
DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL MICOZELOR

40.1. DATE GENERALE

40.1.1. O minidefiniție

Fungii (lat. *fungus* = ciupercă) sau micetele (gr. *mykes* = ciupercă) sunt organisme multinucleate, cu nuclee de tip eucariot dispersați într-un cenocit (gr. *koinos* = comun, masă citoplasmică continuă, multinucleată) micelial lipsit de pigmenți fotosintetici, delimitat de o membrană bogată în steroli și acoperit cu un perete celular polizaharidic (hemiceluloze, chitină).

40.1.2. Repere taxonomice

Alături de bine cunoscutele ciuperci, fungii reunesc și microorganisme: mucegaiurile și levurile.

Clasificarea și identificarea fungilor se bazează în principal pe morfologia și modul lor de reproducere. Activitatea biochimică este studiată mai ales pentru identificarea levurilor.

40.1.2.1. Morfologia fungilor microscopici

Mucegaiurile sunt constituite din filamente ramificate numite *hife*. Cele mai multe mucegaiuri au hife septate prin pereți transversali. Fragmentarea hifelor în lanț de celule este numai aparentă, pentru că, septurile fiind perforate, întregul organism rămâne un cenocit. Prin creștere și ramificare hifele se întretes într-un *miceliu* (figura 40). Miceliul e constituit din două părți: *miceliul vegetativ*, care crește în substratul de unde absoarbe substanțe nutritive, și *miceliul aerian*, care crește erect deasupra substratului și produce *organe de fructificare purtătoare de spori caracteristici*. Diametrul hifelor variază, în funcție de specie, între 1—2 și 10—20 μm , iar lungimea lor variază larg, în funcție de condițiile creșterii. Coloniile mucegaiurilor sunt mase miceliene păsloase, pufoase, care, după dezvoltarea sporilor, se pot pigmența.

În ciuda aspectului microscopic asemănător, mucegaiurile nu sunt înrudite cu actinomicetele (vezi capitolul 41), care sunt bacterii grampozitive filamentoase, pseudo-miceliale, cu structură celulară și sensibilitate la diferite antibiotice.

Levurile sunt celule ovale sau rotunde cu dimensiuni medii de 2,5—6 μm . Prin înmugurire formează celule fiice, care, când se alungesc și rămân înălțuite, pot lua aspect de *pseudohife* (figura 40.2). Pe medii de cultură formează colonii opace, cremoase.

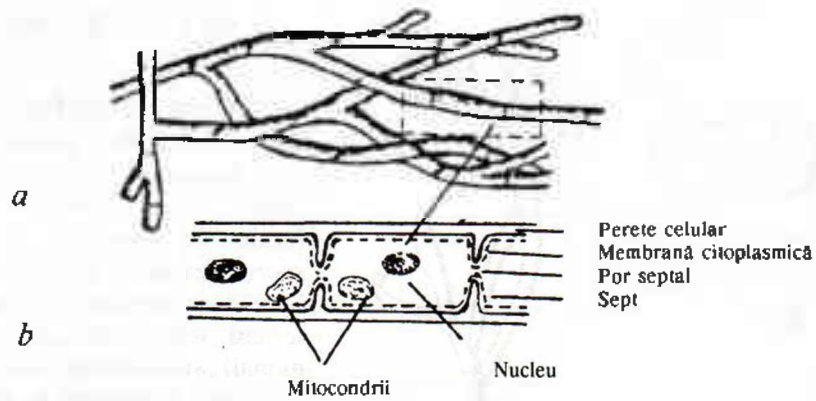


Fig. 40.1 Miceliu cu hife septate (a); detaliu mărit al hifei din cartuş (b)



Fig. 40.2. O levură, *Candida albicans*, în depozitul membranos de la un pacient cu mîrgăritărel (1000X). Observați levuri înmugurite și pseudohife

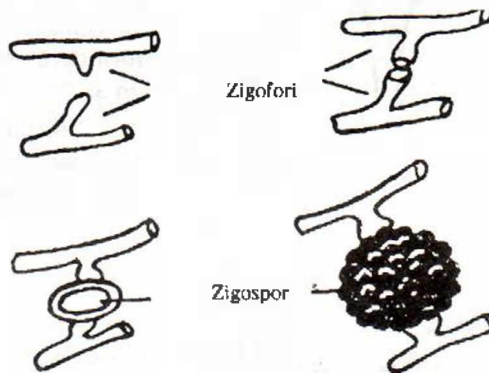


Fig. 40.3. Formarea unui zigospor

de pseudohife (figura 40.2). Pe medii de cultură formează colonii opace, cremoase.

Fungii dimorfi în țesuturile gazdei sau în culturi incubate la 37°C se dezvoltă ca levuri (faza tisulară sau parazitară), iar în culturi incubate la 20–26°C sau în sol au dezvoltare miceliană (faza saprofită). Unii fungi patogeni sunt fungi dimorfi; pentru identificarea lor este esențial să demonstrăm conversia de la o fază la alta.

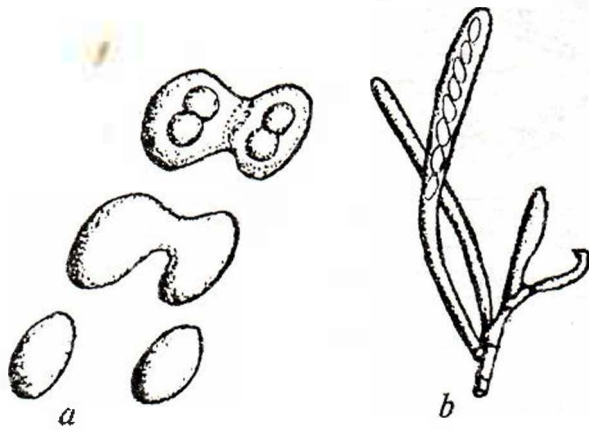


Fig. 40.4. Formarea ascosporilor: a — stadii succesive ale conjugării și formării ascosporilor la o levură; în final a apărut o ască cu 4 ascospori; b — ască matură cu 8 ascospori la un fung filamentos

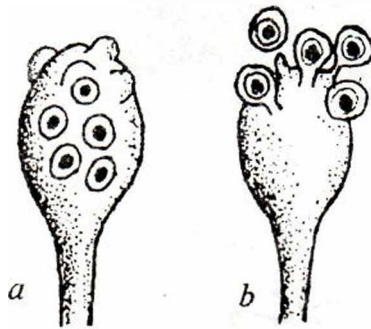


Fig. 40.5. Formarea bazidiosporilor: a — bazidium imatur cu nuclee sporale în migrare; b — bazidiospori maturi înmuguriți pe suprafața unui bazidium

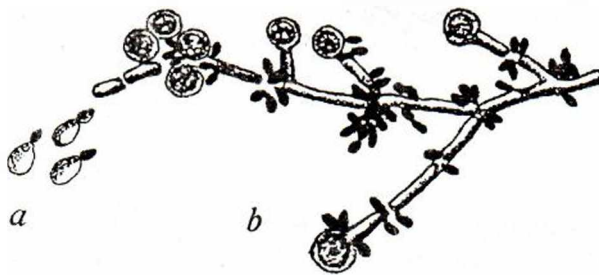


Fig. 40.6. *Candida albicans*: a — celule levurice cu blastospori; b — pseudohife cu blastospori și chlamidospori

40.1.2.2. Reproducerea fungilor

Reproducerea fungilor se face sexuat și asexuat. La *fungii imperfecti* înmulțirea sexuată nu a fost (încă) demonstrată. În ambele forme de înmulțire a fungilor sporularea joacă un rol important. Spre deosebire de endosporii bacterieni (cu funcție de rezistență numai), sporii fungici sunt forme de înmulțire, propagare și, numai unii dintre ei, de rezistență.

Reproducerea sexuată. Sporii sexuați se produc prin fuziunea a două hife sau levuri, urmată de meioză. Fungii cu interes medical produc trei tipuri de spori sexuați: zigospori, ascospori și bazidiospori.

Zigosporii sunt produși de *zigomicete*: vârfulurile a două hife vecine fuzionează și formează spori mari cu perete gros (figura 40.3).

