



_Algoritmo para o diagnóstico laboratorial das infeções fúngicas profundas

Algorithm for the diagnosis of deep fungal infections

Raquel Sabino, Helena Simões, Cristina Veríssimo

raquel.sabino@insa.min-saude.pt

Laboratório Nacional de Infeções Parasitárias e Fúngicas. Departamento de Doenças Infecciosas, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal.

_Resumo

Amostras de tecidos de doentes com suspeita de infeções fúngicas profundas ou subcutâneas foram analisadas no Laboratório Nacional de Referência de Infeções Parasitárias e Fúngicas do INSA, de acordo com um algoritmo de diagnóstico desenvolvido que apresenta uma abordagem polifásica, que tem por objetivo permitir um diagnóstico laboratorial mais rápido das infeções fúngicas profundas. Quarenta e seis amostras de tecido de 39 doentes com suspeita de infeções fúngicas profundas ou subcutâneas foram analisadas durante um período de 26 meses (janeiro de 2015-fevereiro de 2017) pelo laboratório do INSA, usando uma abordagem laboratorial que incluiu cultura, PCR panfúngica e PCR dirigida a *Aspergillus*. Do total de amostras estudadas, 23 foram positivas para fungos (PCR, cultura e/ou histologia). Das 46 amostras, 16 apresentaram resultados positivos para DNA fúngico. Em 12 amostras foi detetado um sinal positivo por PCR panfúngica e em 6 por PCR dirigida a *Aspergillus* (em 2 das amostras ocorreu deteção pelas duas metodologias). Em 61% (22/36) das amostras estudadas, houve concordância entre os métodos moleculares e culturais. Os agentes etiológicos identificados foram *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *Trichosporon montevidense*, *Alternaria* spp., *Exophiala* sp., *Trichoderma* sp., *Histoplasma* spp., *Aspergillus fumigatus*, *Trichophyton rubrum* e *Paracoccidioides brasiliensis*. Os resultados obtidos mostraram que a abordagem polifásica proposta parece ser uma boa estratégia na deteção de fungos em amostras de tecidos, permitindo eventualmente um melhor prognóstico. Em estudos posteriores, pretende-se estudar um maior número de amostras clínicas e implementar mais metodologias moleculares que permitam a deteção dirigida a determinados géneros fúngicos.

_Abstract

Tissue specimens from patients with suspicion of having deep or subcutaneous fungal infections were analyzed at the National Reference Laboratory for Parasitic and Fungal Infections of INSA, according to a developed diagnostic algorithm comprising a polyphasic approach. This algorithm might allow a faster laboratory diagnosis of deep fungal infections. Forty-six tissue samples from 39 patients suspected of having deep or subcutaneous fungal infections were analyzed during a 26-month period (January 2015-February 2017) by the laboratory of INSA, using a laboratory approach that includes culture, panfungal PCR and *Aspergillus*-directed PCR. From the total samples studied, 23 were positive for fungi (PCR, culture and/or histology). From the 46 samples, 16 showed positive results for fungal DNA. In 12 samples a positive signal was detected by panfungal PCR and in 6 by *Aspergillus*-directed PCR (in 2 samples, there was positive detection using both methods). In 61% (22/36) of the samples studied,

there was concordance between molecular and cultural methods. The etiological agents identified were *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *Trichosporon montevidense*, *Alternaria* spp., *Exophiala* sp., *Trichoderma* sp., *Histoplasma* spp., *Aspergillus fumigatus*, *Trichophyton rubrum* and *Paracoccidioides brasiliensis*. The results showed that the proposed polyphasic approach seems to be a good strategy for the detection of fungi in tissue samples, possibly allowing a better prognosis. In subsequent studies, it is intended to study a higher number of clinical samples and to establish more directed PCRs, allowing the detection of specific fungal genera.

_Introdução

As infeções fúngicas invasivas estão a aumentar em todo o mundo. Esta tendência parece dever-se ao aumento do número de pessoas imunocomprometidas e/ou sujeitas a procedimentos invasivos. Acresce-se que estas infeções são difíceis de diagnosticar e tratar, representando um desafio para o laboratório e para os clínicos ⁽¹⁾.

