

PERFIL EPIDEMIOLÓGICO DE FUNGEMIA EM HEMOCULTURA AUTOMATIZADA E EM CULTURA MICOLÓGICA

EPIDEMIOLOGICAL PROFILE OF FUNGEMIA IN AUTOMATED HEMOCULTURE AND MYCOLOGICAL CULTURE

PERFIL EPIDEMIOLÓGICO DE FUNGEMIA EN HEMOCULTURA AUTOMATIZADA Y CULTIVO MICÓLICO

Vanessa Caroline Randi Magalhães

Bioquímica e Pesquisadora do Departamento de Microbiologia, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e da Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais FHEMIG- FHEMIG, Belo Horizonte, MG, Brasil

Daniel Assis Santos

Professor e Pesquisador do Departamento de Microbiologia, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG, Brasil

AGRADECIMENTOS

À Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais e ao Hospital Eduardo de Menezes.



Este é um artigo de acesso aberto distribuído sob os termos da Creative Commons Attribution License
This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License
Este es un artículo de acceso abierto distribuido bajo los términos de la Creative Commons Attribution License

RESUMO

As micoses sistêmicas representam um desafio mundial para a saúde humana devido sua capacidade de disseminação e pelo alto potencial de mortalidade quando não ocorre a intervenção terapêutica oportuna. O diagnóstico micológico destas micoses baseia-se na identificação dos fungos, por meio da observação de suas características morfológicas, isolados do material clínico cultivado. No entanto, em se tratando de amostras sanguíneas, meio de hemocultura automatizado são utilizados. Este estudo avaliou o perfil epidemiológico dos fungos isolados de amostras sanguíneas cultivados no sistema de hemocultura automatizado e nos meios usuais da micologia clássica. Amostras sanguíneas de 596 pacientes foram inoculadas pareadas nos meios Sabouraud e Mycosel e no frasco aeróbio do sistema BacT/ALERT®. *Candida* spp. *Cryptococcus* spp. e *Sporothrix* spp. foram os fungos isolados na hemocultura automatizada. Por outro lado, recuperamos *Cryptococcus* spp., *Histoplasma* spp., *Paracoccidioides* spp. e *Sporothrix* spp. nas culturas micológicas clássicas. Observamos que as metodologias avaliadas se complementam e que o uso simultâneo destas aumenta a sensibilidade do diagnóstico micológico.

PALAVRAS-CHAVE: micoses sistêmicas, diagnóstico micológico, hemocultura automatizada.

ABSTRACT

Systemic mycoses represent a global challenge for human health due to their ability to spread and the high potential for mortality when timely therapeutic intervention does not occur. The mycological diagnosis of these mycoses is based on the identification of fungi, by observing their morphological characteristics, isolated from the cultivated clinical material. However, when it comes to blood samples, automated blood culture means are used. This study evaluated the epidemiological profile of fungi isolated from blood samples cultivated in an automated blood culture system and in the usual media of classical mycology. Blood samples from 596 matched patients were inoculated in Sabouraud and Mycosel medium and in an aerobic flask of the BacT / ALERT® system. *Candida* spp. *Cryptococcus* spp. and *Sporothrix* spp. were the fungi isolated in automated blood culture. On the other hand, we recovered *Cryptococcus* spp., *Histoplasma* spp., *Paracoccidioides* spp. and *Sporothrix* spp. in classical mycological cultures. We observed that the evaluated methodologies complement each other and that their simultaneous use increases the sensitivity of mycological diagnosis.

KEYWORDS: systemic mycoses, mycological diagnosis, automated blood culture.

