

Etiologia das infeções fúngicas invasivas e subcutâneas: análise dos dados da Rede Nacional de Vigilância Laboratorial das Infeções Fúngicas Invasivas e Subcutâneas (IFIs), 2013-2018

Etiology of invasive and subcutaneous fungal infections: analysis of data from the National Network for Laboratory Surveillance of Invasive and Subcutaneous Fungal Infections (IFIs), 2013-2018

Cristina Veríssimo¹, Cristina Toscano², Teresa Ferreira³, Gabriela Abreu⁴, Helena Simões¹, José Diogo⁵, Ana Maria Queirós⁶, Felicidade Santiago⁷, Ana Lima⁸, Raquel Sabino¹

cristina.verissimo@insa.min-saude.pt

(1) Laboratório Nacional de Referência para Infeções Parasitárias e Fúngicas. Departamento de Doenças Infecciosas, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal.

(2) Laboratório de Microbiologia. Hospital Egas Moniz, Centro Hospitalar de Lisboa Ocidental, Lisboa, Portugal.

(3) Centro Hospitalar Lisboa Central, Lisboa, Portugal.

(4) Centro Hospitalar Vila Nova de Gaia/Espinho, Vila Nova de Gaia, Portugal.

(5) Laboratório de Microbiologia. Hospital Garcia de Orta, Almada, Portugal.

(6) Laboratório de Microbiologia, Centro Hospitalar Tondela Viseu, Viseu, Portugal.

(7) Centro Hospitalar de Leiria, Leiria, Portugal.

(8) Laboratório de Microbiologia, Centro Hospitalar de entre Douro e Vouga, Santa Maria da Feira, Portugal.

_Resumo

A epidemiologia das infeções fúngicas invasivas tem vindo a alterar-se com o surgimento de novos agentes etiológicos. A Rede Nacional de Vigilância Laboratorial de Infeções Fúngicas Invasivas e Subcutâneas (IFI) teve início em 2013 com o objetivo de melhor compreender a epidemiologia destas infeções em Portugal. O objetivo deste estudo é analisar os dados obtidos através da Rede entre junho de 2013 e setembro de 2018. Os laboratórios participantes asseguram a comunicação dos casos de IFIs ao Laboratório Nacional de Referência do INSA, enviando amostras biológicas ou isolados, acompanhados de um inquérito contendo informações demográficas, laboratoriais e avaliações clínicas dos doentes com suspeita de infeção fúngica. O estudo incluiu: i) casos de infeção fúngica invasiva (IFI) por fungos filamentosos/dimórficos, ii) casos de IFI provável, de acordo com os critérios estabelecidos pelo EORTC/MSG 2008, e iii) casos de infeções fúngicas subcutâneas. As infeções por leveduras não foram incluídas. Entre junho de 2013 e setembro de 2018, foram incluídos 52 casos, distribuídos da seguinte forma: IFI comprovada (por fungos filamentosos) (n=9); Infeção fúngica subcutânea (n=17); Infeção por fungos dimórficos endémicos (n=9), totalizando 67% de casos de IFI comprovados (n=35) e 33% de casos IFI provável (n=17). Os dados obtidos chamam a atenção para a grande diversidade de espécies envolvidas em infeções fúngicas profundas, com implicações para o diagnóstico clínico/laboratorial bem como para o tratamento destas infeções.

_Abstract

The epidemiology of deep fungal infections has been changing with the emergence of new species as etiological agents. The National Laboratory Surveillance Network for Invasive and Subcutaneous Fungal Infections (IFIs) began in 2013 with the aim of better understanding the epidemiology of invasive and subcutaneous fungal infections in Portugal. The goal of this study is to analyse the data obtained from this Network between June 2013 and September 2018. The participating laboratories ensured the reporting of

