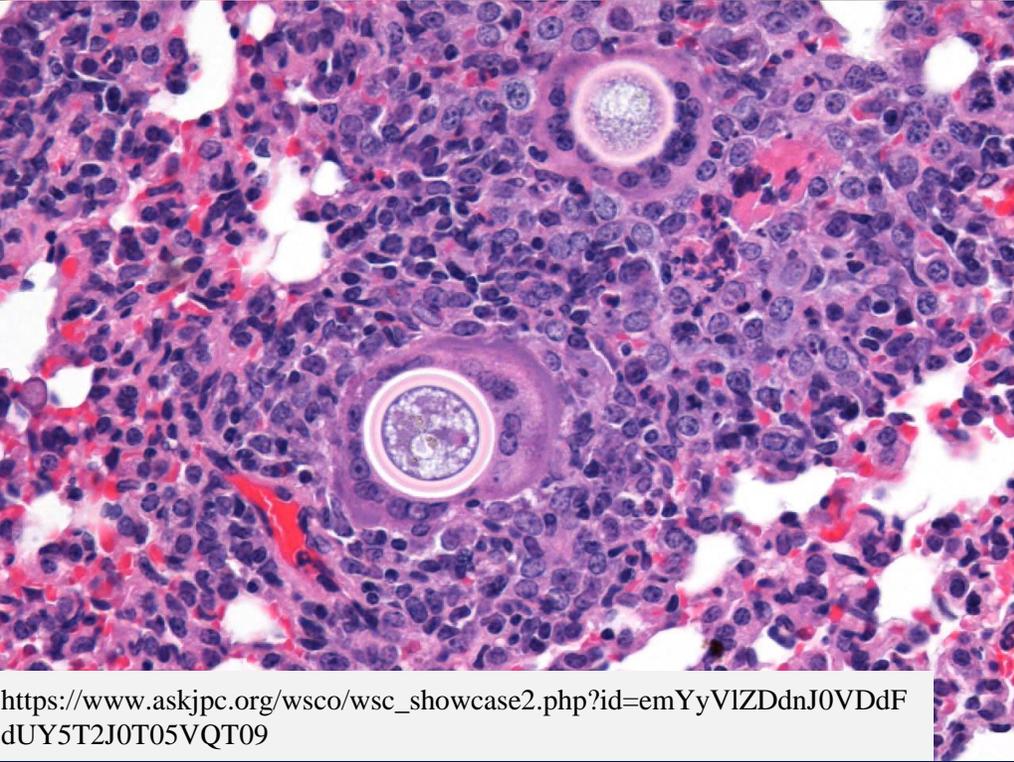


Emmonsia

adiaspora



100-150 micron diameter adiaspores



Adiaspora

Struttura rotonda con parete trilaminare di 20-30 micron di spessore.