RESUMEN

Las micosis sistémicas representan un desafío global para la salud humana debido a su capacidad de diseminarse y al alto potencial de mortalidad cuando no se produce una intervención terapéutica oportuna. El diagnóstico micológico de estas micosis se basa en la identificación de hongos, mediante la observación de sus características morfológicas, aislados del material clínico cultivado. Sin embargo, cuando se trata de muestras de sangre, se utilizan medios de cultivo de sangre automatizados. Este estudio evaluó el perfil epidemiológico de hongos aislados de muestras de sangre cultivadas en un sistema de hemocultivo automatizado y en los medios habituales de la micología clásica. Se inocularon muestras de sangre de 596 pacientes emparejados en medios Sabouraud y Mycosel y en el matraz aeróbico del sistema BacT / ALERT®. *Candida* spp. *Cryptococcus* spp. y *Sporothrix* spp. fueron los hongos aislados en hemocultivo automatizado. Por otro lado, recuperamos *Cryptococcus* spp., *Histoplasma* spp., *Paracoccidioides* spp. y *Sporothrix* spp. en culturas micológicas clásicas. Observamos que las metodologías evaluadas se complementan y que su uso simultáneo aumenta la sensibilidad del diagnóstico micológico.

PALABRAS-CLAVE: micosis sistémicas, diagnóstico micológico, hemocultivo automatizado.

INTRODUÇÃO

As doenças infecciosas fúngicas representam um grande desafio mundial para a saúde humana. Estima-se que mais de 300 milhões de pessoas em todo o mundo sofrem de infecções fúngicas a cada ano com cerca de 1,0 a 2,0 milhões de mortes, aproximando-se das mortes por malária ou tuberculose (BONGOMIN *et al.*, 2017; VAN RHIJN; BROMLEY, 2021). As micoses sistêmicas ainda são um tema negligenciado pelas autoridades de saúde pública. O atraso do diagnóstico precoce e preciso impede o início da terapia antifúngica imediata podendo levar à morte ou ao agravamento de doenças crônicas (BONGOMIN *et al.*, 2017).

O diagnóstico micológico clássico das micoses baseia-se na identificação dos fungos por meio da observação de suas características morfológicas pela visualização direta do material clínico ou após seu cultivo em meios específicos. As leveduras têm como estrutura primária células que se reproduzem por brotamento, único ou múltiplo, em geral de forma arredondada. Os fungos filamentosos possuem como elemento constituinte básico a hifa, que pode ser septada ou não septada, hialina ou demácea. O meio de cultura mais utilizado é o ágar Sabouraud dextrose, que pode ser modificado com cicloheximida (Mycosel) ou com cloranfenicol, antibióticos acrescentados aos meios para inibir o crescimento de fungos contaminantes do ambiente e de bactérias da microbiota do hospedeiro, respectivamente. (ANVISA, 2013; OLIVEIRA, 2013). No entanto, o “padrão ouro” para o diagnóstico da candidemia é a hemocultura automatizada. Neste caso, é essencial que as hemoculturas sejam processadas por sistemas automatizados, que possuem melhor sensibilidade e permitem um isolamento mais rápido do agente, uma vez que existe uma relação direta entre a mortalidade e o tempo para o início da tratamento da candidemia (COLOMBO *et al.*, 2013).

Considerando a diversidade do reino Fungi, com patógenos na forma leveduriforme e/ou filamentosa e tendo por bases as amostras sanguíneas, a metodologia ideal para cada caso ainda não está clara. Este estudo teve como objetivo analisar as culturas fúngicas de amostras de sangue pareadas nas metodologias: hemocultura automatizada e cultura micológica clássica.

MATERIAS E MÉTODOS

População estudada

Este estudo trata-se de uma coorte prospectiva na qual foram incluídos todos os pacientes com cultura de fungos de amostras sanguíneas pareadas em hemocultura automatizada e cultivo fúngico clássico, internados no Hospital Eduardo de Menezes, referência em doenças infectocontagiosas em Minas Gerais, Brasil, no período de março de 2016 a dezembro de 2019. O estudo foi aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa da UFMG e do Hospital Eduardo de Menezes (CAAE:00883118.0.3001.5124).