Ascosporii sunt produși de *ascomicete*: fuziunea a două celule duce la formarea unui organ specializat, numit *ască*, în care se formează 4—8 ascospori (figura 40.4).

Bazidiosporii sunt produși de *bazidiomicete*: fuziunea celulelor duce la formarea unui organ măciucat, numit *bazidium*, unde se formează 4 nuclee care migrează și înmuguresc pe suprafața organului pentru a forma tot atâția bazidiospori (figura 40.5).

Înmulțirea prin simpla fragmentare a hifelor nu prezintă importanță pentru clasificarea fungilor.

Reproducerea asexuată. Sporii asexuați apar direct din celulele hifale sau levurice (blastosporii, chlamidosporii și artrosporii) sau în organe specializate de fructificare

(sporangiospori, conidii).

Blastosporii apar prin înmugurirea levurilor, a unui pseudomiceliu sau miceliu (figura 40.6,a). Separați de celula parentală, se dezvoltă de sine stătător.

Chlamidosporii sunt spori rezistenți cu perete gros, formați prin creșterea și rotunjirea unor celule hifale (figura 40.6,b). Chlamidosporii supraviețuiesc după ce restul miceliului moare și se dezintegrează.

Artrosporii sunt spori rezistenți cu perete gros și aspect cilindric sau în butoi, formați prin segmentarea și dezarticularea în celule separate a unui filament dintr-un miceliu septat (figura 40.7).

Sporangiosporii se formează în interiorul unui sac, numit *sporangiu*, purtat în vârful unui filament septat, numit *sporangiofor* (figura 40.8).

Conidiile sunt spori asexuați formați pe *conidiofori*. Unele sunt mici, *microconidiile*, unicelulare, rotunde, eliptice sau piriforme, sesile sau pedunculat. Altele sunt mari, *macroconidiile*, obișnuit septate, măciucate sau piriforme (figurile 40.16, 40.20, 40.22).

Sporii sexuați ai fungilor și, dintre sporii asexuați, chlamidosporii și artrosporii sunt rezistenți la condiții adverse de mediu.

Astfel pe baza mecanismului și aspectelor morfologice ale sporulării de reținut sunt patru diviziuni cu interes medical ale regnului *Fungi*: *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Zygomycota* și *Deuteromycota* (vezi tabelul 40.1). Diviziunea *Deuteromycota*, care reunește fungii imperfecti, nu este o grupare filogenetică naturală, ci una artificială.

40.1.3. Habitat

Fungii sunt organisme saprofite larg răspândite în natură, unde îi găsim în sol, în materialele biodegradabile (vegetale, furaje, cereale, lemn, dejecte), pe învelișurile omului și animalelor. Specii de *Candida* sunt normal găzduite în gură, orofaringe, colon, vagin. Unii fungi dermatofiti sunt antropofili, dar specii zoofile sau geofile pot infecta ocazional omul.

Dintre miile de specii ale fungilor numai cca 100 determină îmbolnăviri (tabelul 40.1).

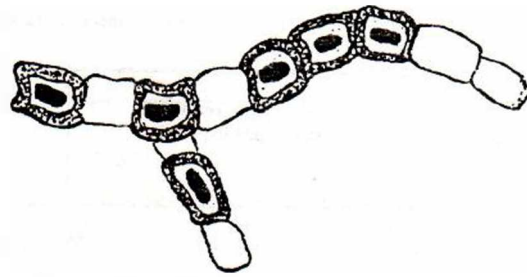


Fig. 40.7. Miceliu septat. Prin segmentarea hifelor apar artrosporii cu perete gros, alternând cu celule goale

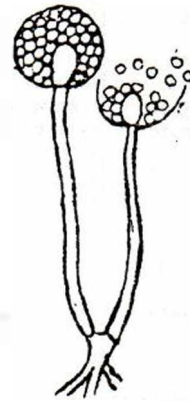


Fig. 40.8. *Rhizopus*, un zigomicet. Observați sporangioforul cu sporangiu și sporangiospori

În nomenclatura fungilor sufixele *-mycota* desemnează diviziunea, *-mycotina* subdiviziunea, *-mycetes* clasa, *-mycetidae* subclasa, *-ales* ordinul, *-aceae* familia.

Tabelul 40.1. Fungi microscopici cu importanță medicală: taxonomia, infecții determinate și diagnosticul lor

Diviziuni genuri/specii	Infecții determinate/factori predispozanți	Prelevate indicate	Izolare-identificare	Diagnostic serologic
<i>Ascomycotina</i>				
<i>Saccharomyces</i>	Levuri utilizate în: panificație, fabricarea berei. La <i>diabetici</i> poate determina: mărghăritărele, vulvovaginite, colonizări și infecții urinare	Exsudat de la nivelul mucoasei lezate; urină	Geloză-sânge sau Sabouraud + antibiotice. Levuri înmugurite. Formează asce cu 4 ascospori	—
<i>Microsporium (Nannizzia*)</i> <i>Trichophyton (Arthroderma*)</i>	Infecții primare contagioase favorizate de promiscuitate și de lipsa igienei corporale. Fungi cheratolitici. Infectează: epiderma (inclusiv stratul granulos), părul (inclusiv foliculul pilos). Tricofitia unghiilor	Scuame epidermice, fire de păr, raclat de pe unghii	Geloză Sabouraud + antibiotice. Caractere de cultură și microscopice	—
<i>Blastomyces</i> ² (<i>Ajelomyces*</i>)	Infecții primare pulmonare cu diseminare hematogenă. Alte porți de intrare (e. g. cutanată) rar implicate	Spută, puroi; sânge, măduvă osoasă	Geloză-sânge și Sabouraud + antibiotice ³ ; incubare la 25° și 37°C. Mediu difazic	ID, RFC
<i>Histoplasma</i> ² (<i>Emmonsiiella*</i>)			Morfologia formei levurice și filamentoase. Inducția formei levurice	RFC, ID, CIE, LA, i.d.r.
<i>Emericella</i> <i>Petriellidium</i>	Eumicetoame consecutive plăgilor înțepate cu așchii de lemn sau spini	Puroi, probe tisulare bioptice	Geloză Sabouraud + antibiotice ² Caractere de cultură și microscopice	---
<i>Basidiomycotina</i>				
<i>Cryptococcus neoformans</i> , (<i>Filobasidiella neoformans*</i>)	Infecții mai frecvent pulmonare, aparente sau inaparente; diseminări hematogene: meningite, abcese. Ocazional, cheratite și uretrite. Factori predispozanți: neoplasme, leucemii, terapie imunosupresivă sau -depresivă, infecția cu HIV. Traumatisme corneene; uretrite postgonococice	Spută, puroi, l. C. R., exsudate	Geloză-sânge și Sabouraud + antibiotice ³ . Caractere microscopice și de cultură. Producere de fenoloxidază	AT, LA IFI

Tabelul 40.1(Continuare)