De acordo com as definições do 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*) ⁽²⁾, uma infeção fúngica invasiva comprovada é definida pela observação de estruturas fúngicas ou cultura positiva de uma amostra biológica colhida de local habitualmente estéril, paralelamente a um quadro clínico compatível de infeção. No entanto, o procedimento necessário para a execução do exame histopatológico requer experiência técnico-científica do executante e, por vezes, as culturas permanecem negativas após várias semanas de incubação, o que representa uma grande desvantagem quando se pretende um diagnóstico precoce. De facto, exame histológico e cultura negativos não permitem a classificação de uma infeção invasiva como comprovada,

e na maioria dos casos, essas infeções são classificadas como possíveis ou prováveis. Contudo, a classificação de uma infeção fúngica invasiva é sempre baseada em fatores do hospedeiro, critérios clínicos e micológicos (2).

_Objetivos

Com a finalidade de contribuir para uma futura discussão e padronização do diagnóstico laboratorial das infeções fúngicas profundas, este estudo apresenta a experiência do Laboratório Nacional de Referência de Infeções Parasitárias e Fúngicas do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) no diagnóstico de infeções fúngicas invasivas e subcutâneas, utilizando para o efeito uma abordagem laboratorial polifásica que inclui metodologias culturais e moleculares no tecido, sugerindo-se ainda a inclusão da deteção de biomarcadores em simultâneo.

Especificamente, o presente trabalho teve como objetivo estudar as metodologias de amplificação do DNA fúngico (PCR

panfúngica e PCR dirigida a *Aspergillus*), através da análise descritiva dos resultados moleculares e do exame micológico cultural obtidos nas amostras analisadas.

