

Mônica de Oliveira Santos



SBCSaúde
Sociedade Brasileira de Ciências aplicadas à Saúde

ATUALIZAÇÕES SOBRE O DIAGNÓSTICO



LABORATORIAL DE INFECÇÕES FÚNGICAS



Editora SBCSaúde



Atualizações sobre o diagnóstico laboratorial das
infecções fúngicas.

Mônica de Oliveira Santos



GO
SBCSAÚDE
2019

Copyright © da Editora SBCSaúde Ltda

Diagramação:

Capa:

Revisão:

Editora SBCSaúde
Bruno Lemes Marques
Corpo editorial

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO

S237

Atualizações sobre o diagnóstico laboratorial das infecções fúngicas/
Mônica de Oliveira Santos. 1 ed - Goiânia: SBCSaúde, 2019.

29 p.

Inclui Bibliografia

ISBN 978-65-80238-06-4

1. Diagnóstico 2. Infecções fúngicas

Índice para catálogo sistemático

1. Medicina e saúde 610

Editora SBCSaúde: <http://sbcsaude.org.br/>

Corpo Editorial

Dra. Adriana Alves de Meneses Delevedove – UNAERP - SP

Dra. Aline Helena da Silva Cruz/ UFG- GO

Dra. Aline Raquel Voltan/ UNIRV - GO

Dra. Aliny Pereira de Lima/ UFG- GO

Dra. Andrielle de Castilho Fernandes/ UNIFAN - GO

Dr. Aroldo Vieira de Moraes Filho/ UNIFAN - GO

Dr. Benedito Rodrigues da Silva Neto/ UFG – GO

Me. Carla Cardoso da Silva/ UNIFAN - GO

Dra. Carolline Silva Borges/ UFG- GO

Dra. Debora de Jesus Pires/ UEG - GO

Dra. Juliana Santana De Curcio/ UFG- GO

Dra. Lilian Carla Carneiro/ UFG- GO

Me. Lorena Motta da Silva/ UEG - GO

Dr. Lucas Silva de Oliveira/ UNB - DF

Dr. Luiz Paulo Araújo dos Santos/ UFG- GO

Dra. Mônica Santiago Barbosa/ UFG - GO

Dra. Patrícia Fernanda Zambuzzi Carvalho/ UFG- GO

*Corresponding author:

Mônica de Oliveira Santos.

MSc. Bioquímica e Biologia Molecular;

Ph.D Patologia Molecular e Bioquímica

PostDoc. Ciências da Saúde

Universidade Federal de Goiás – UFG

Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública – IPTSP, Goiânia, GO, Brazil.

Phone: +55 62 984234217.

E-mail address: mosbio21@gmail.com

Sumário

Capítulo 1. Introdução ao Diagnóstico das Infecções Fúngicas em Humanos.....	4
Capítulo 2. Características das Infecções Fúngicas.....	10
Capítulo 3. Características Gerais do Diagnóstico Laboratorial das Infecções Fúngicas.	14
<i>Referências</i>	26

Capítulo 1. Introdução ao Diagnóstico das Infecções Fúngicas em Humanos

As infecções fúngicas são mais conhecidas por “*Micoses*”. Essa palavra originase de *Mycosis*, do latim e foi proposta por Virchow¹, 1856 que fundamentou-se na origem (etimologia) grega da palavra *múkēs, ētos* (fungos) + *osis* (doença).

No Brasil, a população em geral associava os fungos apenas aos mofos das residências úmidas e as infecções de pele, as micoses de pele ou dermatofitoses, cujo interesse de controlar e buscar a “cura” era mais estético do que do clínico. A coceira e a descamação das dermatofitoses é bem tolerada no início e muitas vezes o tratamento é interrompido pelo paciente quando os sintomas desconfortáveis diminuem, tempos depois a infecção retorna.

A presença de infecções fúngicas respiratórias mais agressivas provocou uma necessidade maior nos grupos de pesquisa em micologia em aprofundar o conhecimento sobre os fungos patogênicos humanos. Nas últimas décadas houve um intenso aumento das pesquisas de caracterização, diagnóstico e tratamento de infecções fúngicas em geral. Esse desenvolvimento da pesquisa alertou a população para o perigo iminente que essas infecções podem causar, sobretudo em pacientes imunocomprometidos². As infecções fúngicas iniciam-se geralmente pelos pulmões, pela inalação de esporos presentes no ar, ou pela pele, através de fissuras ou cortes.

- Características do diagnóstico de infecções

O diagnóstico de uma infecção fúngica depende de alguns fatores, como:

1. Observação dos sinais e sintomas clínicos (febre, estertores, roncosp e alteração radiológica);
2. Isolamento e identificação fúngica compatível;
3. Demonstração de elementos fúngicos invadindo o tecido;
4. Semelhança morfológica do fungo isolado às características observadas no exame histopatológico ou no exame direto das amostras coletadas;

¹ Rudolf Ludwig Karl Virchow. Médico alemão considerado o pai da patologia moderna e da medicina social, além de antropólogo e político influente na época.

² Imunocomprometidos são os indivíduos que apresentam capacidade diminuída de seu sistema imune combater agentes agressores.

5. Resposta imunológica ao fungo identificado pelo exame direto.

Para a compreensão dos processos e etapas do diagnóstico das infecções fúngicas é necessário compreender alguns de seus aspectos gerais e a imunologia do hospedeiro. Os fungos podem utilizar como hospedeiros os seres humanos, os animais, os protozoários e as plantas.

- Características do sistema imune inato humano

A primeira linha de defesa contra organismos estranhos, os chamados antígenos, são barreiras teciduais, como a pele, que interrompe a entrada de antígenos no nosso corpo. Se, em algum momento essas barreiras são rompidas, o corpo contém células que respondem rapidamente à presença do invasor. Essas células incluem macrófagos e neutrófilos, que englobam organismos estranhos e os mata sem a necessidade de anticorpos. O organismo humano também produz moléculas solúveis que combatem os antígenos invasores. Essas moléculas podem bloquear a captação de nutrientes essenciais ao antígeno (ferro, cálcio, entre outras). Algumas dessas moléculas são encontradas nas superfícies de epitélios, nas secreções (lágrimas, saliva) e na corrente sanguínea. Esta forma de imunidade é o sistema imune inato ou não específico que está continuamente pronto para responder a uma invasão.

- Características do sistema imune adaptativo humano

A segunda linha de defesa é a imunidade adaptativa (adquirida) ou imunidade específica, que deve levar dias para responder a uma invasão primária (que é a infecção por um organismo que nunca foi visto antes). No sistema imune específico, nós vemos a produção dos anticorpos (proteínas solúveis que se ligam a antígenos estranhos) e respostas mediadas por células na qual células específicas reconhecem antígenos estranhos e os destroem.

Hoje sabemos que vírus ou tumores também são combatidos pelo sistema imune adaptativo. Nossas células do sistema imune fazem o reconhecimento e a destruição de células infectadas por vírus e de células reconhecidas como tumorais.

Após o primeiro contato com um antígeno um sistema de memória geralmente é ativado e no contato seguinte, o sistema imune adaptativo torna-se mais rápido e eficaz.