Zygomycotina				
<p><i>Mucorales:</i></p> <ul style="list-style-type: none"> ■ <i>Abstidia,</i> ■ <i>Mucor,</i> ■ <i>Rhizopus</i> 	<p>Mucormicoze. Infecții acute, necrotice, rapid mortale: nas, sinusuri, orbită, sistem nervos central; gastrointestinale, vasculare; infecții cutanate prin bandaje contaminate. Factori predispozanți: leucemie, acidoză diabetică, denutriție, corticoterapie, plăgi, arsuri</p>	<p>Probe tisulare bioptice sau necroptice</p>	<p>Geloză Sabouraud + antibiotice³. Caractere de cultură și microscopice</p>	<p>ID</p>
<p><i>Entomophthorales:</i></p> <ul style="list-style-type: none"> ■ <i>Basidiobolus</i> ■ <i>Conidiobolus</i> 	<p>Entomoftromicoze: la copilul mic infecții subcutanate ale membrilor; la adult infecții nazale. Factori predispozanți: vezi la mucormicoze</p>	<p>Probe tisulare bioptice sau necroptice</p>	<p>Geloză Sabouraud + antibiotice³. Caractere de cultură și microscopice</p>	<p>ID</p>
Deuteromycotina				
<p><i>Blastomycetidae</i> (levuri imperfecte)</p>	<p>Infecții localizate la gazda imuno-reactivă: tegument, unghii, mucoase, infecții urinare; cheratite. Factori favorizanți: diabet, tratament cu antibiotice, contraceptive orale, sarcină</p>	<p>Scuame, raclatul unghiilor; exsudate, urină</p>	<p>Geloză-sânge sau Sabouraud + antibiotice³. Bulion. Levuri.</p>	<p>ID, CIE, IA</p>
<p><i>Candida</i></p>	<p>Infecții sistemice: endocardite, meningite etc. la gazda imuno-compromisă (infecția cu HIV, neoplazii, leucemie, corticoterapie, tratament citotoxic)</p>	<p>Sânge, I. C. R. (probe repetate); aspirate bronșice necontaminate</p>	<p><i>C.albicans</i> se identifică prin testul de filamentare în ser și formare de chlamidospori. Pentru alte specii este necesară auxanograma</p>	
<p><i>Malassezia furfur</i></p>	<p>Pitiriazis verzicolor, o micoză cutanată superficială. Factori predispozanți: transpirație excesivă</p>	<p>Scuame epidermice</p>	<p>Geloză Sabouraud + cicloheximidă sub strat de ulei de măsline. Levuri cu blastospori. Unele filamentează</p>	<p>—</p>
<i>Hyphomycetidae</i>				
<p><i>Coccidioides</i>² <i>Paracoccidioides</i></p>	<p>Infecții primare pulmonare cu diseminare hematogenă. Alte porți de intrare (e.g. cutanată) rar implicate</p>	<p>Spută, puroi</p>	<p>Geloză-sânge și Sabouraud + antibiotice³ cu incubare la 25 și 37°C. Morfologia formei levurice și filamentoase; patogenitate experimentală</p>	<p>PT, ID, RfC, IA, i.d.r. ID, CIE, RFC</p>

Tabelul 40.1 (Continuare)

<i>Epidermophyton</i>	Fung cheratolitic. Infectează epiderma și unghiile. Infecții primare, contagioase, favorizate de promiscuitate și lipsa igienei corporale	Scuame epidermice, raclatul unghiilor	Geloză Sabouraud + antibiotice. Caractere de cultură și microscopice	—
<i>Aspergillus</i> ⁴ (mai frecvent <i>A. flavus</i>)	Sensibilizări prin contact, inhalare, ingestia de spori, hife și metaboliți ai fungului (e. g. rinite, astm, pneumonite). Infecții cu creștere activă a fungului în țesuturi sau suprafețe (e. g. aspergilomul, aspergiloza «oportunistă») Factori predispozanți: caverne tuberculoase vechi, transplant de organe, neoplasme, leucemii, terapie imunosupresivă. Intoxicații alimentare	Spută, probe tisulare bioptice sau necroptice	Geloză Sabouraud + antibiotice ³ . Caractere de cultură și microscopice	ID, CIE, RFC
<i>Sporotrix schenckii</i> ⁵	Infecții cutaneo-limfatice consecutive ale plăgilor cauzate de înțepături prin așchii de lemn, ghimpi. La gazda imunocompromisă, rar, infecții pulmonare		Geloză Sabouraud + antibiotice cu incubare la 25 și 37°C. Morfologia formei levurice și filamentoase; conversia la forma levurică	AT, LA
<i>Alternaria</i> ⁵	Infecții ale plăgilor cutanate.	Puroi.	Geloză Sabouraud + antibiotice.	ID
<i>Cladosporium</i> ⁵	Infecții ale plăgilor cutanate; abcese cerebrale	Puroi, probe tisulare bioptice	Caractere de cultură și microscopice	
<i>Acremonium</i> <i>Curvularia</i> ⁵ <i>Exophiala</i> ⁵ <i>Fusarium</i> <i>Madurella</i> ș.a.	Eumicetoame consecutive ale plăgilor cauzate de înțepături cu așchii de lemn sau spini	Puroi, probe tisulare bioptice	Geloză Sabouraud + antibiotice ³ . Caractere de cultură și microscopice	—

* Intre paranteze: numele formei sexuate recunoscute.
¹ Abrevieri: AT — aglutinare in tub, CIE — contraimunoelectroforeză, ID — imunodifuzie, i.d.r. — intradermoreacție, IFI — imunofluorescență indirectă, LA — latex-aglutinare, PT — precipitare in tub, RFC — reacție de fixare a complementului.
² Fungi dimorfi.
³ Amestecul selectiv de antibiotice recomandat este: penicilină 20 UI/ml, gentamicină 50 μg/ml, cloramfenicol 50 μg/ml și cicloheximidă 500 μg/ml. *Cryptococcus neoformans*, cele mai multe zigomicete, *Aspergillus* și alți fungi filamentoși sunt foarte sensibili la cicloheximidă. Unele tulpini de *Histoplasma capsulatum* sunt sensibile la concentrațiile mari de cloramfenicol și gentamicină utilizate pentru selecție. De aceea însămânțarea se face și pe medii fără cicloheximidă, iar prelevatele necontaminate se însămânțază numai pe medii fără antibiotic.
⁴ Există specii de *Aspergillus* cu reproducere sexuată recunoscută (e. g. *Aspergillus nidulans* a cărui formă sexuată se numește *Emericella nidulans*, un ascomicet).
⁵ Familia *Dematiaceae*. Fungi dematiacei formează un pigment brun-măsliniu până la negru in pereții hifelor, ai conidiilor sau ambelor.

40.1.4. Factori de patogenitate

Pușini fungi sunt patogeni primari (e. g. *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis* ș. a.). Majoritatea speciilor care imbolnăvesc omul sunt organisme condiționat patogene (oportuniste). Factorii de patogenitate ai acestor microorganisme variază cu specia:

- Capacitatea de a supraviețui și multiplica în macrofagele normale (e. g. *Histoplasma*, *Blastomyces*).
- Capacitatea de a se multiplica pe seama cheratinei din epidermă și fanere (e. g. fungii dermatofiți).
- Capacitatea de a se înmulți când pătrund în țesuturi lipsite de apărare antiinfecțioasă sau cu apărarea antiinfecțioasă compromisă (e. g. variași fungi oportuniști).
- Capacitatea sensibilizantă a fungilor imprimă particularități formei clinice a unor micoze (e. g. candidoze, dermatofitii) sau determină pneumonite alergice după inhalarea sporilor (e. g. *Aspergillus* sp).
- Elaborare de micotoxine: e. g. aflatoxinele produse de *Aspergillus flavus* sau alte specii de *Aspergillus*.

40.1.5. Micoze și receptivitatea la micoze

Deosebim situația gazdei normoreactive și a gazdei cu apărarea antimicrobiană compromisă.

Gazda normoreactivă. Micete din microflora normală a organismului, în condiții de disbioză, pot determina micoze superficiale, localizate, ale tegumentului sau mucoaselor (e. g. *Malassezia furfur*, *Candida albicans*).

Fungii dermatofiți (*Microsporum*, *Trichophyton*, *Epidermophyton*) determină dermatofiți cu variate localizări, mai ales în condiții precare de igienă corporală. În antichitate cauza acestor leziuni era considerată larvele unor molii, insecte pe care romanii le numeau *Tinea*. În acest concept își are originea denumirea dermatofitiilor, preferată de mulți dermatologi: *tinea pedis* (a piciorului), *tinea corporis* (a pielii glabre), *tinea cruris* (a regiunii inghinale), *tinea unguium* (a unghiilor) sau pilomicoze ca *tinea capitis* (a scalpului), *tinea barbae* (a bărbii). *Favusul* este o pilomicoză determinată de *Trichophyton schoenleinii*, care invadează epiderma mai profund și, în lipsa tratamentului, duce la alopecie.

Receptivitatea la dermatofitiile determinate de *Microsporum* dispare la pubertate.

Fungii dimorfi patogeni (*Histoplasma*, *Blastomyces*, *Coccidioides*) determină infecții primare, uzual aerogene, care evoluează inaparent sau ca infecții respiratorii diseminate sistemic cu leziuni granulomatoase în variate organe. Chiar după vindecarea acestor leziuni, infecția rămâne latentă.