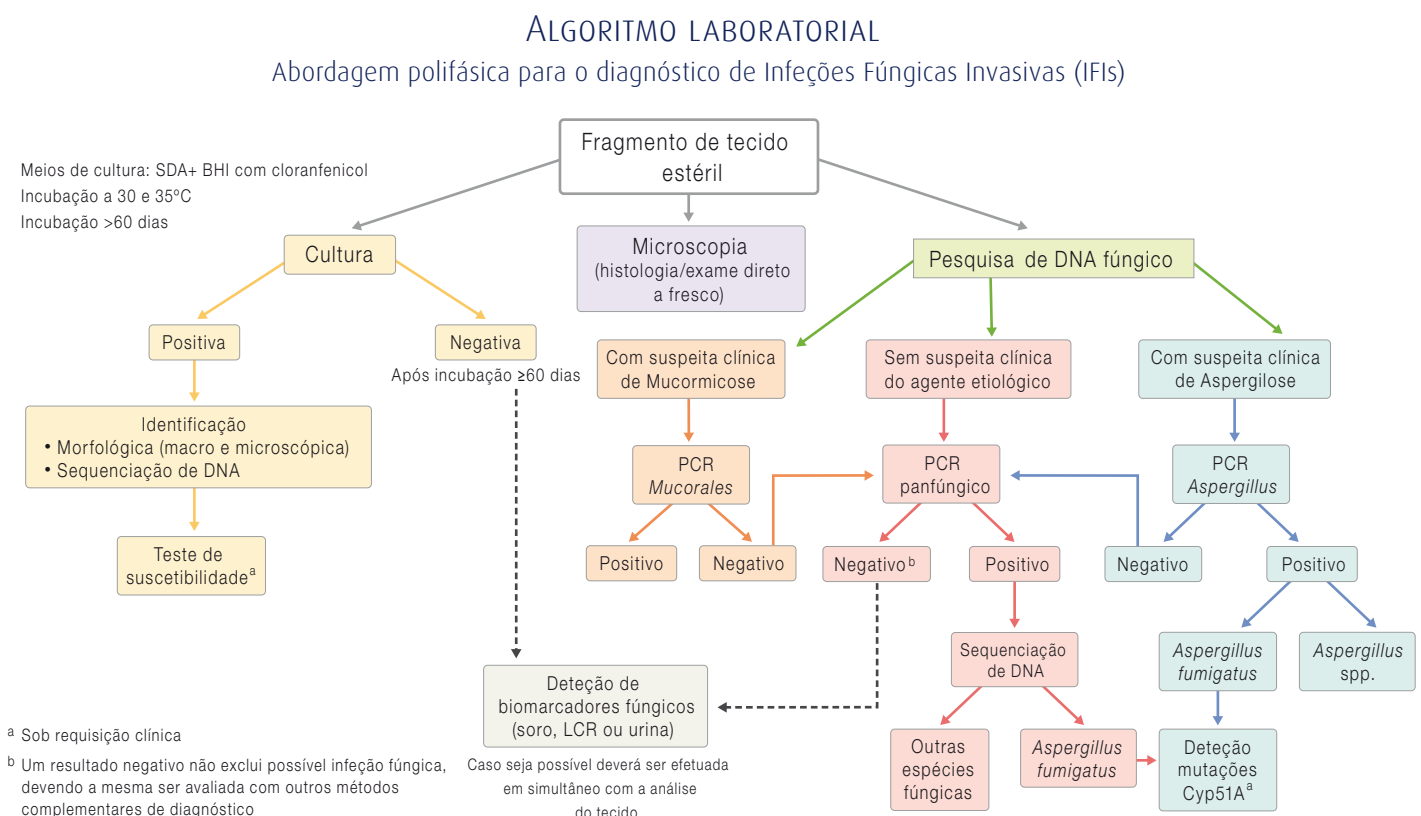
_Material e métodos

No período entre janeiro de 2015 e fevereiro de 2017 foram analisadas no Laboratório Nacional de Referência de Infeções Parasitárias e Fúngicas do INSA, amostras de tecido, colhido de local habitualmente estéril, de doentes com suspeita clínica de infeção fúngica profunda ou subcutânea. A população de doentes não foi selecionada em relação a qualquer fator ou grupo de risco. Amostras de tecido fresco são consideradas como amostras na primeira linha de escolha para o diagnóstico de infeções fúngicas profundas, face às amostras de tecido parafinadas.

O diagnóstico laboratorial das infeções fúngicas invasivas e subcutâneas (IFIs) seguiu o algoritmo indicado na figura 1.

O exame cultural foi efectuado de acordo com os procedimentos estabelecidos pelo *Clinical and Laboratory Standards*

Figura 1: Algoritmo para o diagnóstico laboratorial das infeções fúngicas profundas.



Institute (CLSI) (3). Um primeiro relatório laboratorial foi emitido após 30 dias de incubação e um relatório final ao fim de 60 dias. Nas culturas em que se obteve isolados fúngicos, foi realizada a sua identificação através da observação das suas características macroscópicas (características da colónia) e do exame microscópico com coloração azul de lactofenol, utilizando para tal um atlas laboratorial de identificação fúngica (4).

Após extração de DNA, foi realizada PCR panfúngica a todas as amostras. Para tal, utilizaram-se os primers universais ITS1 e ITS2 (5). A identificação molecular dos fungos obtidos por cultura foi realizada utilizando a mesma metodologia de extração de DNA e usando os primers universais ITS1 e ITS4 (6).

No caso de suspeita de infeção por *Aspergillus*, foi realizado uma PCR usando *AsperGenius® multiplex real-time PCR* assay de acordo com as instruções do fabricante.

_Resultados

Foram analisadas 46 amostras de tecidos durante o período em estudo. Estas amostras foram obtidas de 39 pacientes (27 homens e 12 mulheres) com idades entre 1 e 85 anos. Os tecidos analisados foram colhidos por biópsia de: pele (n=17), fígado (n=6), gânglios (n=4), intestino (n=2), osso (n=2), nariz (n=3), cérebro (n=2), olho (n=1), lábio (n=1), pulmão (n=2), mediastino (n=1), palato (n=1), amígdala (n=1), estômago (n=1), rim (n=1) e região sinovial do punho (n=1). Das 46 amostras, 23 foram positivas para fungos (cultura, PCR e/ou histologia). Doze (26,1%) das 46 amostras de tecido tinham informação sobre o exame histológico, das quais 10 foram positivas para elementos fúngicos. Nas restantes 34 amostras (73,9%), o exame histológico não foi realizado ou o resultado não foi registado no inquérito que acompanhou as amostras.

Em relação à deteção de DNA fúngico, 16 (34,8%) amostras foram positivas. Destas, 12 foram detetadas por PCR panfúngica e 6 casos por PCR dirigida a *Aspergillus* (em 2 casos, ambos os testes foram realizados). Em todas as amostras positivas para PCR panfúngica foi possível identificar os agentes etiológicos por sequenciação. Foram identificados fungos filamentosos em 10 amostras (7 *Aspergillus fumigatus*,

1 *Alternaria infectoria*, 1 *Alternaria alternata*, 1 *Trichosporon rubrum*); fungos dimórficos em 2 amostras (1 *Histoplasma duboisii* e 1 *Paracoccidioides brasiliensis*) e leveduras em 4 amostras (1 *Candida albicans* e 3 *C. tropicalis*).