Isso ocorre pela ativação de linfócitos B (produtores de anticorpos e de memória) e linfócitos T (efetores e de memória). A produção de anticorpos, citocinas e outras moléculas auxiliam na marcação (opsonização) de antígenos e/ou células estranhas para sua destruição pelo sistema imune celular ou humoral (anticorpos).

- Componentes do Sistema imune humano

Algumas moléculas ou células são componentes efetivos nos dois sistemas (tabela 01), no entanto, a eficácia dessas moléculas ou células são fundamentais para que todo o processo seja eficaz, visto que os fungos apresentam vários mecanismos de escape ao sistema imune do hospedeiro.

Tabela 01: resumo dos principais componentes do sistema imune inato e adaptativo humano.

Componentes	Imunidade Inata	Imunidade Adaptativa
Células	Macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, células NK (natural killer), mastócitos, basófilos e eosinófilos.	Linfócitos T (CD4, CD8, Th1, Th2), Linfócito B, células NK, Linfócito T auxiliar; Linfócito T citotóxico, células dendríticas (APC), e outras.
Moléculas solúveis	Sistema complemento, proteínas, citocinas, quimiocinas e outros.	Anticorpos, citocinas, quimiocinas e outros.

Para o combate de fungos pelo sistema imune, é fundamental que a resposta classificada como Th1 seja ativada e eficaz. Essa resposta Th1 tem como produtos o IFN- γ e IL-2 e apresenta as funções de ativação de fagócitos e produção de anticorpos opsonizantes.

- Características que possibilitam aos fungos a escaparem do sistema imune humano

A resposta e combate aos fungos depende da morfologia deles. As células do sistema imune inato humano evoluíram para reconhecer e responder aos componentes da parede celular dos fungos. As células apresentam receptores de reconhecimento como: β -glucana, monose, dectina -1 e outros receptores como os TLRs (Toll like receptors). Uma vez que os receptores celulares reconhecem os componentes de membrana dos fungos, uma cascata de sinalização é iniciada. A resposta imune inata combate o fungo, e ativa o sistema imune adaptativo.

Para o estabelecimento e sobrevivência dos fungos no organismo humano, alguns mecanismos desenvolvidos por eles precisam ser efetivos e possibilitarem seu escape do sistema imune humano. Dentre estes mecanismos os principais são:

- ✓ Penetração e multiplicação em células, evitando os mediadores extracelulares produzidos pelo sistema imune inato ou adaptativo;
- ✓ Variação de antígenos de superfície, o que dificulta o reconhecimento e ativação de receptores do sistema imune;
- ✓ Evitar o reconhecimento pelos receptores das células de defesa, geralmente modificando ou revestindo sua estrutura de PAMP (Padrões Moleculares Associados a Patógenos).
- ✓ Modulação de sinais inflamatórios;
- ✓ Liberação de iscas GPA (glicoproteínas) que agem concorrendo no reconhecimento com o microrganismo;
- ✓ Internalização de células não-fagocíticas, e com isso escapar de mecanismos de defesa extracelulares;
- ✓ Modulação de TLR para infectar células e garantir sua multiplicação;
- ✓ Persistência nos macrófagos, utilizando essa célula como reservatório;
- ✓ Evasão do Sistema Complemento, através da ligação com os inibidores do complemento;
- ✓ Evasão da resposta inata, através da produção de moléculas de superfície anti-complemento, inibido a formação da C3 convertase³;

³ C3-convertase é uma enzima também conhecida como C4b2a. Ela catalisa a clivagem proteolítica de C3 em C3a e C3b, gerada durante a ativação do sistema complemento (sistema imune inato), tanto pela via clássica quanto pela via das lectinas.

- ✓ Modulação da apoptose, já que esta inibição mostrou prolongar a vida da célula e, assim, promover a difusão do parasita no hospedeiro;

Em humanos com imunodepressão ou imunossupressão os fungos encontram-se em vantagem para o desenvolvimento de uma infecção, inclusive aqueles considerados comensais e “normais” à microbiota humana.

- Causas da Imunodepressão

Qualquer patógeno precisa, antes de estabelecer uma infecção, neutralizar as barreiras de proteção inatas e adquiridas do organismo do hospedeiro.

Um indivíduo adulto sadio apresenta defesa celular e humoral bem caracterizada, isso porque seu organismo passa pelo reconhecimento de antígenos diversos desde o nascimento e “guarda” informações sobre esses antígenos por anos, e em caso de novo contato, o sistema imune ativo apresenta informações que agilizam o combate ao antígeno.

No entanto, algumas situações podem deixar o indivíduo com um sistema imune precário. A imunodepressão é caracterizada por um estado de uma resposta ineficiente ao combate de patógenos, classificada como:

1. Imunodepressão primária: quando fatores genéticos (geralmente modificações na tradução de genes) afetam o processo de produção e/ou diferenciação de moléculas ou células do sistema imune. O indivíduo torna-se mais susceptível, desde a infância, a infecções, ao desenvolvimento de doenças autoimunes e a neoplasias;
2. Imunodepressão adquirida: Quando algum fator externo torna o sistema imune ineficiente ao combate de patógenos em geral, como por exemplo, os indivíduos HIV positivos.

Já a imunossupressão é uma situação deliberadamente provocada para diminuir a resposta imune de um indivíduo. Isso ocorre com alguns fatores, como mostra o Quadro 01:

Quadro 01: Principais causas de imunossupressão do sistema imune humano.

- ✓ **Uso de medicamentos:**
 - Quimioterápicos para o combate de câncer;
 - Corticoides;
 - Inibidores de rejeição antes e após transplantes;
 - Inibidores de TNF (Fator de Necrose Tumoral);
- ✓ **Doenças ou Distúrbios do Sistema Imune:**
 - AIDS
 - Leucemias
 - Linfomas
 - Diabetes
 - Queimaduras extensas

Capítulo 2. Características das Infecções Fúngicas

- *As infecções fúngicas podem ser classificadas quanto ao tipo, como:*

- *Primárias*
- *Oportunistas*

As infecções fúngicas primárias, geralmente iniciam-se pela inalação de esporos que alcançam os pulmões e conseguem estabelecer uma infecção. A infecção pode provocar uma pneumonia localizada como primeira manifestação. O paciente pode ou não ser imunodeprimido.

Algumas infecções fúngicas podem apresentar uma distribuição geográfica característica, como por exemplo, a Paracoccidomicose, a Blastomicose, a Coccidioidomicose e a Histoplasmose. Essas micoses endêmicas⁴ são causadas por fungos dimórficos, que em contato com o organismo do hospedeiro humano se diferencia para adaptar-se, escapar das defesas do sistema imune e estabelecer a infecção.

Viajantes dessas regiões endêmicas podem ser infectados pelo fungo e desenvolver a infecção fúngica já em seu país de origem.

A Paracoccidioidomicose: limita-se à América do Sul e alguns países da América Central.

A Coccidioidomicose: limitada principalmente ao sudoeste dos EUA, Washington, norte do México e alguns países da Américas Central e da América do Sul.