Micetoamele sunt infecții cronice locale, progresiv distructive ale pielii, țesutului subcutanat, musculoaponevrotic și osos determinate de fungi (*eumicetoame*) sau de *actinomicete* (*actinomicetoame* — vezi capitolul 41), care pătrund printr-o plagă (mai frecvent a piciorului sau mâinii determinată de spini sau așchii de lemn). Clinic se manifestă ca o tumefiere care conține granuloame supurative cu multiple fistule, prin care se scurge puroi cu granule micotice de culori variate (colonii tisulare ale agentului etiologic). Eumicetoame determină unele ascomicete ca *Emericella*, *Petridium* sau deuteromicete ca *Madurella* ș. a. (tabelul 40.1).

Gazda cu apărarea antiinfecțioasă compromisă în diferite grade. Diabetul zaharat,

prin prezența glucozei în secreții și excrete, favorizează infecția mucoaselor nu numai cu *Candida albicans*, ci și cu levuri uzual nepatogene cum sunt specii de *Saccharomyces* (drojdia de panificație, de bere).

Plăgile înțepate cu așchii vegetale sau spini deschid calea cheratitelor micotice și micozelor subcutanate (limfadenite, eumicetoame).

Imunodeficiențele celulare (medicație imunosupresivă, infecție cu virusul imunodeficienței umane) determină reactivarea și evoluția fatală a histoplasmozei, blastomicozei, coccidioidomicozei și favorizează *infecțiile sistemice cu fungi oportuniști* (*Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, mucegaiuri).

40.2. INVESTIGAȚIA ETIOLOGICĂ A INFECȚIILOR CU LEVURI

Mai frecvente sunt candidozele determinate de *C.albicans*. La gazda imunocompromisă pot evolua infecții sistemice determinate de *C.albicans* (ocasional alte specii) și de *Cryptococcus neoformans*.

40.2.1. Diagnosticul microbiologic

40.2.1.1. Prelevate patologice

În funcție de localizarea infecției se prelevă:

1. În *infecțiile superficiale* (în majoritate candidoze, dar cheratite și uretrite cu *Cryptococcus neoformans* sunt posibile):

- tamponare din depozitul leziunilor de mărgăritărel de pe mucoasa bucală, orofaringiană, vaginală;

- raclat din leziunile cutanate (mai frecvent intertrigo — inflamația pliurilor cutanate);

- raclat din leziunile corneene;

- spută sau aspirat bronșic transtraheal ori bronhoscopic (necontaminat);

- urină (probe curate prinse în zbor din jet mijlociu sau, mai indicat, aspiratul suprapubian pentru a elimina contaminarea probei cu levuri comensale uretrovulvare);

- exsudat uretral;

- fecale.

2. În *infecții sistemice*:

- hemoculturi repetate în endocarditele subacute;

- lichid cefalorahidian (probe repetate de minimum 5 ml);

- probe tisulare bioptice sau necroptice.

40.2.1.2. Microscopia directă

Microscopia directă orientează diagnosticul către infecția cu levuri și, prin aceasta, tratamentul antimicrobian. Semnificația clinică a levurilor observate în prelevate necontaminate este certă; a celor observate în prelevate contaminate trebuie însă atent evaluată.

Prelevatele fluide se *examinează ca atare între lamă și lamelă*. Prelevatele vâscoase (spută, fecale), raclatul epidermic sau al unghiilor, al secțiunii tisulare fine, trebuie în prealabil clarificate. Pentru aceasta se suspensionează proba pe lama de microscop într-o picătură din soluția 10—20% KOH (în raport cu opacitatea probei) cu 10% glicerol. Se

acoperă cu lamela, pe care o presăm ușor, pentru a obține o peliculă cu grosime uniformă și se lasă preparatul 15—20 minute în cameră umedă pentru clarificare. La nevoie (preparate prea opace) se încălzește ușor lama, evitând fierberea, și se presează lamela pentru o mai bună dispersie a elementelor.

Examenul probelor (sedimentul L. C. R., exsudatul uretral, spută omogenizată) colorate negativ cu tuș de India depistează și identifică rapid *Cryptococcus neoformans*. Într-o mică picătură de exsudat depusă pe lama de microscop se omogenizează o ansă cu tuș de India (tușul se prelevă cu anșa rece, pentru a nu altera stabilitatea suspensiei particulelor de carbon din tuș). Se acoperă cu o lamelă și se examinează cu obiectiv uscat.

Frotiurile colorate Gram sau Giemsa sunt rar necesare.

Se urmărește:

- Prezența levurilor incapsulate. *C. neoformans* apare ca levuri rotunde, inmugurite, inconjurate cu o capsulă enormă (figura 40.9).
- Prezența sau absența pseudohifelor. *C. albicans* în leziunile de mărgăritărel apare cel mai frecvent sub formă de pseudohife (din cauza creșterii submerse între celulele epiteliale), pe lângă care se observă levuri ovale cu blastospori (figura 40.2).
- Dimensiunea și forma levurilor, a blastosporilor și modul lor de atașare la celula mamă.

40.2.1.3. Izolarea și identificarea

Etapa I. Se epuizează probele necontaminate pe câte o placă cu geloză-sânge și cu geloză Sabouraud glucozată 2—4%. Se utilizează pentru prelevatele contaminate aceleași medii cu adaos selectiv de antibiotice (vezi nota 3 de la tabelul 40.1). Se incubează culturile peste noapte la 37°C. Se însămânțează probele de urină cantitativ: 0,1 ml din diluțiile 10⁻² și 10⁻¹ ale probei epuizați pe câte o placă cu geloză Sabouraud.

Etapa II. Se urmărește apariția coloniilor fine, albe sau bej, cremoase, care degajă o aromă caracteristică de drojdie (aluat dospit). După 3—5 zile ajung până la 2 mm diametru. Coloniile de *Cryptococcus neoformans*, inițial albe, strălucitoare, mucoase, devin progresiv maronii, până la brun.

Se verifică microscopic prezența levurilor în coloniile suspecte și se repică 2—3 colonii pe pantă de geloză Sabouraud, pentru a obține cultura pură stock necesară identificării.

Etapa III. Se identifică levura izolată pe baza următoarelor caractere:

- De cultivare (vezi mai sus).
- Microscopice. *Candida* apare sub formă de levuri ovale cu blastospori în creșterea superficială și sub formă de pseudohife când crește în profunzimea mediului.

Testul de filamentare în ser. *C. albicans* și *C. stellatoidea* sunt singurele specii ale căror blastospori din cultura de 24 ore formează tubi germinativi (filamentează) după incubare de 2—4 ore la 37°C în ser sangvin sau albuș de ou (figura 40.10).

Formarea de chlamidospori. *C. albicans* însămânțată prin zgărietură în profunzimea unei plăci de geloză cu extract de porumb și incubată câteva zile la 25°C crește sub formă

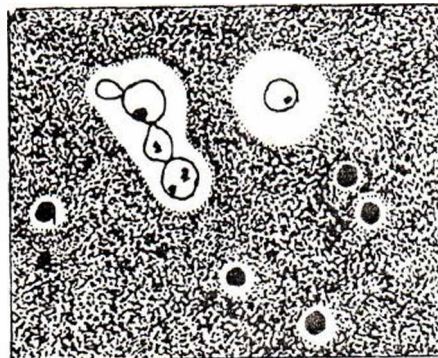


Fig. 40.9. *Cryptococcus neoformans* este o levură cu capsulă polizaharidică enormă. Colorație negativă cu tuș de India

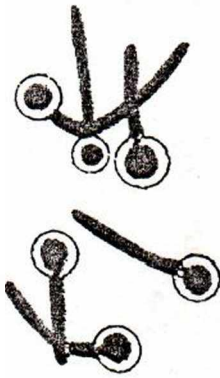


Fig. 40.10. *Candida albicans*: filamentarea (micelizarea) blastospo- rilor in ser sangvin

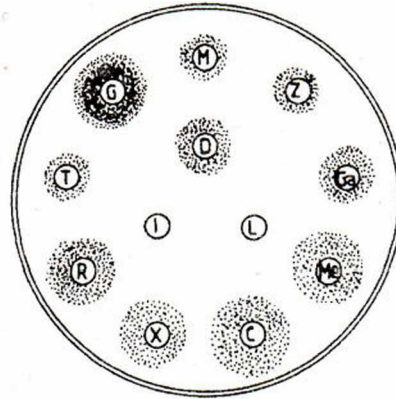


Fig. 40.11. Auxanograma pentru *Candida guilliermondii*. Observați: creșterea (asimilarea) in jurul rondelilor cu glucoză (G), maltoză (M), zaharoză (Z), galactoză (Ga), melibioză (Me), celobioză (C), xiloză (X), rafinoză (R), trehaloză (T), dulcitol (D); absența creșterii (lipsa asimilării) in jurul rondelilor cu lactoză (L), inozitol (I)

de pseudohife cu numeroși blastospori la joncțiunea celulelor și cu chlamidospori la extremitatea liberă a celulelor (figura 40.6).