Em todo o estudo, o sistema BacT/ALERT® da bioMérieux, consistindo em frascos aeróbios, foram usados juntamente com o ágar Sabouraud e o ágar Mycosel. Isolados repetidos do mesmo fungo de fungemia durante um episódio (≤ 30 dias) foram excluídos.

Processamento das culturas de sangue

Para a hemocultura automatizada, o volume de sangue recomendado era de 8-10 ml para cada frasco. Após a coleta, os frascos de hemocultura foram transportados para o laboratório e incubados o mais rápido possível, por 5 dias. Quando os fungos foram observados por microscopia de frascos de hemocultura positivos, os meios de cultura foram semeados em ágar Sabouraud e ágar Mycosel, os quais foram incubados aerobicamente, a 28° C, até o crescimento visível. Paralelamente, 03 gotas de sangue

(cerca de 100 µl) foram inoculadas em ágar Sabouraud e ágar Mycosel, à beira do leito. Os tubos foram direcionados para o laboratório e incubados a 28° C, em condições aeróbias, por 40 dias.

RESULTADOS

Avaliou-se o resultado das culturas de fungos de sangue de 596 pacientes. Destes, 18 tiveram o diagnóstico para Histoplasmose, com o seguinte perfil de positividade: hemocultura automatizada 0,0% (0/596) e Sabouraud e Mycosel 3,0% (18/596, IC 95% 1,92 - 4,72). Para Criptococose foram 6 pacientes: hemocultura automatizada 0,8% (5/596, IC 95% 0,36 - 1,95) e Sabouraud e Mycosel 1,0% (6/596, IC 95% 0,46 - 2,18). Paracoccidiodomicose, total de 3 casos, sendo hemocultura automatizada 0,0% (0/596) e Sabouraud e Mycosel 0,5% (3/596, IC 95% 0,17 - 1,47). Já a esporotricose, foi apenas 1 caso, que foi identificado nos dois métodos, simultaneamente, com 0,2 % (1/596, IC 95% 0,03 - 0,94). Nota-se que pacientes com candidemia só foram identificados na hemocultura automatizada 0,4% (2/596, IC 95% 0,09 - 1,22) e no Sabouraud e Mycosel 0,0% (0/596). Para o método Sabouraud e Mycosel, o crescimento bacteriano foi reportado como contaminação da cultura fúngica 8,9% (53/596 IC 95% 6,86 - 11,45). Entretanto, foram isoladas 10,2% (61/596, IC 95% 8,05 - 12,93) bactérias na hemocultura automatizada, que seguiram para identificação em gênero/espécie e sensibilidade aos antimicrobianos.

DISCUSSÃO

Nota-se que a maioria dos resultados se apresentou como negativos nas duas metodologias. Os resultados obtidos pela hemocultura automatizada sugerem uma predominância de crescimento de fungos leveduriformes como *Candida* spp. (0,4%) e *Cryptococcus* spp. (0,8%). Enquanto na cultura micológica clássica, o principal fungo isolado foi *Histoplasma* spp. (3,0%), na forma filamentososa. Curiosamente, *Histoplasma* spp. e *Paracoccidioides* spp. só foram isolados no Sabouraud e Mycosel. Ressalta-se que a positividade aqui apresentada não reflete a sensibilidade geral das metodologias, mas a frequência de microrganismos isolados nas culturas de sangue nos dois métodos. O Teste de Mac Nemar foi aplicado para observar a correlação das metodologias estudadas, porém apresentou-se inválido para o estudo proposto.

No geral, tivemos apenas dois casos de candidemia (0,4%), diferente de estudos anteriores que colocam *Candida* spp. como o quarto microrganismo mais isolado de amostras sanguíneas (WISPLINGHOFF *et al.*, 2004). Isso nos leva a crer que os valores encontrados podem estar subestimados por causa da sensibilidade insuficiente das técnicas avaliadas e que alguns casos de candidose invasiva podem não estar sendo diagnosticados (ARENDRUP *et al.*, 2011; CUENCA-ESTRELLA *et al.*, 2012).