A Histoplasmose: ocorre em todo o mundo e principalmente no leste e no meio-este dos EUA e em regiões das Américas Central e do Sul, África, Ásia e Austrália.

A Blastomicose: restringe-se à América do Norte e à África.

As infecções fúngicas oportunistas são causadas por fungos geralmente não patogênicos. Em indivíduos saudáveis, muitos fungos são encontrados em situação de

⁴ Diz-se endêmica ou endémica (do Grego en-, "em" + δῆμος, demos, "pessoas") que quando atinge uma população de uma região geográfica específica, sendo, então, considerada uma endemia.

comensalismo⁵ no organismo como componente da microbiota⁶ residente⁷ ou da transitória⁸.

Os fungos oportunistas quando em situação de infecção oportunista conseguem se desenvolver, escapando das defesas do organismo do hospedeiro. Dependendo do fungo e do local podem desenvolver infecções superficiais ou invadir tecidos disseminando-se causando infecções sistêmicas que provocam grandes danos ou levar a morte do indivíduo.

As infecções oportunistas mais prevalentes atualmente são a candidíase (*Candida albicans* e por outras espécies de *Candida*), a aspergilose (*Aspergillus fumigatus* e várias espécies do gênero *Aspergillus*), a criptococose (*Cryptococcus neoformans*) e as mucormicoses (*Rhizopus oryzae*).

- Quanto a localização, as infecções fúngicas podemos ser classificadas em:

- Superficiais: Ocorre nas camadas superficiais da pele e pelos.
- Cutâneas ou Dermatofitoses: Ocorre nas camadas mais profundas da pele, invadem unhas e pelos.
- Subcutâneas: Ocorre na derme, tecidos subcutâneos, músculos e fáscias⁹.
- Sistêmicas/Profundas: A infecção espalha por tecidos e órgãos internos.
- Oportunistas: Geralmente são fungos da própria microbiota do hospedeiro, porém, devido a uma diminuição da imunidade do hospedeiro, ocorre a infecção.

Cada fungo tem suas características peculiares que facilitam sua penetração e instalação em diferentes tecidos, estruturas e órgãos.

⁵ O Comensalismo é uma relação interespecífica (espécies diferentes) na qual apenas uma das espécies (comensal) é beneficiada enquanto a outra espécie (hospedeira) é indiferente.

⁶ O termo “flora” caiu em desuso visto que antigamente, bactérias e alguns fungos eram considerados no reino das plantas. Atualmente o termo flora foi substituído por microbiota.

⁷ A Microbiota residente é formada por microrganismos que estabelecem colônias permanentes dentro ou sobre o corpo sem produzir doenças, compondo a microbiota “normal” do corpo.

⁸ A Microbiota transitória é composta pelos microrganismos que estão presentes por períodos variáveis, dependendo do ambiente, sua contaminação, podendo desaparecer temporariamente.

⁹ Todo o corpo é estruturado e envolvido pelo tecido conectivo, ou fascia, criando um conjunto estrutural que dá forma e função a cada tecido e órgão.

Ao entrar em contato com a célula ou tecido do hospedeiro, os fungos modificam sua expressão gênica e produzem várias proteínas e enzimas específicas, como visualizado na figura 01. Essas substâncias atuam na adesão, na hidrólise, remodelamento da parede fúngica, degradação de substâncias do sistema imune do hospedeiro, adaptação de fontes de carbono e de pH ideais para o desenvolvimento do fungo. Em todas as etapas ocorre o ataque ao fungo pelo sistema imune do hospedeiro.

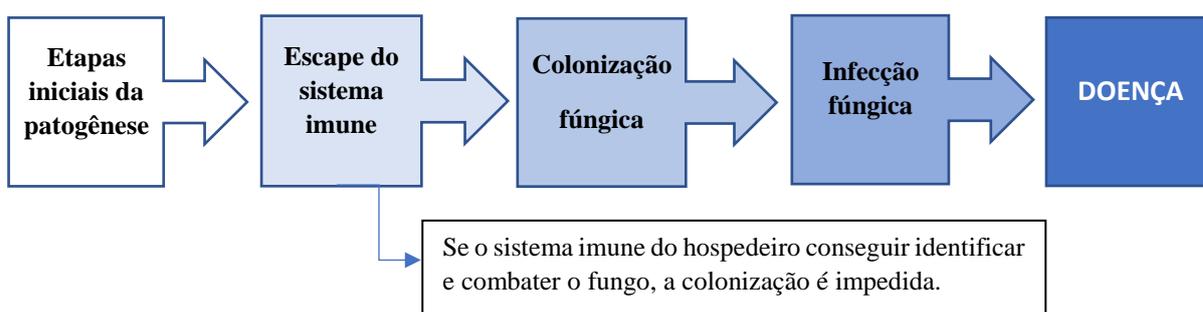


Figura 01: Etapas básicas para o estabelecimento de uma infecção fúngica.

- Formação de biofilmes por fungos

Alguns fungos podem formar biofilmes e estabelecer infecções resistentes e graves em hospedeiros. Exemplo disso são os biofilmes de *Candida albicans* que normalmente colonizam o corpo humano sem causar danos. No entanto, em desequilíbrio do sistema imune do humano, o fungo pode aumentar sua adesão (produção de enolase) e colonização no intestino e a partir dele alcançar a corrente sanguínea causando a candidemia, que é de difícil tratamento e alta mortalidade.

Existem muitas vantagens para os microrganismos produzirem biofilmes principalmente para a sobrevivência e proteção contra alterações no meio ambiente. As etapas para a formação de biofilmes são observadas na figura 02.

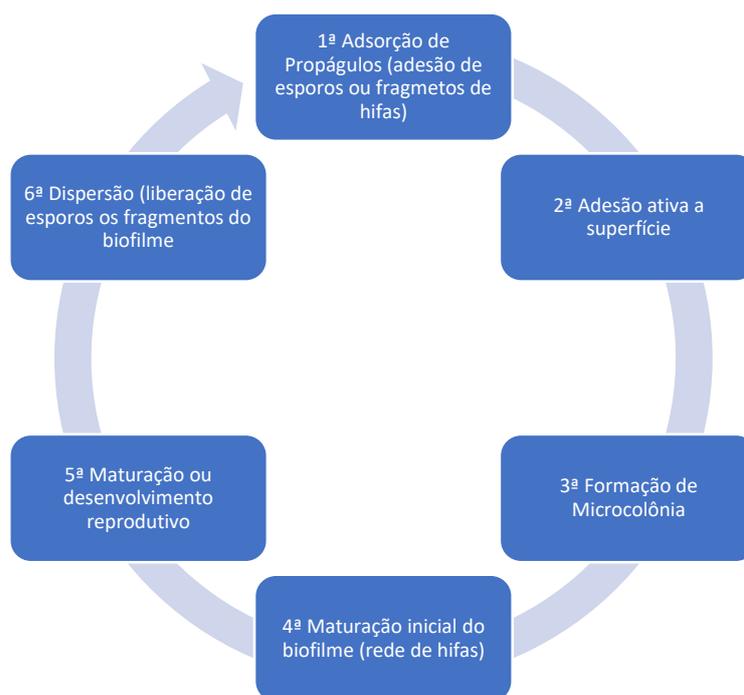


Figura 02: Resumo das etapas para formação de biofilmes por microrganismos.