Pe mediile de izolare *Saccharomyces cerevisiae* formează levuri sferice sau ovale, inmugurite. Cultivat pe geloză cu extract de malț generează ascospori, care, pe frotiurile colorate Ziehl-Neelsen, apar acidorezistenți în asce neacidorezistente: 4 ascospori/ască.

■ **Biochimice.** Alte specii decât *Candida albicans* sunt diferențiate pe baza *spectrului de asimilare și fermentare a carbohidraților*. Auxanograma testează spectrul de asimilare a carbohidraților ca unică sursă de carbon: pe o placă cu mediu minimal sintetic se însămânțează în pânză tulpina testată, apoi se depun rondelile cu câte un zahăr. Levura crește numai în jurul carbohidraților pe care îi asimilează (figura 40.11).

Cryptococcus neoformans este rapid diferențiat de speciile nepatogene ale genului prin capacitatea sa de a produce fenoxidază.

■ **Structura antigenică.** Prin reacții de aglutinare cu seruri adsorbite, tulpinile de *C. albicans* sunt diferențiate în două serotipuri: A și B, iar cele de *C. neoformans* în patru: A, B, C și D.

Etapa IV. Se analizează, se interpretează rezultatele și se redactează buletinul de analiză. *C. albicans* și *Saccharomyces cerevisiae* semnifică infecția căilor urinare numai izolate în concentrații de peste 10^4 UFC/ml urină.

40.2.2. Diagnosticul serologic

În candidozele sistemice latex-aglutinarea (LA), imunodifuzia (ID) și contraimunoelectroforeza (CIE) cu un extract polizaharidic (manan) de *C. albicans* sunt specifice pentru necesitățile clinice. Seroconversia în ID sau CIE și titruri 1:8 în LA confirmă infecția sistemică. RFC este prea puțin specifică (reacții pozitive și la persoane normale sau cu candidoze superficiale).

Infecțiile cu *C. neoformans* pot fi diagnosticate fie identificând antigenul polizaharidic capsular în lichidul cefalorahidian, ser, urină prin LA (particule coafate cu anticorpi), fie depistând anticorpul față de antigenul capsular prin aglutinare în tub, LA ori imunofluorescență indirectă. În LA titruri ale anticorpilor de 1:4 sunt sugestive, iar cele 1:8 confirmă criptococoză.

40.2.3. Biopreparate pentru diagnosticul de laborator și antibiotice sau chimioterapice pentru terapia infecțiilor determinate de levuri

- Antigen polizaharidic de *C.albicans* pentru serodiagnostic prin LA, ID sau CIE.
- Antigen polizaharidic capsular de *C.neoformans* pentru serodiagnostic prin LA; suspensii de *C.neoformans* pentru aglutinare în tub sau imunofluorescență indirectă.
- Suspensie de latex sensibilizată cu anticorpi anti-*C.neoformans* pentru depistarea antigenului polizaharidic în umori.
- Nistatină, miconazol, chetoconazol, clotrimazol pentru terapia candidozelor cutaneomucoase.
- Amfotericină B pentru terapia candidozelor sistemice și a infecțiilor cu *C.neoformans*.

40.3. INVESTIGAȚIA ETIOLOGICĂ A DERMATOFITILOR

40.3.1. Diagnosticul microbiologic

40.3.1.1. Prelevate patologice

Se prelevă: scuamele raclate de pe suprafața leziunilor; firele de păr afectate (vezi mai jos), raclatul unghiilor atacate.

Firele de păr invadate de fungii dermatofiți sunt friabile, au aspect prăfos și examinate în camera obscură sub radiație ultravioletă au fluorescență verde strălucitoare în infecția cu *Microsporum* sau *Trichophyton schoenleinii*. Fluorescența este gri-albă sau lipsește în infecția cu alte specii de *Trichophyton*. Rezultatele pozitive sunt concludente, cele negative trebuie confirmate microscopic, pentru că numai perii complet invadați devin fluorescenți. Se smulg cu o pensă firele suspecte.

40.3.1.2. Microscopia directă

Se montează probele între lamă și lamelă în soluție 10–20% KOH (revedi 40.2.1.2.) și se examinează, după clarificare, cu obiectivul uscat 10X și 40X.

În scuame și fragmentele de unghii prezența hifelor ramificate și lanțurilor de artrospori indică diagnosticul de dermatofitie, fără a preciza specia fungului infectant (figura 40.12). Examenul firelor de păr aduce informații mai precise. *Microsporum* formează pe suprafața externă a părului manșoane de spori mici (2–3 μm diametru) cu aspect mozaicat, infecție exotrix (figura 40.13). *T.schoenleinii* și *T.tonsurans* formează hife și lanțuri de spori mari (4–6 μm diametru) în interiorul părului, infecție endotrix. Caracteristic, în infecțiile cu *T.schoenleinii* endotrix apar bule de gaz și arii tubulare goale, care marchează locul hifelor degenerate (figura 40.14). Alte specii de *Trichophyton* formează ectotrix șiruri paralele de spori.

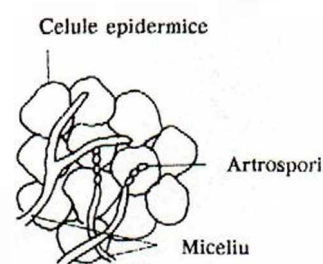


Fig. 40.12. Celule epidermice invadate de un fung dermatofit

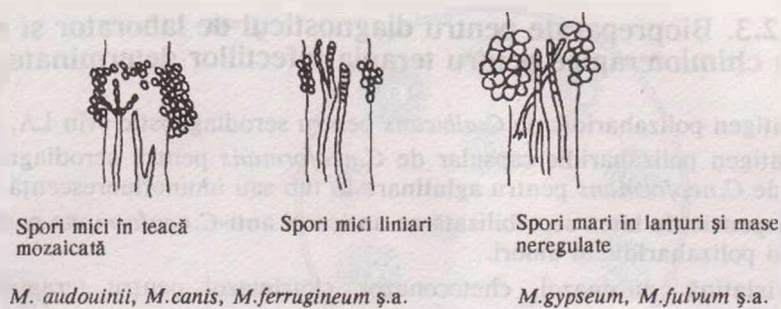


Fig. 40.13. Fire de păr atacate de *Microsporium*: teci de spori ectotrix

40.3.1.3. Izolarea și identificarea

Se însămânțează probele prin depunere sau înțepare în pantă de geloză Sabouraud cu antibiotice (vezi nota 3, tabelul 40.1) și se incubează culturile 1—3 săptămâni la 25°C.