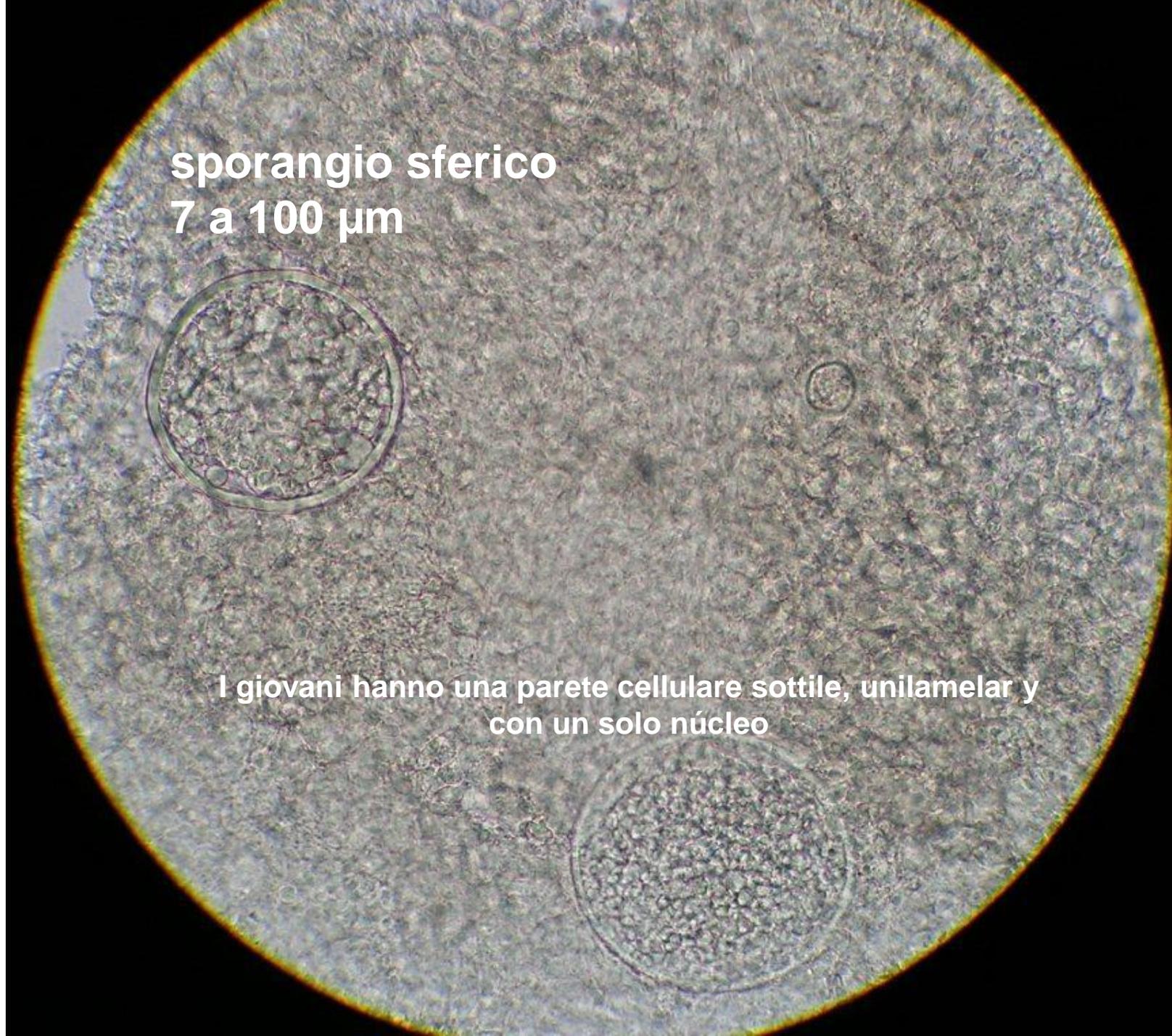
Strato esterno basofilo

Strato intermedio eosinofilo

Strato interno pallido.