A observação das particularidades do biofilme de fungos pode auxiliar em seu diagnóstico e identificação, como podemos observar no experimento publicado por (Sherry, et al. 2017), figura 03:

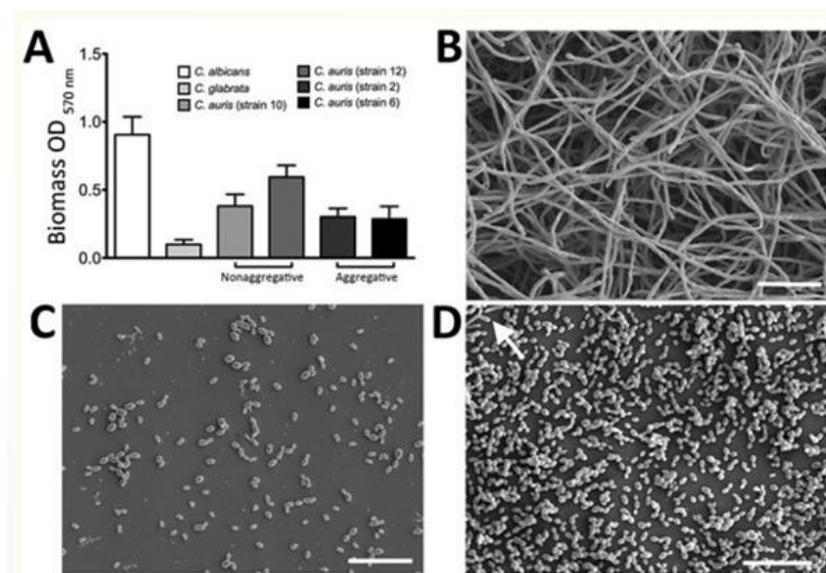


Figura 03: Formação de biofilme em linhagens de leveduras *Candida auris*, *C. albicans* e *C. glabrata*. A) As quantidades de biomassa foram determinadas espectrofotometricamente para 4 linhagens de *C. auris* e 1 de *C. albicans* e *C. glabrata*. Os resultados mostram que *C. auris* pode formar biofilmes intermediários heterogêneos. B-D) *C. albicans*(B), *C. glabrata* (C) e *C. auris* (D).

Capítulo 3. Características Gerais do Diagnóstico Laboratorial das Infecções Fúngicas.

Para o sucesso do diagnóstico laboratorial das infecções fúngicas é fundamental uma anamnese detalhada do paciente. Verificar a história clínica e epidemiológica e os achados dos exames de imagem podem orientar a equipe médica para a melhor abordagem diagnóstica. Esses dados indicam o processamento mais adequado para o esclarecimento etiológico, incluindo a escolha da técnica para o exame microscópico (visualização do fungo em sua morfologia parasitária) e a escolha do meio de cultivo a temperatura e o tempo de incubação (isolamento do fungo para posterior identificação).

Infelizmente no Brasil, na maioria dos centros hospitalares o processo de coleta, análise e técnicas diagnósticas são realizadas em etapas separadas e é muito comum que, o médico clínico, o patologista e o micologista/microbiologista trabalhem isoladamente no diagnóstico da doença. A falta de informações e/ou incoerência causam atrasos e falhas no diagnóstico, provocando maior tempo de internação hospitalar e agravamento do quadro clínico do paciente.

Alguns fungos possuem morfologia muito distinta e de fácil caracterização. A facilidade de crescer em meio de cultivo também é uma característica que auxilia na identificação de alguns fungos.

Para o sucesso do diagnóstico fúngico, o tipo e a qualidade da amostra biológica coletada e submetida ao laboratório de micologia são fatores fundamentais para o sucesso no isolamento e na identificação do agente etiológico. Além disso, fatores básicos como a assepsia antes da coleta e a quantidade da amostra garantem maior exatidão no diagnóstico.

- Tipos de Diagnóstico laboratorial para as infecções fúngicas

Atualmente, existem normas e diretrizes bem definidas para otimizar o diagnóstico laboratorial das infecções fúngicas. Essas diretrizes incluem a identificação, a sorologia, o diagnóstico molecular e testes de sensibilidade do patógeno. No entanto, pesquisas recentes demonstraram que em vários países, inclusive, no Brasil, existe a falta de padronização dos testes preconizados, bem como o baixo acesso aos testes de

diagnóstico avançados, como os de reação da polimerase em cadeia (PCR), espectroscopia de massa e de antígenos específicos¹⁰ como de galactomanano e de beta-D-glucano.

A utilização da intradermoreação para identificação de fungos está caindo em desuso visto que, não se trata de uma prova muito sensível, nem muito específica.

A identificação ideal de um fungo deve apresentar o Gênero e a espécie, seguir etapas bem definidas pode ser fundamental nesse processo, como por exemplo na figura 02:

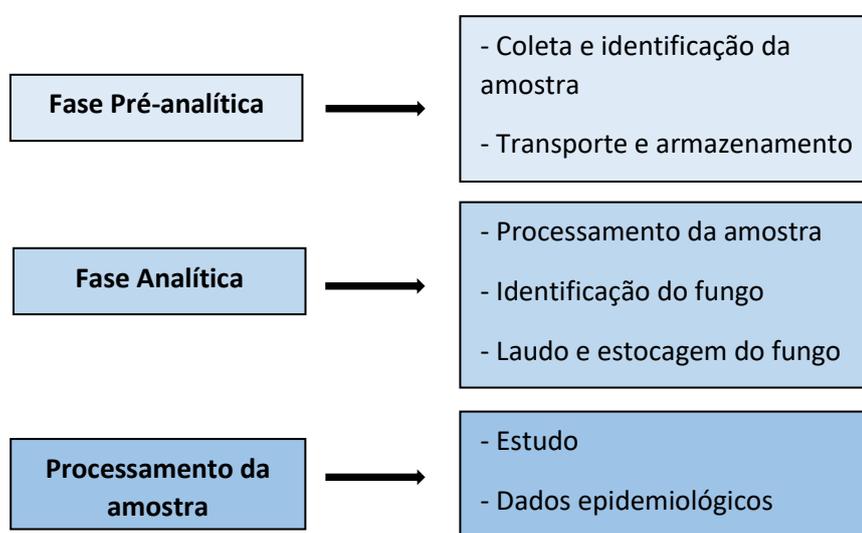


Figura 02: Modelo de etapas para a identificação de fungos em laboratório.

Em um processo de organização podemos mensurar melhor o tempo de cada etapa e viabilizar recursos paliativos até que o laudo seja entregue. A fase de processamento da amostra tem subfases que distinguem o passo-a-passo que determinam a identificação correta de um fungo.