A cultura foi realizada em 36 (78,3%) amostras (tabela 1). Destas 36 amostras, 29 (80,5%) culturas permaneceram negativas após o período de incubação de 60 dias recomendado (tabela 1). No que respeita às culturas positivas, em 2 delas obtiveram-se apenas leveduras (*Candida* spp. e *Trichosporon montevidense*) e 3 foram positivas apenas para fungos filamentosos (2 para *Alternaria* spp. e 1 para *Exophiala* sp.). Foram obtidas culturas mistas em duas amostras: *C. albicans* e *Histoplasma* sp. (tecido do cólon) e *C. albicans* e *Trichoderma* sp. (tecido do nariz).

Tabela 1: Resultados do exame cultural e PCR obtidos na deteção de fungos em amostras de tecido.

	PCR positiva	PCR negativa	Total
Cultura positiva	4	3	7
Cultura negativa	11	18	29
Cultura não realizada	1	9	10
Total	16	30	46

_Discussão e conclusão

Ao comparar os resultados positivos obtidos por métodos culturais e/ou moleculares (n=19), a PCR mostrou maior número de casos positivos (n=16). A concordância dos resultados obtidos pelos métodos moleculares e culturais foi de 61% (22/36).

Em 3 amostras, obteve-se resultado negativo de PCR e cultura positiva. Esta situação pode dever-se a uma extração ineficiente de DNA. Em 11 amostras, a PCR foi positiva e a cultura negativa, o que pode dever-se à profilaxia antifúngica administrada ao doente aquando da colheita da amostra, ou eventual contaminação ambiental, apesar de se assegurar as condições de assépsia durante o processamento das amostras.

Com o algoritmo apresentado na **figura 1** sugere-se que, sempre que possível, se proceda à colheita de amostras de tecido em duplicado para cultura e PCR. Aconselha-se ainda, caso se justifique, a deteção de biomarcadores fúngicos. Caso também seja efetuada histologia, é de extrema importância notificar ao laboratório de referência o resultado da mesma, uma vez que irá permitir melhor interpretar os resultados laboratoriais obtidos. Pelo mesmo motivo, é importante referir profilaxia ou terapêutica antifúngica administrada à data da colheita da amostra biológica.

Os resultados obtidos mostraram que a abordagem polifásica (**figura 1**) parece ser uma boa estratégia na deteção de fungos em amostras de tecidos. Além disso, a utilização de uma PCR em tempo real para *Aspergillus* e Mucorales reforça esta estratégia, caso já exista suspeita de infeção por estes mesmos agentes, uma vez que por serem PCR dirigidas a agentes específicos, conseguir-se-á obter um resultado positivo de forma mais célere. Devido às recomendações internacionais para realizar testes de suscetibilidade aos antifúngicos em infeções fúngicas invasivas (7), o algoritmo aqui sugerido para a deteção de infeções fúngicas profundas inclui uma segunda etapa em que se aconselha a determinação da suscetibilidade dos agentes etiológicos.

Numa época em que se prevê um aumento da prevalência das infeções fúngicas invasivas, verifica-se uma evolução no seu diagnóstico laboratorial, com um maior número de metodologias moleculares disponíveis. Apesar da deteção de DNA fúngico ainda não fazer parte dos critérios de diagnóstico laboratorial da EORTC por falta de padronização dos métodos moleculares, é já evidente a importância destes métodos como meios complementares ao diagnóstico clínico.

Agradecimento:

À Doutora Cristina Furtado pela revisão científica do artigo.

Referências bibliográficas:

- (1) Badiie P, Hashemizadeh Z. Opportunistic invasive fungal infections: diagnosis & clinical management. *Indian J Med Res.* 2014;139(2):195-204. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4001330/>
- (2) De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP et 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/>
- (3) Clinical and Laboratory Standards Institute. Principles and procedures for detection of fungi in clinical specimens- direct examination and culture; Approved guideline. (CLSI document M54-A) Wayne, Pennsylvania: CLSI, 2012-
- (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) Buitrago MJ, Aguado JM, Ballen A, et al. Efficacy of DNA amplification in tissue biopsy samples to improve the detection of invasive fungal disease. *Clin Microbiol Infect.* 2013;19(6):E271-7. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12110>
- (6) 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.
- (7) Posteraro B, Torelli R, De Carolis E, et al. Antifungal susceptibility testing: current role from the clinical laboratory perspective. *Mediterr J Hematol Infect Dis.* 2014;6(1):e2014030. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4010604/>