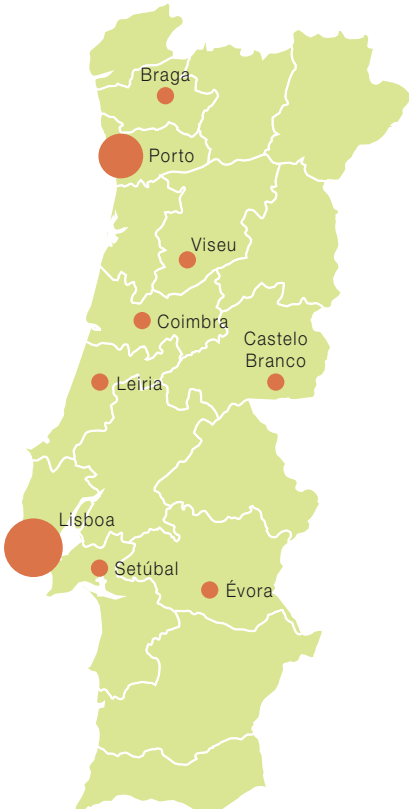
suspected or confirmed IFIs cases to the National Reference Laboratory of INSA, by sending biological samples or isolates, accompanied by a survey containing demographic information, laboratory and clinical evaluation of patients with suspicion of having an IFIs. The study included: i) cases of invasive fungal infection (IFI) caused by filamentous/dimorphic fungi, ii) cases of probable IFI, according to the criteria established by EORTC/MSG 2008, and iii) cases of subcutaneous fungal infections. Yeast infections were not included. Between June 2013 and September 2018, 52 cases were included. The cases were distributed as follows: Proven IFI (by filamentous fungi) (n=9); Subcutaneous fungal infection (n=17); Infection due to endemic dimorphic fungi (n=9), totalizing 67% of proven IFI cases (n=35) and 33% of probable IFI cases (n=17). The obtained data raise the awareness to the great diversity of species involved in deep fungal infections, with implications to the clinical/laboratory diagnosis of these infections as well as their treatment.

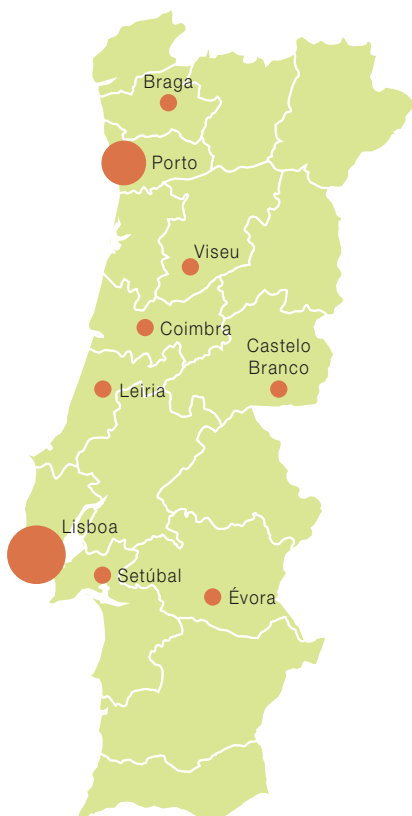
_Introdução

Nas últimas décadas tem-se observado um aumento da incidência de infeções fúngicas profundas, devido principalmente a uma maior utilização de procedimentos invasivos e ao aumento da prescrição de terapêutica ⁽¹⁾. A epidemiologia destas infeções tem vindo a modificar-se com a emergência de novas espécies enquanto agentes de infeção fúngica ⁽²⁾.

A Rede Nacional de Vigilância Laboratorial das Infeções Invasivas e Subcutâneas (IFIs) iniciou-se em 2013 com o objetivo de melhor conhecer a epidemiologia das infeções fúngicas invasivas e subcutâneas em Portugal.

A componente laboratorial da Rede IFIs é assegurada por 15 laboratórios de microbiologia de unidades hospitalares pertencentes ao Serviço Nacional de Saúde (SNS) (figura1). Os laboratórios participantes asseguram a comunicação dos casos suspeitos e/ou confirmados de IFIs ao Laboratório Nacional de Referência para Infeções Parasitárias e Fúngicas do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA), com o envio de amostras biológicas e/ou isolados fúngicos, acompanhadas de um inquérito no qual consta informação demográfica, laboratorial e clínica dos doentes com IFIs. O Laboratório do INSA efetua a caracterização fenotípica e molecular dos isolados recebidos e analisa os casos obtidos da Rede IFIs.