Existem fungos que são muito difíceis de se identificados em nível de espécie. Exemplo disso é o boletim de risco liberado em 2017 pela Anvisa (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), onde a identificação de infecções suspeitas por *Candida auris*¹¹

¹⁰ Os antígenos específicos são moléculas e/ parte da parede celular do fungo que podem ser reconhecidas por anticorpos comerciais ou produzidos pelo organismo do ser vivo hospedeiro.

¹¹ *Candida auris* é um fungo identificado pela primeira vez em 2009. A gravidade da infecção por esse fungo é o fato dele ser multiresistente aos agentes antifúngicos existentes.

deve ser realizada nos laboratórios de referência nacional e por metodologia específica, como observamos:

“Essa identificação deve ser feita utilizando MALDI-TOF e por sequenciamento da região D1-D2 ou ITS, pois outros métodos de diagnóstico de rotina podem identificá-la erroneamente como outras espécies. Na dependência do sistema comercial utilizado e da versão do banco de dados disponível no sistema, pode haver identificação incorreta de *C. auris* confundindo-a com as seguintes espécies: *Candida haemulonii*; *Candida famata*; *Candida sake*; *Candida catenulata*; *Candida lusitanae*; *Candida guilliermondii* (Usuários Microscan); *Saccharomyces cerevisiae*; *Rhodotorula glutinis* (Usuários API-20C)”.

- As técnicas empregadas para identificação de fungos atualmente são:

- Observação macroscópica (Exame direto) do fungo:

Observar o fungo em crescimento pode trazer várias informações importantes para sua identificação. No entanto, a cultura precisa ser pura para evitar erros na identificação sugestiva do fungo.

Para fungos filamentosos é importante verificar as características da cultura quanto a:

- Textura: algodonosa, penugenta, velutina, pulverulenta (furfarácea), arenosa ou glabrasas.

- Relevo: cerebriforme, rugoso, apiculado ou crateriforme.

- Borda: vários desenhos (franjas).

- Pigmentação: anverso e reverso, difusível ou não difusível.

Tamanho: variável (quantidade e qualidade de substrato).

Para a identificação de fungos leveduriformes cultivados em meio sólidos devemos observar a textura, a topografia, a borda e a coloração da cultura e em cultura com meios líquidos a formação de película.

- Visualização direta do fungo e análise histopatológica por microscopia óptica:

Alguns fungos têm aspecto morfológico bem distinto e o exame microscópico pode ser bastante útil, além de rápido e barato possibilita um retorno de informações rápidas ao médico, indicando se realmente se trata de uma infecção fúngica e até delimitando o diagnóstico há alguns gêneros.

Para a visualização microscópica do fungo é necessário que haja uma coleta de amostra em quantidade suficiente. A coleta, o transporte e o armazenamento da amostra devem evitar a deterioração e contaminação cruzada do material. Existem vários kits no mercado que fornecem agulhas, swabs¹² e frascos que possibilitam essas etapas serem realizadas com segurança.

No laboratório microbiológico, as amostras coletas são espalhadas em lâminas e ocorre a tentativa de visualização no microscópio óptico. Geralmente, a maioria das amostras de fungos não permite a visualização do material “à fresco”, seja por falta de coloração e contraste das estruturas ou pelo tipo de amostra ou periculosidade, e, portanto, as amostras espalhadas são fixadas e coradas em lâminas de microscopia e visualizadas em microscópio óptico. De acordo com o tipo de amostra, local do corpo onde foi coletado e suspeita clínica pode-se definir a técnica e/ou tipo de corante a ser usado na amostra, como observado na Tabela 02.

Os corantes são classificados em ácidos ou básicos e podem corar estruturas reprodutivas e vegetativas de fungos auxiliando na sua caracterização morfológica e posterior identificação. Os fungos podem ser corados com: tinta de nanquim, Giemsa, Gram (cristal violeta, lugol, safranina ou fucsina), lactofenol de Amann com azul de algodão, entre outros.

¹² O swab é um tipo de haste com algodão em uma das extremidades. Ele possibilita a coleta de amostras de secreções para a verificação da presença de microrganismos.

Tabela 02: Algumas técnicas resumidas utilizadas por pesquisadores para a identificação de fungos em amostras clínicas.

Tipo de material	Procedimento*
Amostra de tecido obtido por biópsia, exsudatos espessos e outros materiais densos; exame de pelos, pele e unha.	Preparar a amostra com KOH** em solução aquosa a 20%. Visualizar a amostra com objetiva de 10x, seguida de 40x e se necessário 100x.
Amostras de líquido, urina, secreções ou exsudatos; Suspeita de infecção por leveduras.	Centrifugar a amostra e colocar um pouco de sedimento em lâmina com tinta de Nanquim (tinta da China).
Amostras de urina, secreções e fezes.	A coloração por Gram possibilita a confirmação da presença de fungos, diferenciando-os de artefatos presentes nas amostras. As amostras são fixadas na lâmina de microscopia, corados lugol e fucsina e descoradas com metanol.
Amostras de medula óssea, sangue, aspirados e secreção cutânea.	As amostras são fixadas na lâmina de microscopia, corados e descoradas com metanol. Pode-se usar corantes panóticos (Giemsa, Leishman ou Wright).

* Para todos os procedimentos, as amostras são espalhadas na lâmina de microscopia e fixada. Após a fixação as soluções e/ou corantes são impregnados na lâmina com a amostra. A visualização é feita com a objetiva de 10x e depois com a 40x. É fundamental diferenciar o fungo pela sua refringência da parede celular, inclusões citoplasmáticas e presença de brotamentos (leveduras), hifas (micélios) e estruturas de reprodução como os conídios. A concentração de KOH pode variar entre 10 a 40% dependendo do tipo de amostra.

Para a identificação de fungos filamentosos a observação microscópica do fungo vai se basear nas diferenças morfológicas das estruturas reprodutivas e na ontogenia¹³ dos esporos, como pode ser visto na figura 03.

Para a identificação de fungos leveduriformes a caracterização microscópica, tanto das células nas preparações diretas como no microcultivo em lâmina, vão basear a observação de: característica da célula (levedura), presença de blastóporos¹⁴, pseudo-hifas, tubos germinativos, clamidósporos, artrósporos, ascos, ascoporos e cápsula.

Em algumas situações de suspeita de alterações ou infecções profundas é necessário a coleta e exame de esfregaços ou pequenos cortes de tecidos. O tecido é preparado e submetido a microcortes, fixado em lâminas de microscopia, corado e

¹³ Ontogenia diz respeito à origem e ao desenvolvimento de uma estrutura.

¹⁴ Blastóporos ou blascotoconídio são esporos assexuados que se formam por brotamento nas leveduras.

observado em microscópio óptico. Em caso de infecção fúngica sistêmica é possível observar inclusões de fungos dentro do tecido.