Se identifică izolatele pe baza caracterelor de cultură și microscopice:

Microsporium audouinii, specie antropofilă, cultivă mai lent decât alte specii ale genului. După 12—21 zile, pe mediul Sabouraud apar colonii, care, la maturitate, sunt rotunde, fin pufoase, cu buton central, pigmentat în roz, de la care pleacă spre periferie proeminențe radiale (figura 40.15,a). Macroconidii, subțiri și distorsionate, apar rar. În culturi bătrâne se observă chlamidospori. Specia zoofilă *M. canis* cultivă după 5—7 zile, iar coloniile sunt

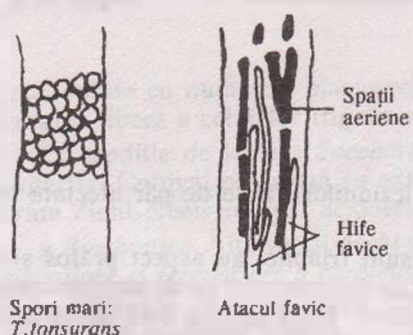


Fig. 40.14. Fire de păr atacate de *Trichophyton*

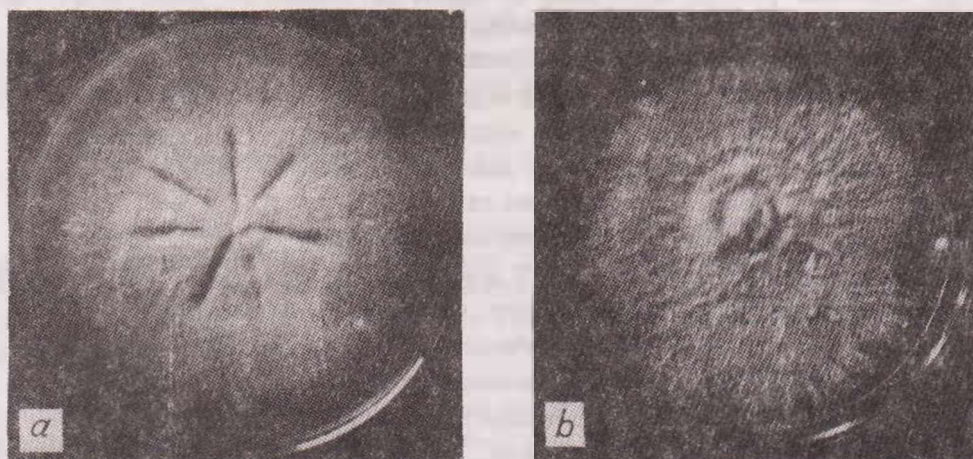


Fig. 40.15. Colonii de *Microsporium*: a — *M. audouinii*; b — *M. gypseum*

pufoase cu reversul pigmentat în galben-portocaliu. Macroconidiile sunt numeroase cu pereții groși și cu vârful frecvent incurbat (figura 40.16,a), iar specia geofilă, *M.gypseum*, cultivă și mai repede, în 3—6 zile, și formează colonii plate cu aspect prăfuit (figura 40.15,b); macroconidiile numeroase au perete mai fin, dar rugos (figura 40.16,b).

Trichophyton schoenleinii cultivă relativ lent (10—14 zile) și formează pe

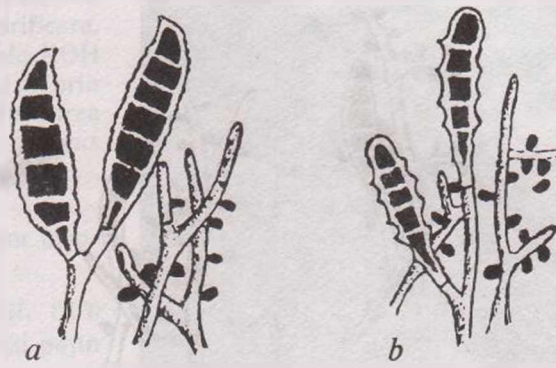


Fig. 40.16. *Microsporium*, micro- și macroconidii: a — *M.canis*; b — *M.gypseum*

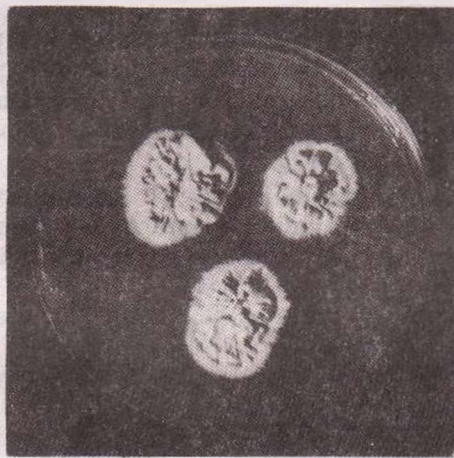


Fig. 40.17. Colonii de *Trichophyton schoenleinii*

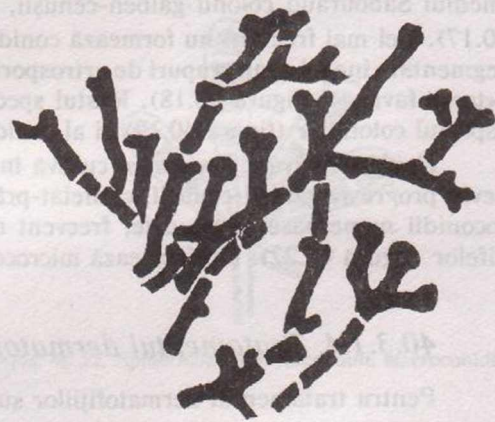


Fig. 40.18. *Trichophyton schoenleinii*, tarse favice

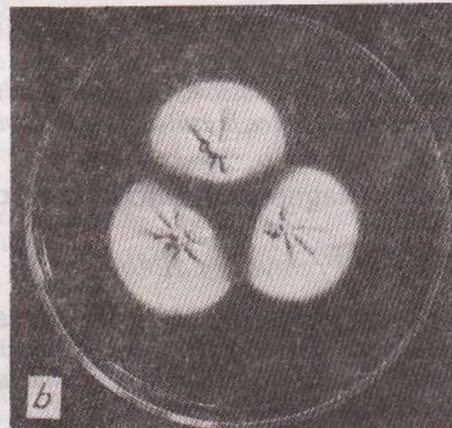
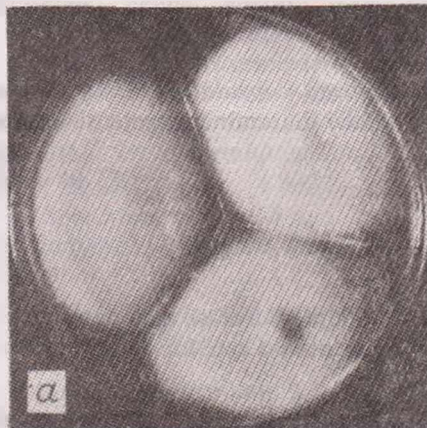


Fig. 40.19. Colonii de *Trichophyton*: a — *T.mentagrophytes*; b — *T.tonsurans*

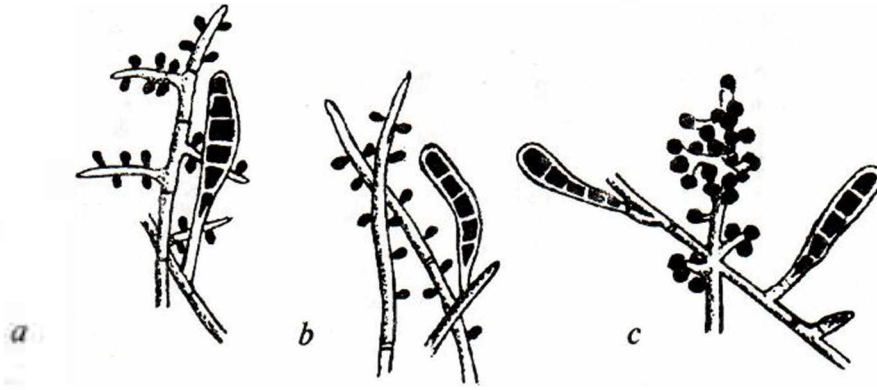


Fig. 40.20. *Trichophyton*, aspecte de hife și conidii: a — *T. tonsurans*; b — *T. rubrum*; c — *T. mentagrophytes*

mediul Sabouraud colonii galben-cenușii, ca ceara, cu suprafața uneori zbârcită (figura 40.17). Cel mai frecvent nu formează conidii. În schimb, în hifele ramificate dihotomic și segmentate inegal apar grupuri de artrospori cu formă neregulată, așezați ca oasele tarsului («tarse favice») (figura 40.18). Restul speciilor de *Trichophyton* pot fi diferențiate după aspectul coloniilor (figura 40.19) și al conidiilor (figura 40.20).