Figura 1:  Distribuição geográfica das unidades hospitalares participantes na Rede Nacional para Vigilância Laboratorial das Infeções Fúngicas Invasivas e Subcutâneas (5 distrito de Lisboa; 3 distrito do Porto e 1 laboratório nos restantes distritos assinalados).



_Objetivo

Análise dos dados de obtidos através da Rede Nacional para Vigilância Laboratorial das Infeções Fúngicas Invasivas e Subcutâneas entre junho de 2013 e setembro de 2018.

_Material e métodos

Recolha de dados

Cada unidade hospitalar designou um responsável por reunir a informação clínica, laboratorial e epidemiológica, dos casos a notificar à Rede através do preenchimento de inquérito desenhado para o efeito. O formulário inclui os dados demográficos do doente, os dados clínicos, micológicos e fatores do hospedeiro que podem potenciar o aparecimento de IFIs. Do inquérito constam ainda questões relativas a fatores de risco para infeção fúngica invasiva, bem como questões sobre a terapêutica e o *outcome* 30 dias após tratamento.

Os fatores de risco foram divididos em três grupos: 1) fatores de imunossupressão (quimioterapia, transplante de medula hematopoiética, transplante de medula óssea alogénico, transplante de órgão sólido, infeção HIV/SIDA, outro distúrbio com necessidade de imunossupressão); 2) trauma/intervenção (internamento na unidade de cuidados intensivos (UCI), cirurgia invasiva, queimadura, traumatismo penetrante); 3) doenças crónicas/fatores comportamentais (alcoolismo, doença pulmonar obstrutiva crónica (DPOC), diabetes mellitus, doença renal/hepática crónica, viagem a região de infeções fúngicas endémicas, nascimento prematuro).

Crítérios de inclusão

Foram incluídos nesta análise: i) casos de infeção fúngica invasiva (IFI), causadas por fungos filamentosos/dimórficos, comprovadas por microscopia ou cultura positiva a partir de amostras estéreis, colhidas por biópsia ou por punção, ii) casos com diagnóstico de IFI provável segundo os critérios estabelecidos pelo EORTC/MSG (*European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group*) (3), quando devidamente fundamentados, nomeadamente: iso-

lamento de fungos filamentosos a partir de amostras respiratórias, provenientes de doentes com fatores de risco para IFI (de acordo com os critérios estabelecidos e devidamente referenciados no inquérito clínico) e iii) casos de infeções fúngicas subcutâneas. Não foram incluídos no estudo as infeções por leveduras.

Identificação dos fungos isolados em cultura

Sempre que se observou uma cultura positiva, os fungos isolados foram enviados ao INSA para identificação da espécie/género. Numa primeira fase, os fungos isolados foram identificados com base na observação da sua morfologia macro e microscópica, de acordo com o descrito no atlas de identificação (4). Para confirmação da identificação ao nível da espécie, efetuou-se extração do DNA total das colónias fúngicas por sequenciação da região ITS (*internal transcribed spacer*) do DNA ribossomal (5) ou, no caso do género *Aspergillus*, sequenciando a região codificante para a proteína calmodulina. As sequências obtidas foram comparadas com as sequências depositadas em bases de dados *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) – *National Center for Biotechnology Information/US National Institutes of Health e Westerdijk Fungal Biodiversity Institute*.

_Resultados

No período compreendido entre junho 2013 e setembro de 2018 foram incluídos 83% dos casos notificados à Rede (52/63) provenientes de 13 distritos de residência do doente, sendo a maioria do distrito de Lisboa (gráfico 1).

Os casos declarados à Rede distribuíram-se do seguinte modo: IFI comprovada (por fungos filamentosos) (n=9), infeção subcutânea comprovada (excluindo fungos dimórficos) (n=17); infeção por fungos dimórficos endémicos (n=9), totalizando 67% de IFI comprovadas (n=35) e 33% de IFI prováveis (n=17) (tabela 1).