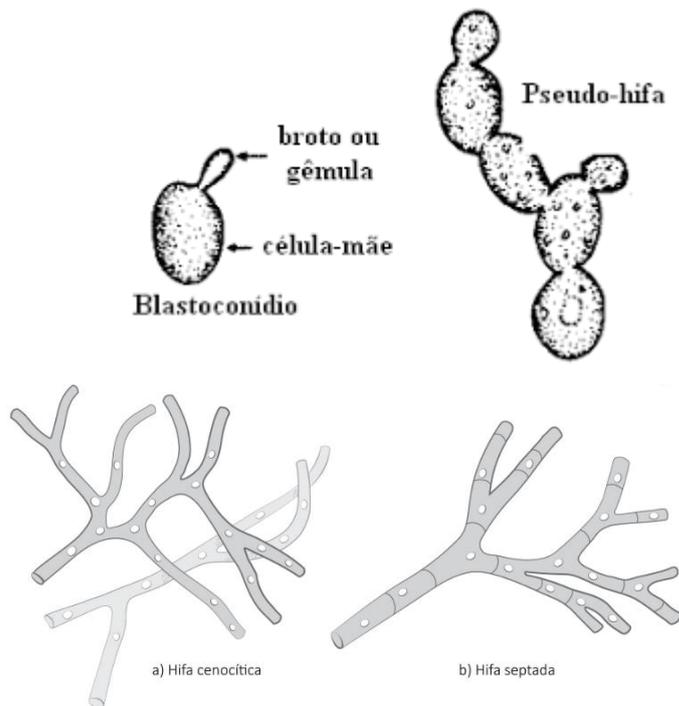


Figura 03: Algumas estruturas observadas nos fungos quando visualizados em microscopia óptica.

- Cultura de amostras para identificação de fungos

A cultura é considerada ainda como “padrão ouro” no diagnóstico de fungos. Apesar de ter resultado lento, é realizada em praticamente todos os laboratórios no mundo. Mesmo que o fungo tenha sido identificado na visualização por microscopia é preconizado que a amostra seja colocada em meio de cultivo para o crescimento e identificação dos fungos. A escolha do meio de cultivo depende das informações clínicas e tipo de amostra recebida.

O primeiro cultivo geralmente é feito em meio Sabouraud. Após o crescimento, uma amostra é analisada para verificar aspectos do fungo em desenvolvimento. Em seguida pode ser necessário transferir uma parte do fungo para outro meio de cultivo específico, com antibióticos e/ou corantes. Assim observa-se características específicas do desenvolvimento do fungo auxiliando em sua identificação e testando sua sensibilidade a antifúngicos.

Em suspeita de infecção por fungos dimórficos é imprescindível a conversão de formas micélio/levedura para a correta identificação do agente etiológico. São exemplos de fungos dimórficos: *Paracoccidioides brasiliensis*, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis*, *Candida albicans* entre outros.

- Provas bioquímicas para identificação de fungos

Os fungos são seres heterótrofos, ou seja, precisam absorver nutrientes do meio ambiente, como os carboidratos para produção de energia. Suas células apresentam organelas e funcionamento semelhante a célula animal, portanto os fungos absorvem nutrientes, metabolizam-nos e liberam compostos secundários, enzimas e gás carbônico.

Conhecendo as reações metabólicas das células fúngicas pode-se prever reações específicas de um determinado gênero de fungos e até mesmo diferenciar espécies quando se usa várias provas bioquímicas.

As leveduras podem ser muito semelhantes quando observadas em microscopia e cultivo. Para a identificação das mesmas algumas provas bioquímicas podem ser conclusivas. Geralmente testa-se os fungos quanto a assimilação de nitrato, fermentação de alguns carboidratos, produção de enzimas, como a urease (zimograma), reações de oxidação com alguns compostos, como o fenol-oxidase, entre outras.

Geralmente, são feitas combinações de testes. Quadro 02:

- ✓ **Auxonograma:**
- Diluir uma suspensão de células do fungo e verificar sua turbidez em espectrofotômetro ajustando para cerca de 10^6 ufc/mL;
- ✓ **Testes e observação:**
- Presença de oxigênio na amostra;
 - Utilização de fontes de:
 - Carbono (teste com diferentes açúcares)
 - Nitrogênio (teste com nitrato)

Para direcionar os testes bioquímicos utiliza-se “mapas de leitura” de testes, como demonstrado na figura 04.

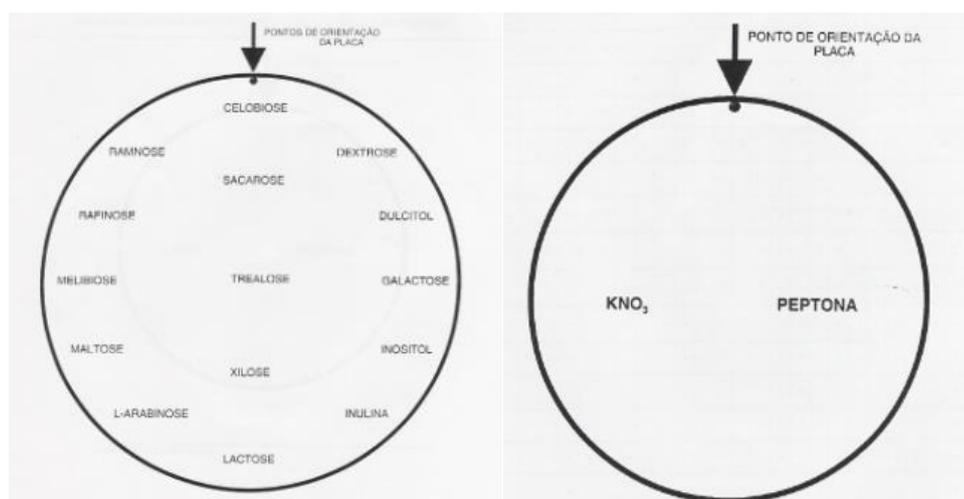


Figura 04: A esquerda observamos o mapa de leitura dos testes de assimilação de carboidratos e a direita o mapa de leitura do teste de assimilação de nitrogênio.

Os testes eficazes para determinação da maioria dos fungos. Entretanto isolados clínicos podem apresentar alteração de sua expressão gênica dificultando sua identificação. Nos casos de dúvida na identificação dos fungos mesmo após as provas bioquímicas é fundamental utilizar as técnicas avançadas de diagnóstico.

- Testes sorológicos para o diagnóstico de fungos

Os testes sorológicos são bem padronizados para o diagnóstico de infecções fúngicas. Podemos citar vários tipos de testes, que isoladamente apresentam cada um vantagens e desvantagens. Alguns métodos já são utilizados como referência nos serviços de saúde para pesquisa de antígenos e anticorpos específicos nas infecções fúngicas, como a imunodifusão dupla (ID), contraímuno eletroforese (CIE), imunofluorescência indireta (IFI), ensaio imunoenzimático (ELISA) e imunoBlot (IB).

De todos dos testes sorológicos, atualmente o mais usado é o ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) que é bem sensível. As vantagens: barato, rápido e adequado para a análise de grande quantidade de amostras de soros, sendo o preferido dos testes para alguns laboratórios de triagem públicos e particulares.

Os testes sorológicos associados à clínica e informações extras podem ser muito interessantes na confirmação de diagnósticos. Em casos específicos como em pacientes imunodeprimidos, ocorre uma variação grande na sensibilidade e especificidade. Outras técnicas de diagnósticos devem ser utilizadas.