Epidermophyton floccosum cultivă în cca 7 zile. Coloniile, inițial albe și granulare devin progresiv galben-cenușii, catifelat-prăfoase, cu șanțuri radiale (figura 40.21). Macroconidii numeroase, măciucate, frecvent neseptate, cu perete fin, apar la extremitatea hifelor (figura 40.22). Nu formează microconidii.

40.3.1.4. Tratamentul dermatofitiilor

Pentru tratamentul dermatofitiilor sunt utile antibiotice : griscofulvină.

40.4. INVESTIGAȚIA ETIOLOGICĂ A INFECȚIILOR CU FUNGI DIMORFI

Funghi dimorfi, *Blastomyces dermatitidis*, *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, *Paracoccidioides brasiliensis* și *Sporothrix schenckii* determină infecții sistemice.

40.4.1. Diagnosticul microbiologic

40.4.1.1. Prelevate patologice

În raport cu localizarea infecției se examinează: spută, puroi și exsudate, lichid cefalorahidian, probe bioptice tisulare, hemoculturi. Măduva osoasă este foarte utilă pentru depistarea microscopică și izolarea *H.capsulatum*.

40.4.1.2. Microscopia directă

Se examinează:

■ Preparatul între lamă și lamelă montat în soluție 10—20% KOH pentru clarificare. Adăugarea extemporaneu în soluția de KOH a unei picături de tuș de India facilitează, prin colorație negativă, observarea și identificarea *B.dermatitidis*, *C.immitis* sau *Cryptococcus neoformans*.

■ Frotiuri colorate Giemsa.

■ Secțiuni histologice ale probelor biopice colorate cu hematoxilinozină.

Colorații speciale pentru fungi, care impun impregnare argentică, sunt mai puțin accesibile.

Blastomyces dermatitidis: levuri mari sferice de 8—20 μm , cu perete gros, refringent, care dă impresia de dublu contur. Obișnuit, un singur blastospor este atașat de celula mamă printr-un sept larg de 4—5 μm (figura 40.23,a).

Coccidioides immitis: sferule (sporangii) cu diametrul între 20 și 200 μm . Sferulele mature au perete fin și conțin numeroși spori sferici de 2—5 μm . Uneori apar fantome de sferule colabate după ruperea peretelui și eliberarea sporilor. Sferulele imature au 10—20 μm diametru, conțin material granular, au perete gros și pot fi confundate cu levuri neînmugurite de *B.dermatitidis* sau *C.neoformans* (figura 40.24,a).

Histoplasma capsulatum se observă mai bine pe preparatele colorate Giemsa, cu hematoxilinozină sau prin impregnație argentică. Apare mai frecvent intracelular în macrofage, celule gigante sau polimorfonucleare, rar liberă, ca levuri unice sau multiple, rotunde sau piriforme de 1—3/3—4 μm . Frecvent o vacuolă mare dă citoplasmei, colorată în roșu, aspectul de semilună deplasată spre extremitatea largă a celulei (figura 40.25,a).

Sporothrix schenckii apar rar ca levuri rotunde până la fusiforme, înmugurite (figura 40.26,a).

40.4.1.3. Izolarea și identificarea

Etapa I. Se însămânțează probele prin epuizare pe:

■ Geloză-sânge cu incubare la 37°C pentru izolarea formei levurice.

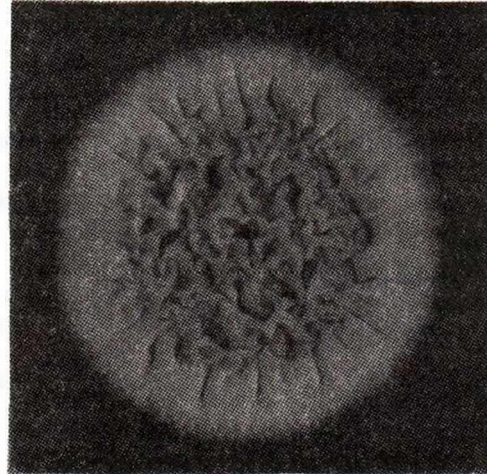


Fig. 40.21. Colonie de *Epidermophyton floccosum*

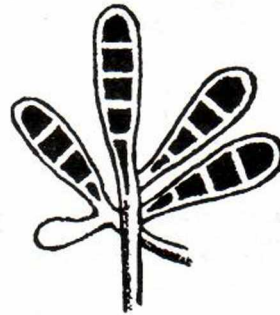


Fig. 40.22. *Epidermophyton floccosum*, macroconidii

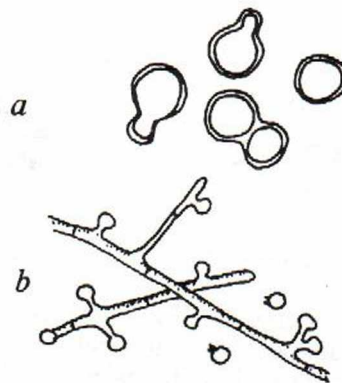


Fig. 40.23. *Blastomyces dermatitidis*: a — forma tisulară (levurică); b — forma filamentoasă

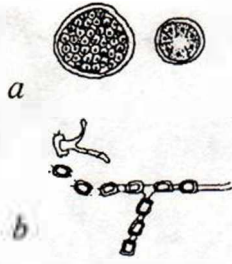


Fig. 40.24. *Coccidioides immitis*: a — forma tisulară (sferule, matură și imatură), b — forma filamentoasă

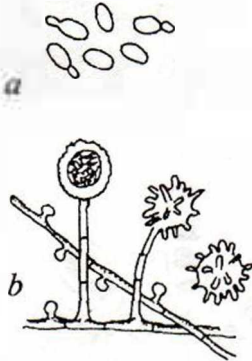


Fig. 40.25. *Histoplasma capsulatum*: a — forma tisulară (levuri intracelulare); b — forma filamentoasă cu microconidii și macroconidii echinulate

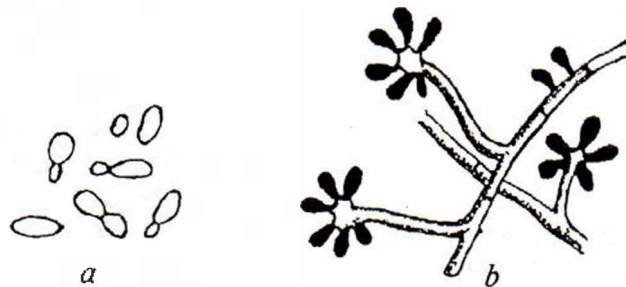


Fig. 40.26. *Sporothrix schenckii*: a — forma tisulară (levurică); b — forma filamentoasă

forma levurică se face prin cultivare și subcultivare, repetată la nevoie, pe panta unui mediu special de conversie cu incubare la 37°C. Conversia la sferule a *C. immitis* impune incubarea la 37°C și atmosferă cu 5% CO₂ în mediu lichid special.

Inocularea intraperitoneală la șoareci sau cobai reprezintă testul de conversie a formei miceliene la forma tisulară; poate fi utilizată însă și ca metodă de izolare și test de patogenitate. Se inoculează intraperitoneal suspensia culturii în faza micelială la mai multe animale. După două săptămâni se sacrifică și se necropsiază, săptămânal, câte un animal și se urmărește prezența leziunilor nodulare în peritoneu, splină, ficat. Se examinează frotiuri din leziuni, colorate Gram, Giemsa sau cu hematoxilinozină, pentru prezența

■ Geloză Sabouraud glucozată 2% cu incubare la 25°C pentru izolarea formei miceliene.

Se utilizează pentru prelevatele contaminate medii cu amestec selectiv de antibiotice (vezi nota 3, tabelul 40.1).

Se efectuează hemoculturile în mediul difazic, pentru a le putea urmări până la 6 săptămâni fără riscul contaminării.