Em geral, as infeções fúngicas foram mais frequentemente notificadas nos indivíduos do género masculino (n=36), não se tendo observado, no entanto diferença quanto ao género

nas infeções fúngicas subcutâneas. A mediana das idades do total de doentes foi de 59 anos (3-90 anos).

A análise dos casos revelou uma predominância de infeções localizadas (n=46), tendo-se observado infeções disseminadas em apenas 6 casos. Destes, 3 foram classificados como IFI provada, 1 como IFI provável e 2 doentes com infeção por fungos dimórficos endémicos.

Relativamente ao *outcome*, foi possível ter resposta em 40% (n=21) dos casos, tendo-se verificado resposta parcial/completa à terapia (n=12), sem resposta à terapia (n=2) ou óbito devido a infeção fúngica (n=7). Nestes 21 casos a letalidade relacionada a IFI foi de 33,3% (7/21) (tabela 1).

Em 67% dos casos (n=35) obteve-se resposta para a questão relativa aos fatores de risco, tendo-se observado que a maioria dos casos (n=27) apresentou apenas um fator de risco, enquanto oito casos apresentaram dois ou mais fatores de risco. Os fatores de risco do grupo “Doenças crónicas/Fatores comportamentais”, foram os mais frequentemente assinalados nas infeções por fungos dimórficos endémicos (*Histoplasma capsulatum*, *Paracoccidioides brasiliensis*), sendo os fatores “Estadia em zonas de fungos endémicos” e “Alcoolismo” os predominantes, pelo que todas as infeções por fungos dimórficos endémicos foram consideradas como casos de importação.

Nas infeções comprovadas e prováveis por fungos filamentosos, os fatores de risco mais referenciados foram associados à imunossupressão sendo o fator “Outros distúrbios com necessidade de imunossupressão incluindo esteroides” o fator mais referenciado, seguido de “Transplante de medula/órgão sólido” No gráfico 2 encontram-se apresentados e discriminados os fatores de risco anteriormente descritos quer para a IFI provada quer para a IFI provável. Nas infeções subcutâneas, o fator de risco “Traumatismo penetrante” foi referenciado em 24% (4/17) dos casos.

Gráfico 1: Distribuição dos casos de infeções invasivas e subcutâneas (IFIs) por distrito de residência, 2013-2018 (n=52).