Existem parâmetros de validação para os testes sorológicos, cada técnica é planejada e desenvolvida com esses parâmetros antes de irem ao mercado para serem usados na população. São eles:

1. Sensibilidade Analítica:

Corresponde a menor concentração de analito que o teste consegue detectar, gerando um resultado positivo (reagente);

2. Especificidade Analítica:

Capacidade do teste de identificar especificamente um determinado analito para o qual ele foi desenvolvido;

3. Precisão (Reprodutibilidade)

Grau de concordância entre determinações repetidas;

4. Exatidão (Acurácia)

Grau de concordância entre o resultado de uma medição e o valor verdadeiro (nominal, real, referência).

No Brasil, a FIOCRUZ (Fundação Osvaldo Cruz) recebe amostras de todo o país em caso de suspeitas graves e realiza as seguintes técnicas: Sorologia (imunodifusão) para paracoccidiodomicose; sorologia (imunodifusão) para histoplasmose; sorologia (imunodifusão) para coccidiodomicose; exame micológico direto e cultivo de fungos.

- Diagnóstico fúngico por espectrometria de massa MALDI-TOF

Para auxiliar no diagnóstico preciso de vários fungos foi desenvolvido protocolos para o uso da espectrometria de massa MALDI-TOF, uma metodologia que permite a identificação de gênero e espécie correta do agente etiológico em apenas 30 minutos.

O equipamento recebe um software com uma matriz de dados sobre a estrutura e comportamento molecular de microrganismos diversos. Uma vez que o equipamento consegue definir exatamente a espectrometria de massa referente ao fenótipo do agente etiológico molde, as amostras podem ser preparadas e colocadas no aparelho para a identificação do agente etiológico em nível de gênero e espécie.

Poucos laboratórios no mundo possuem esse equipamento de espectrometria de massa voltado para a identificação de microrganismos, o alto custo do equipamento, a necessidade de técnicos treinados e a obtenção de kits de calibragem fenotípica ainda são fatores que dificultam sua ampla utilização.

Vários grupos de pesquisa vêm desenvolvendo e demonstrando o aperfeiçoamento de matrizes de informações fenotípicas de microrganismos. Para cada microrganismo, inclusive cepas, é necessário que a estrutura seja calibrada no aparelho.

Acredita-se que com o avanço e domínio da técnica de espectrometria de massa de ionização e suas variações (dessorção a laser assistida por matriz) e a determinação de protocolos mais abrangentes, o custo benefício de se utilizar essa técnica será muito atrativa nos próximos anos.

- Diagnóstico molecular por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

As reações moleculares de genotipagem são altamente específicas e incomparavelmente melhores que as culturas e observações de fenotipagem dos fungos.

Muitos grupos de pesquisa e empresas de biotecnologia vêm testando e demonstrando a utilização precisa e rápida de sequências de DNA de microrganismos para sua identificação em gênero e espécie.

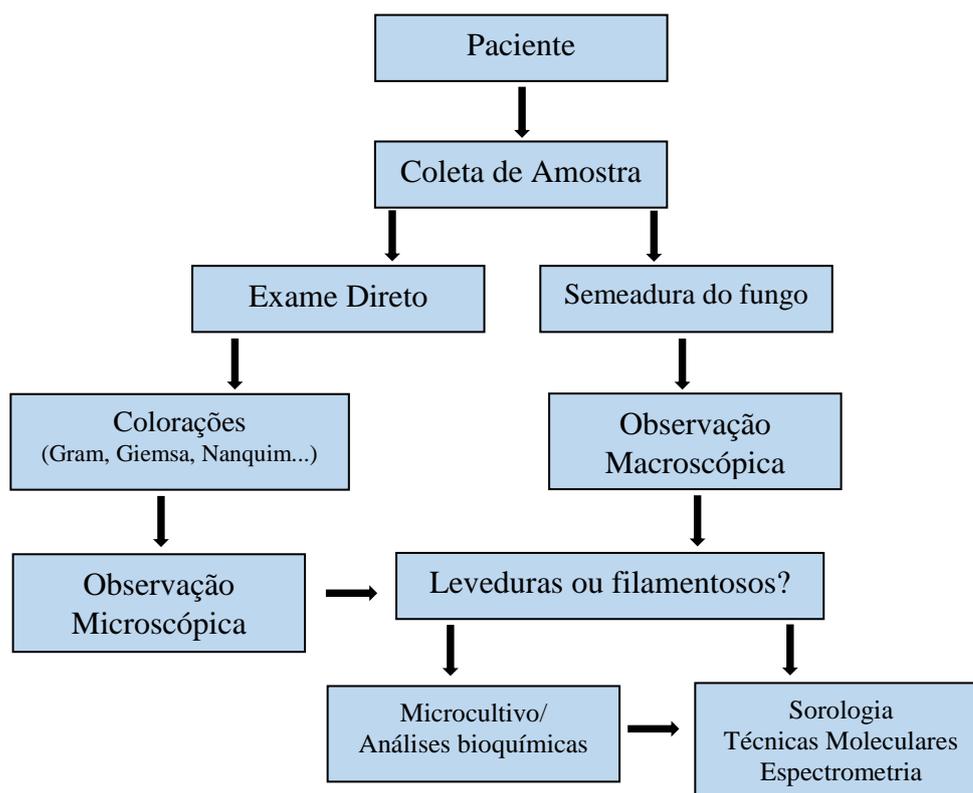
Já existem primers comerciais para sequências de rDNA¹⁵ para identificação de várias espécies de bactérias e fungos. Uma reação de PCR multiplex pode ser realizada em cerca de 4 horas, mas é necessário que o DNA do fungo seja extraído o que aumenta em cerca de mais 2 horas o processo. Com relação ao custo benefício da técnica de PCR simples ou multiplex observamos que a maior dificuldade no momento é o incentivo e mudança das rotinas laboratoriais para a implementação das técnicas de PCR como rotina no diagnóstico laboratorial de microrganismos.

¹⁵ DNA ribossomal. Usado em experimentos de polimorfismos de nucleotídeo único (SNP).

- *Resumo das principais etapas do diagnóstico laboratorial de fungos*

O diagnóstico laboratorial definitivo pode ser realizado de forma direta, através da pesquisa do microrganismo, ou indireta, através da busca de resposta específica do hospedeiro ao fungo. No entanto, cabe ressaltar que a interpretação dos achados laboratoriais deve ser feita à luz da história clínico-epidemiológica. A triagem soromicológica, a histopatologia (reação tecidual e documentação dos elementos fúngicos nos tecidos) e o resultado do exame microscópico direto orientarão a correta interpretação dos achados laboratoriais e a decisão terapêutica inicial. Os resultados dos cultivos corroborarão ou modificarão essa decisão. Cabe ao microbiologista alertar o médico se o resultado do teste é suficiente ou não para embasar a ação terapêutica.

Para alguns fungos a identificação de gênero e espécie é complexa exigindo várias etapas para se obter a identificação correta e segura deste. Observamos na figura 05 um esquema resumido das etapas possíveis para identificação de fungos.