Centro interno basofilo granulare con l'aspetto "a nido d'ape" del citoplasma

Rhinosporidium seeberi
sporangio



sporangio sferico
7 a 100 μm

**I giovani hanno una parete cellulare sottile, unilamellar y
con un solo núcleo**

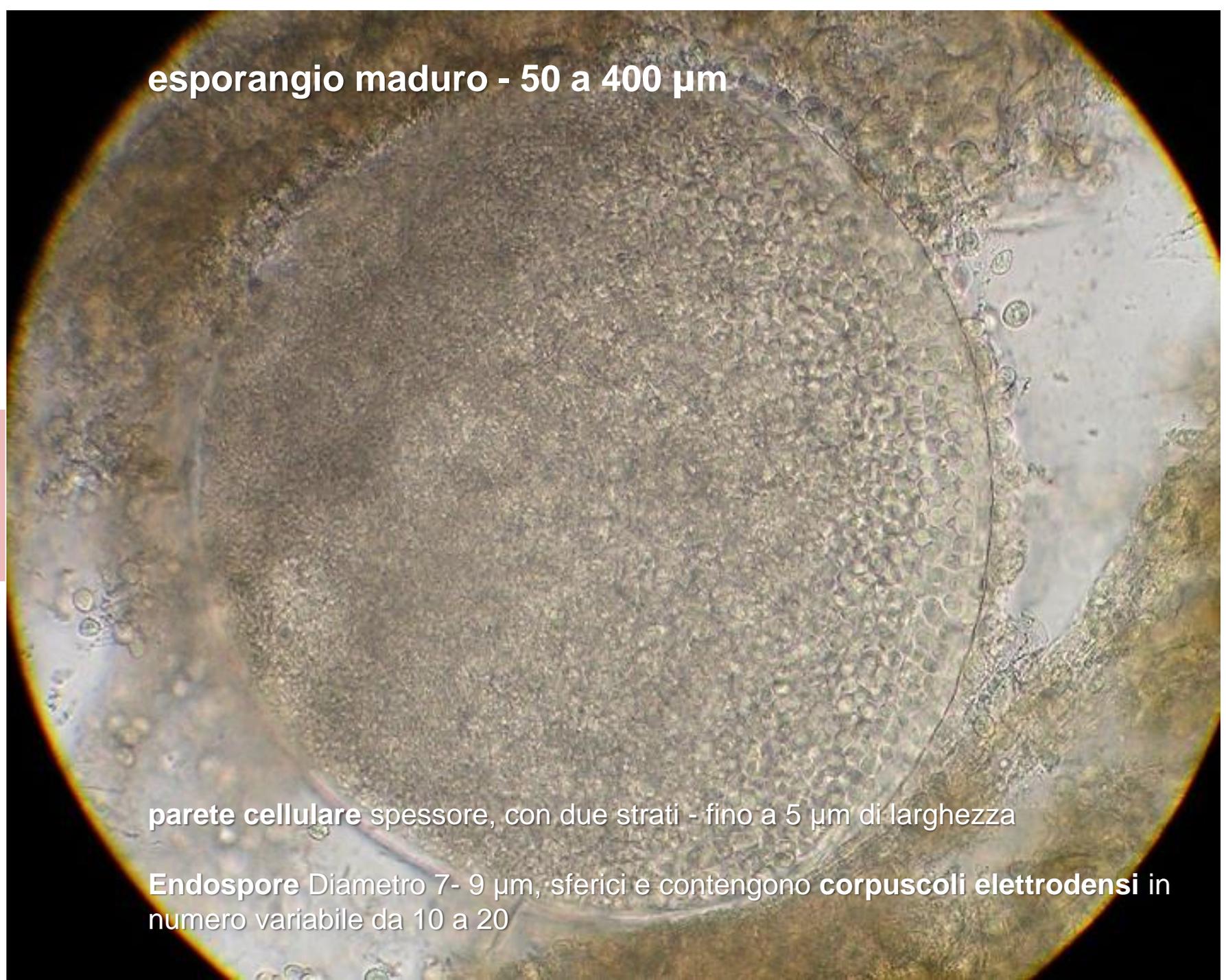
Rhinosporidium seeberi

esporangio maturo - 50 a 400 μm

Ogni sporangio
maturo contiene tra
16000 e 20000
endospore

parete cellulare spessore, con due strati - fino a 5 μm di larghezza

Endospore Diametro 7- 9 μm , sferici e contengono **corpuscoli elettrodensi** in numero variabile da 10 a 20



WHO fungal priority pathogens list (WHO FPPL)

© World Health Organization 2022

Il processo di prioritizzazione si è concentrato sui patogeni fungini che possono causare infezioni fungine sistemiche acute e subacute invasive, per i quali esiste una resistenza ai farmaci o altre sfide di trattamento e gestione.

<https://www.who.int/publications/i/item/9789240060241>

**WHO fungal priority
pathogens list to guide
research, development and
public health action**

Table 3. WHO fungal priority pathogens list

Critical group	High group	Medium group
 <i>Cryptococcus neoformans</i>	 <i>Nakaseomyces glabrata</i> (<i>Candida glabrata</i>)	 <i>Scedosporium</i> spp.
 <i>Candida auris</i>	 <i>Histoplasma</i> spp.	 <i>Lomentospora prolificans</i>
 <i>Aspergillus fumigatus</i>	 Eumycetoma causative agents	 <i>Coccidioides</i> spp.
 <i>Candida albicans</i>	 Mucorales	 <i>Pichia kudriavzevii</i> (<i>Candida krusei</i>)
	 <i>Fusarium</i> spp.	 <i>Cryptococcus gattii</i>
	 <i>Candida tropicalis</i>	 <i>Talaromyces marneffeii</i>
	 <i>Candida parapsilosis</i>	 <i>Pneumocystis jirovecii</i>
		 <i>Paracoccidioides</i> spp.



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL NORDESTE



MUCHAS GRACIAS!!

Gustavo Giusiano

gustavogiusiano@yahoo.com.ar
gusianogustavo@gmail.com



+54 9 362 4546281