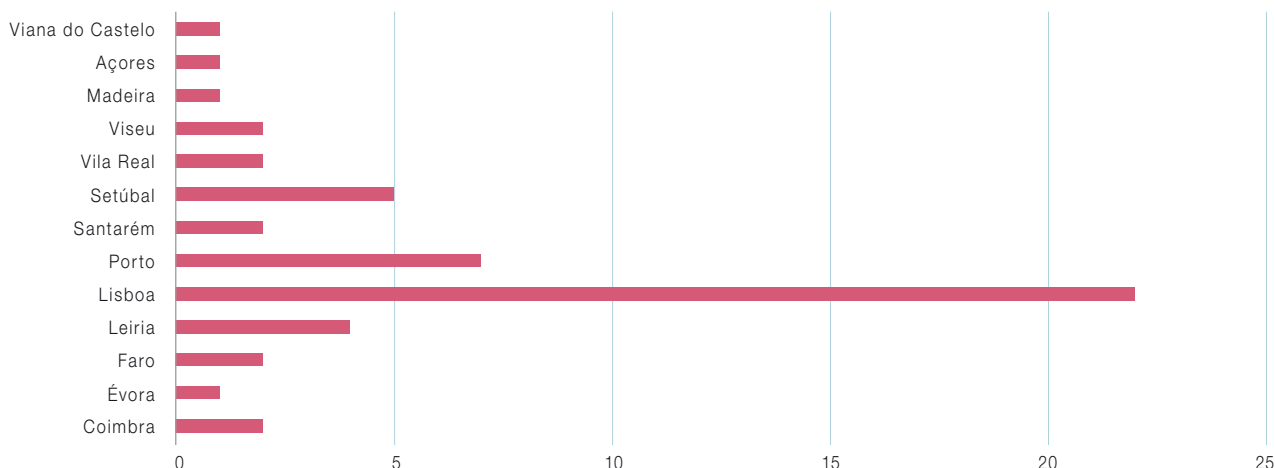
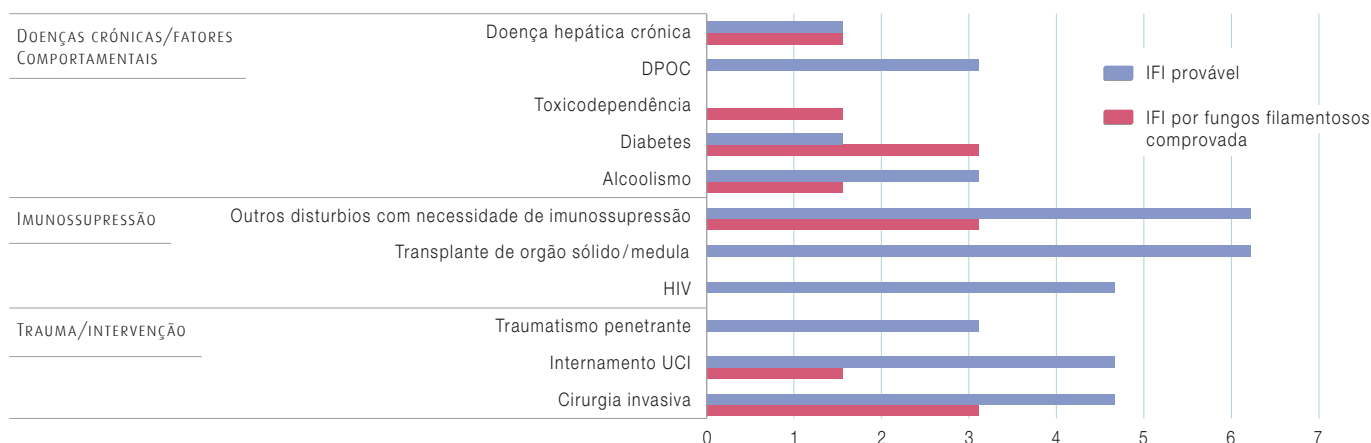


Tabela 1: Distribuição de casos por tipo de infeção fúngica, de acordo com género, idade (mediana), fatores de risco associados localização de infeção e outcome (n=52).

	Infeções fúngicas invasivas (IFI) comprovadas			IFI provável	
	IFI (por fungos filamentosos)	IFI (por fungos dimórficos endémicos)	IFI Subcutânea		
Total de casos	9	9	17	17	
Dados demográficos	Sexo masculino (36)	6	8	8	14
	Sexo feminino (16)	3	0	9	4
	Mediana das idades	63 anos	64 anos	65 anos	54 anos
Fatores de risco	Trauma/Intervenção (18)	3	0	7	8
	Imunossupressão (19)	2	3	6	8
Tipo de infeção	Doenças crónicas/comportamentais (28)	5	16	1	6
	Infeção localizada (46)	6	7	17	16
	Infeção disseminada (6)	3	2	0	1
Outcome	Resposta ao tratamento	2/3	4/6	4/5	2/5
	Óbito devido a infeção fúngica (7)	2	2	sem informação	3

Gráfico 2: Fatores de risco referenciados nos casos de infeção fúngica invasiva por fungos filamentosos comprovada e provável, 2013-2018.