Referências

ABBAS, A. K. Lichtman. A. H. *Imunologia Celular e Molecular*. 7º Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.

ALMEIDA, S. R. *Micologia*. Editora Guanabara Koogan. 2008.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. COMUNICADO DE RISCO Nº 01/2017. Relatos de surtos de *Candida auris* em serviços de saúde da América Latina. Brasília - 14 de março de 2017. Disponível em:

<<https://www20.anvisa.gov.br/segurancadopaciente/index.php/alertas/item/comunicado-de-risco-01-2017-candida-auris>>.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Detecção e Identificação dos Fungos de Importância Médica, volume VII. 2004. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/microbiologia/mod_7_2004.pdf>

BUENTKE E, HEFFLER LC, WILSON JL, WALLIN RP, LÖFMAN C, CHAMBERS BJ, LJUNGGREN HG, SCHEYNIUS A. Natural killer and dendritic cell contact in lesional atopic dermatitis skin--Malassezia-influenced cell interaction. *J Invest Dermatol*. 2002 Oct;119(4):850-7. doi: 10.1046/j.1523-1747.2002.00132.x. PubMed PMID: 12406330.

BUZINA W, BRAUN H, FREUDENSCHUSS K et al. Fungal biodiversity—as found in nasal mucus. *Med Mycol*. 2003; 41: 149–161.

CASSAGNE C, NORMAND AC, L'OLLIVIER C, RANQUE S, PIARROUX R. Performance of MALDI-TOF MS platforms for fungal identification. *Mycoses*. 2016 Nov;59(11):678-690. doi: 10.1111/myc.12506. Review. PubMed PMID: 27061755.

CHOWDHARY A, AGARWAL K, KATHURIA S et al. Allergic bronchopulmonary mycosis due to fungi other than *Aspergillus*: a global overview. *Crit Rev Microbiol*. 2014; 40: 30–48.

CRIADO PR, OLIVEIRA CB, DANTAS KC, TAKIGUTI FA, BENINI LV, VASCONCELLOS C. Micoses superficiais e os elementos da resposta imune. *An Bras Dermatol*. 2011;86(4):726-31.

CUI L, LUCHT L, TIPTON L et al. Topographic diversity of the respiratory tract mycobiome and alteration in HIV and lung disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2015; 191: 932–942.

DELIZOICO V. *História da Ciência e Ensino*. Volume 12, 2015 – pp. 14-34.

DICKSON RP, MARTINEZ FJ, HUFFNAGLE GB. The role of the microbiome in exacerbations of chronic lung diseases. *Lancet*. 2014; 384: 691–702.

FRACZEK MG, CHISHIMBA L, NIVEN RM et al. Corticosteroid treatment is associated with increased filamentous fungal burden in allergic fungal disease. *J Allergy Clin Immunol*. 2018; 142: 407–414.

FRANCO, B. D. G. M; LANDGRAF, M. Microbiologia dos Alimentos. São Paulo: Editora Atheneu, 2008.

HARDING, M. W. et al. Can Filamentous Fungi Form Biofilms? Trends in Microbiology, volume 17, número 11, páginas 475-480. 2009.

KAUFFMAN CA, MARR KA, MITTY J. Pathogenesis and clinical features of pulmonary histoplasmosis, UpToDate. Waltham, MA: UpToDate Inc.; 2017.

LACAZ C.S., PORTO, E., MARTINS, J.E.C., Heins-Vaccari, E.M. and Melo, N.T. Tratado de Micologia Médica, 9a ed., Sarvier, São Paulo, 2002.

LIMON JJ, SKALSKI JH, UNDERHILL DM. Commensal Fungi in Health and Disease. Cell Host Microbe. 2017 Aug 9;22(2):156-165. doi: 10.1016/j.chom.2017.07.002.

MAFIA, R.G.; ALFENAS, A.C. Preparações e observações microscópicas de espécimes fungicas. In.: ALFENAS, A.C.; MAFIA, R.G. (2ª Ed.). Métodos em fitopatologia. Viçosa, MG: Editora UFV. p.207-223. 2016.

MÁIZ L, NIETO R, CANTÓ R et al. Fungi in bronchiectasis: a concise review. Int J Mol Sci. 2018; 19: e142

OLIVEIRA, JEFERSON CARVALHAES. Tópicos em Micologia Médica. Rio de Janeiro: J. Carvalhaes de Oliveira; 2012. Disponível em: < http://www.iqg.com.br/uploads/biblioteca/topicos_micologia_3ed.pdf>.

RICHARDSON M, BOWYER P, SABINO R. The human lung and Aspergillus: You are what you breathe in? Med Mycol. 2019 Apr 1;57(Supplement_2):S145-S154. Rudolf Virchow, divulgador científico? Reinaldo Guilherme Bechler Demétrio

RUJIRAWAT T, SRIDAPAN T, LOHNOO T, YINGYONG W, KUMSANG Y, SAE-CHEW P, TONPITAK W, KRAJAEJUN T. Single nucleotide polymorphism-based multiplex PCR for identification and genotyping of the oomycete *Pythium insidiosum* from humans, animals and the environment. Infect Genet Evol. 2017

RUJIRAWAT T, SRIDAPAN T, LOHNOO T, YINGYONG W, KUMSANG Y, SAE-CHEW P, TONPITAK W, KRAJAEJUN T. Single nucleotide polymorphism-based multiplex PCR for identification and genotyping of the oomycete *Pythium insidiosum* from humans, animals and the environment. Infect Genet Evol. 2017 Oct;54:429-436.

SCHUBERT S, KOSTRZEWA M. MALDI-TOF MS in the Microbiology Laboratory: Current Trends. Curr Issues Mol Biol. 2017;23:17-20. doi: 10.21775/cimb.023.017. Epub 2017 May 15. Review. PubMed PMID: 28504240.

SCHUBERT S, KOSTRZEWA M. MALDI-TOF MS in the Microbiology Laboratory: Current Trends. Curr Issues Mol Biol. 2017;23:17-20. doi: 10.21775/cimb.023.017.

SEARS D, SCHWARTZ BS. *Candida auris*: An emerging multidrug-resistant pathogen. *Int J Infect Dis.* 2017 Oct;63:95-98. doi: 10.1016/j.ijid.2017.08.017. Epub 2017 Sep 6. Review. PubMed PMID: 28888662.

SHERRY, L et al. “Biofilm-Forming Capability of Highly Virulent, Multidrug-Resistant *Candida auris*.” *Emerging infectious diseases* vol. 23,2 (2017): 328-331. doi:10.3201/eid2302.161320

TONG X, XU H, ZOU L et al. High diversity of airborne fungi in the hospital environment as revealed by meta-sequencing-based microbiome analysis. *Sci Rep.* 2017; 7.

XAVIER, M, O; OLIVEIRA, F. M.; SEVERO, L. C. Capítulo 1: diagnóstico laboratorial das micoses pulmonares. *J. bras. pneumol.* São Paulo, v. 35, n. 9, p. 907-919, set. 2009. Disponível em:
<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1806-37132009000900013&lng=en&nrm=iso>.