Etapa II. Se urmăresc culturile zilnic în prima săptămână, apoi săptămânal până la 6 săptămâni. Se iau toate măsurile pentru a preveni infecția de laborator prin sporii fungilor dimorfi: epuizarea probelor pe pante de geloză Sabouraud; închiderea plăcilor cu bandă adezivă, aplicarea măștii de protecție, manipulare în incintă de protecție microbiologică (revedi 1.5.3.).

Etapa III. Identificarea preliminară a fungilor dimorfi se face prin recunoașterea formei levurice din culturile incubate la 37°C și a formei miceliale din culturile incubate la 25°C.

Identificarea definitivă impune confirmarea dimorfismului prin conversia de la o fază la alta *in vitro* sau *in vivo*.

Laboratoarele care au seruri imune de referință pot identifica mai simplu și mai sigur acești fungi.

Conversia *in vitro* a formei miceliene la

formelor tisulare ale fungului: levuri libere (*Blastomyces dermatitidis*, *Sporothrix schenckii*), levuri intracelulare (*Histoplasma capsulatum*) sau sferule (*Coccidioides immitis*).

Blastomyces dermatitidis. Pe geloză-sânge la 37°C, după 2—5 zile, formează colonii zbârcite, ceroase, moi, în care fungul poate fi observat în faza levurică amestecat cu scurte fragmente miceliene subdezvoltate. Pe geloză Sabouraud la temperatura camerei formează, între 4 și 30 zile, colonii albe sau castanii în care creșterea, inițial levurică, devine progresiv micelială cu hife ramificate purtătoare de conidii sferice sau ovale, cu diametrul de 2—10 μm, pe conidiofori subțiri laterali sau terminali (figura 40.23,b).

Coccidioides immitis. În culturi pe geloză Sabouraud sau geloză-sânge creșterea este micelială, în interval de 2—21 zile, cu formare de colonii albe, pufoase. Hifele aeriene formează artrospori în formă de butoi, care alternează cu celule goale (figura 40.24,b). Sferule nu apar la cultivarea *in vitro*.

Histoplasma capsulatum. Pe geloză-sânge la 37°C, după 7—14 zile, apar colonii rugoase sau mucoide colorate în crem formate din levuri ovale de 2—3/4—5 μm. Între unicul blastospor de la extremitatea ascuțită și celula mamă persistă un mic por.

Pe geloză Sabouraud la 25°C coloniile apar între 5 și 45 zile; inițial sunt albe, pufoase, uneori glabre, dar pe măsură ce apare miceliul aerian devin maronii-brune. Microscopic se depistează hife septate, ramificate, subțiri cu diametrul de 1—2,5 μm. Microconidii sesile, rotunde sau piriforme, se aliniază în lungul hifelor. Macroconidiile, sferice sau piriforme, sunt caracteristic tuberculate sau echinulate (figura 40.25,b).

Sporothrix schenckii. Pe geloză-sânge la 37°C, după cca 5 zile, apar colonii asemănătoare celor bacteriene (alb-crem, cu suprafața neregulată, moi) formate din levuri în formă de trabuc.

Pe geloză Sabouraud la 25°C, după 3—5 zile, coloniile sunt punctiforme, cresc progresiv și devin pielose, zbârcite, pigmentate de la crem la negru. Microscopic, în colonii observăm un miceliu cu hife subțiri ramificate. Microconidii ovale sunt grupate în buchete la extremitatea unor conidiofori subțiri și aliniate în lungul hifelor (figura 40.26,b).

40.4.2. Diagnosticul serologic

Pentru confirmarea suspiciunii de infecție cu fungi dimorfi, simpla prezență a anticorpilor respectivi este suficientă.

■ În suspiciunea de *blastomicoză* se utilizează reacțiile de imunodifuzie (ID) și de fixare a complementului (RFC) cu un antigen extras din filtratul culturii de o săptămână, în bulion, a formei miceliale de *Blastomyces dermatitidis*. Imunodifuzia trebuie practică cu un ser martor de la pacient sau animal cu *blastomicoză* demonstrată. Numai aceste seruri relevă în antigenul blastomicozic «linia de precipitare A», singura caracteristică. Până la 20% din rezultatele ID cu serul precoc pot fi fals negative. De aceea, în cazul reacțiilor negative, testele se vor repeta după 3 săptămâni pe o nouă probă de ser, adăugând la testare și antigeni de *C.immitis* și *H.capsulatum*, iar investigația micologică va continua.

■ În suspiciunea de *coccidioidomicoză* sunt utile reacțiile de precipitare în tub (PT), ID, LA și RFC folosind ca antigen *coccidioidina*, care este filtratul culturii de *C.immitis* în bulion incubate 8 săptămâni la temperatura camerei. Mai sunt utile intradermoreacții cu *sferulină*, extractul din sferule de *C.immitis*. Precipitarea în tub se pozitivează la cca 2 săptămâni de la debutul infecției; LA este mai sensibilă și se pozitivează mai precoce, dar este mai puțin specifică (6—10% rezultate fals pozitive) și trebuie confirmată prin PT, ID sau RFC.

■ Suspiciunea de *histoplasmoză* poate fi confirmată prin RFC, ID, CIE sau LA cu suspensie inactivată a formei levurice sau cu *histoplasmină*, care este filtratul culturii de 6 luni în mediu lichid a formei miceliale a fungului. Anticorpii față de forma levurică apar după 4 săptămâni de la debutul infecției, cei față de histoplasmină mai tardiv. Intradermoreacții cu histoplasmină se pot face pentru depistarea infecțiilor latente, dar se vor practica numai după efectuarea reacțiilor serologice, pentru că histoplasmina este imunogenă și poate determina reacții serologice fals pozitive.

■ La bolnavii cu *sporotrichoză* se pot practica: aglutinarea în tub (AT) cu suspensie levurică sau LA. Latex-aglutinarea este mai sensibilă și mai specifică decât AT, care, la diluții de 1:8—1:16 ale serurilor, poate da reacții încrucișate la pacienți cu leishmanioză.

40.4.3. Biopreparate pentru diagnosticul de laborator și chimioterapice utile contra infecțiilor cu fungi dimorfi

■ Seruri imune adsorbite și antigeni martor pentru identificarea antigenică a izolatelor.

■ Antigen pentru serodiagnosticul blastomicozei.

■ Coccidioidină pentru serodiagnostic și sferulină pentru i.d.r. în coccidioidomicoză.

■ Histoplasmină pentru serodiagnostic sau i.d.r. în histoplasmoză.

■ Suspensie levurică și particule de latex sensibilizate cu extract antigenic de *Sporothrix schenckii* pentru serodiagnosticul sporotricozei.

■ Amfotericina B este antibioticul de elecție pentru tratamentul infecțiilor cu fungi dimorfi. În cazuri mai puțin severe poate fi utilizat chetoconazolul. Indicațiile miconazolului, imidazolului etc. variază cu etiologia bolii. Sporotricoză cutanată răspunde favorabil la tratamentul cu soluție saturată de iodură de potasiu.

40.5. INVESTIGAȚIA ETIOLOGICĂ A INFECȚIILOR DETERMİNATE DE FUNGI FILAMENTOSI OPORTUNIȘTI

Numărul mare al acestor fungi depășește posibilitatea descrierii lor amănunțite în acest manual. Identificarea lor și diagnosticul corect al infecțiilor determinate este de competența unor laboratoare specializate. Date rezumative asupra speciilor, infecțiilor, prelevatelor patologice indicate pentru diagnostic și metodelor de diagnostic sunt rezumate în tabelul 40.1.

Vom insista numai asupra unor principii generale privind prelevarea, prelucrarea probelor și interpretarea rezultatelor.

În prelevatele superficiale din zone contaminate (exsudate din plăgi) sau contaminate pe traiectele de eliminare (spută) prezența hifelor acestor fungi trebuie interpretată prudent; pot fi contaminanți. În probele bioptice hifele pot rămâne mascate în cazeum sau țesut fibros. Digestia peptică eliberează hifele și scade proporția rezultatelor fals negative. Șansa de a observa hife viabile este mai mare la periferia leziunilor în zona de invazie tisulară. Microdisecția pieselor bioptice la stereomicroscop facilitează reperarea realului produs patologic de examinat. Este contraindicată majorarea pieselor care dezorganizează și distruge hifele fungice.