Na análise da distribuição das espécies por tipo de infeção, observou-se que nas IFIs comprovada e provável (por fungos filamentosos) o género *Aspergillus* foi o mais frequente (n=8) correspondendo a 30,7% (8/26) dos agentes responsáveis por este tipo de infeção, tendo-se identificado apenas duas espécies: *A. fumigatus* (secção) (n=7) e *A. flavus* (secção) (n=1). As infeções por fungos asseptados da ordem Mucorales corresponderam a 19,2% (5/26) das infeções IFI comprovada e provável (por fungos filamentosos), observando-se maior variedade de espécies implicadas, tais como *Mucor velutinosus* (n=1), *Rhizopus microsporus* (n=1), *Cunninghamella bertholletiae* (n=1) e fungos asseptados sem isolamento (n=2) (confirmação por histologia). Os fungos do género *Fusarium* spp. (n=4) corresponderam a 15% (4/26) dos agentes identificados nas IFIs comprovada e provável (por fungos filamentosos), bem como fungos do género *Scedosporium* spp. (n=4). Para além das espécies/géneros descritos foram ainda notificados outras espécies/géneros responsáveis por infeção fúngica comprovada/provável, nomeadamente *Cladophialophora bantiana* (n=1) descrito como agente de feohifomicose cerebral em indivíduos imunocompetentes, *Exophiala* spp. (n=1) e *Paecilomyces* spp. (n=1).

Os fungos do género *Alternaria* (n=7), foram os agentes mais frequentemente implicados nas infeções fúngicas subcutâneas, representando 41% (7/17) dos agentes responsáveis por este tipo de infeção, sendo a espécie *Alternaria infectoria* predominante (n=6). O segundo género mais frequentemente implicado neste tipo de infeções foi o género *Scedosporium*, nomeadamente as espécies do complexo *Scedosporium apiospermum* (n=4) que corresponderam a 24% (4/17) das infeções subcutâneas. Os restantes 35% (6/17) corresponderam a fungos dos géneros *Trichosporon* (n=2), *Trichophyton* (n=1), *Saksenaea* (n=1), *Fusarium* (n=1), *Schizophyllum* (n=1).

As infeções por fungos dimórficos endémicos foram causadas por duas espécies: *Histoplasma capsulatum* (n=6) e *Paracoccidioides brasiliensis* (n=3). A variedade *H. capsulatum duboisii* (variedade africana) foi a mais frequente (n=4).

_Discussão e conclusão

Os resultados apresentados não traduzem a realidade nacional por falta de cobertura de algumas regiões e por o número de laboratórios que integram a Rede IFIs não ser representativo da realidade nacional. No entanto, os dados obtidos chamam a atenção para a grande diversidade de espécies envolvidas nas infeções fúngicas profundas, o que tem implicações, quer ao nível do diagnóstico clínico/laboratorial, quer no tratamento destas infeções, uma vez que as diferentes espécies/géneros de fungos apresentam diferentes padrões de suscetibilidade aos antifúngicos, sendo algumas destas espécies resistentes a mais do que uma classe de antifúngicos (6).

Os doentes com patologia hematológica e tumor sólido, bem como os doentes transplantados de medula óssea alogénica e doentes transplantados de órgão sólido, são considerados os principais grupos de risco para infeção fúngica invasiva e subcutânea devido à imunossupressão subjacente a estas patologias (7). No entanto, nos casos analisados observou-se que o fator de risco mais frequentemente referenciado foi “*Outros distúrbios com necessidade de imunossupressão incluindo esteróides*”, e só depois é referido o fator “*Transplante de órgão sólido/medula*”. Apesar das limitações inerentes ao presente estudo, este facto chama a atenção para a emergência de outros grupos de risco para além dos atrás descritos, o que está de acordo com diversas publicações que apontam, por exemplo, os doentes com DPOC (doença pulmonar obstrutiva crónica), doença hepática crónica, doentes críticos, como grupos em cuja incidência de IFIs tem vindo a aumentar (8).

As infeções fúngicas invasivas apresentam uma elevada taxa de letalidade associada (8). Neste estudo a letalidade associada a estas infeções foi 33% (7/21) que apesar de elevada é inferior à habitualmente descrita para as infeções invasivas por fungos filamentosos. Esta letalidade poderá, no entanto, estar afetada pela baixa representatividade da amostra, uma vez que apenas foi possível obter resposta a esta questão em 21 do total de casos incluídos.

No que se refere à etologia das IFIs, os resultados obtidos estão de acordo com a maioria dos estudos publicados,

tendo-se observado predominância de *A. fumigatus* (Secção) enquanto agente das IFI provável e comprovada, seguido dos fungos asseptados da ordem Mucorales e pelas espécies do género *Fusarium*. A epidemiologia das IFIs varia com a localização geográfica, sendo, por exemplo, a espécie *A. flavus* descrita como mais frequente nos climas tropicais e *A. terreus* mais frequente noutras regiões (9).

A representatividade dos casos neste estudo é afetada por diversos fatores, nomeadamente pelas limitações referentes à *guideline* utilizada para a inclusão dos casos, que foi desenhada tendo em vista o doente hematológico, podendo, portanto, não se adequar aos doentes críticos internados nas unidades de cuidados intensivos ou a outros grupos de risco para IFIs. A dificuldade de diagnóstico laboratorial, nomeadamente a baixa sensibilidade dos métodos convencionais, microscopia e cultura, poderão também ter contribuído para a não inclusão de alguns casos de IFIs, pelo que a utilização de novas metodologias, nomeadamente a deteção por métodos moleculares, poderá auxiliar no diagnóstico laboratorial destas infeções e contribuir para um melhor conhecimento da epidemiologia das IFIs em Portugal.

Agradecimentos:

Aos restantes representantes das unidades hospitalares: Filomena Reis (Hospital Santa Maria Maior); Maria Dolores Pinheiro (Centro Hospitalar São João); Catarina Lameiras (Instituto Português de Oncologia de Lisboa Francisco Gentil); Dinah Carvalho (Centro Hospitalar Lisboa Norte); Sandra Paulo (Centro Hospitalar Cova da Beira); Adriana Coutinho (Hospital Espírito Santo de Évora); Maria Alexandra Mendes (Instituto Português de Oncologia de Coimbra Francisco Gentil).

À Doutora Cristina Furtado pela revisão científica do artigo.

Referências bibliográficas:

- (1) Slavin M, van Hal S, Sorrell TC, et al.; Australia and New Zealand Mycoses Interest Group. Invasive infections due to filamentous fungi other than *Aspergillus*: epidemiology and determinants of mortality. *Clin Microbiol Infect.* 2015;21(5):490.e1-10. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2014.12.021>
- (2) Lamoth F, Calandra T. Early diagnosis of invasive mould infections and disease. *J Antimicrob Chemother.* 2017;72(suppl 1):i19-i28.
- (3) De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JPet al.; European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group; National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. *Clin Infect Dis.* 2008;46(12):1813-21. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2671227/>
- (4) Hoog GS, Guarro J, Gené J, Figueras MJ. *Atlas of Clinical Fungi: the ultimate benchtool for diagnosis (version 4.1.4)* [Em linha]. Utrecht, The Netherlands, 2016.
- (5) White TJ, Bruns T, Lee S, et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. IN: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, et al. (eds). *PCR Protocols: a guide to methods and applications*. New York: Academic Press, 1990, pp. 315-22.
- (6) Wiederhold NP. Antifungal resistance: current trends and future strategies to combat. *Infect Drug Resist.* 2017;10:249-259. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5587015/>
- (7) Pagano L, Akova M, Dimopoulos G, et al. Risk assessment and prognostic factors for mould-related diseases in immunocompromised patients. *J Antimicrob Chemother.* 2011;66(Suppl 1):i5-14.
- (8) Ruiz-Camps I, Aguado JM, Almirante B, et al; GEMICOMED (Medical Mycology Study Group of SEIMC). Guidelines for the prevention of invasive mould diseases caused by filamentous fungi by the Spanish Society of Infectious Diseases and Clinical Microbiology (SEIMC). *Clin Microbiol Infect.* 2011;17(Suppl 2):1-24. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03477.x>
- (9) Pagano L, Mayor S. Invasive fungal infections in high-risk patients: report from TIMM-8 2017. *Future Sci OA.* 2018;4(6):FSO307. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6060393/>