Não houve diferença significativa entre as taxas de *Cryptococcus* spp. (0,8% / 1,0%) isolados em ambas as metodologias. *Sporothrix* spp. (0,2%) apresentou uma porcentagem de isolamento semelhante na hemocultura automatizada e na cultura micológica tradicional.

Para os casos de Criptococose e Esporotricose que apresentaram taxas de crescimento semelhantes na hemocultura automatizada e na cultura micológica, seria interessante avaliar o tempo de detecção dos patógenos em cada metodologia. Infelizmente, a ausência desta informação constitui uma limitação do nosso estudo.

Surpreendentemente, o isolamento do *Histoplasma* spp. 3,0% (18/596, IC 95% 1,92 - 4,72) na cultura micológica foi estatisticamente significativo. Ainda que não estatisticamente significativos, o isolamento de *Paracoccidioides* spp. 0,5% (3/596, IC 95% 0,17 - 1,47) em culturas fúngicas, assim como *Sporothrix* spp. 0,2 % (1/596, IC 95% 0,03 - 0,94) nas duas metodologias, demonstraram um achado.

Como esperado, a hemocultura automatizada confirmou-se eficiente no isolamento de bactérias 10,2% (61/596, IC 95% 8,05 - 12,93). Por outro lado, observamos a contaminação de algumas culturas fúngicas com o crescimento bacteriano 8,9% (53/596 IC 95% 6,86 - 11,45). Vale a pena mencionar que no período analisado foram utilizados ou ágar Sabouraud dextrose com cloranfenicol ou ágar Sabouraud dextrose sem cloranfenicol. No entanto, essa informação não foi coletada para subsidiar a análise da efetividade do ágar Sabouraud dextrose com cloranfenicol por conter a contaminação bacteriana das culturas fúngicas.

Nossa porcentagem de isolados fúngicos na hemocultura automatizada foi de 1,4% (8/596) e na cultura micológica de 4,7% (28/596). Acreditamos que o número de casos encontrados esteja abaixo do esperado uma vez que: (i) o perfil epidemiológico dos pacientes em nossa instituição consiste em sua maioria de pacientes imunossuprimidos pelo HIV; (ii) as infecções por *Candida* são responsáveis por 80% de todas as infecções fúngicas no ambiente hospitalar e sua incidência em hospitais públicos terciários no Brasil é de aproximadamente 2,5 casos por 1000 admissões hospitalares (COLOMBO *et al.*, 2013); (iii) a criptococose, principal micose oportunista em pacientes infectados pelo HIV, tem o Brasil com a maior número de casos de neurocriptococose da América Latina (FIRACATIVE *et al.*, 2018) e por fim (iv) a histoplasmose, uma das principais infecções oportunistas em pessoas que vivem com HIV de áreas endêmicas, vem demonstrando frequentes casos de disseminação (NAUCHER *et al.*, 2020).

Mais esforços são necessários para avaliar a sensibilidade dos métodos disponíveis para o isolamento de fungos patogênicos, em especial em amostras de sangue. Além disso, o fato de as micoses sistêmicas apresentarem uma alta taxa de mortalidade, quando não diagnosticadas e tratadas em tempo hábil, evidencia a necessidade do desenvolvimento de técnicas diagnósticas mais apuradas e assertivas como a PCR em Tempo Real, a partir das amostras clínicas.

CONCLUSÃO

Os fungos, isolados de amostras sanguíneas, mostraram notável variabilidade entre os gêneros na preferência das metodologias utilizadas. *Candida* spp. foi isolada apenas na hemocultura automatizada. Por outro lado, *Histoplasma* spp. e *Paracoccidioides* spp. restringiram-se aos meios micológicos clássicos. Na prática, podemos concluir que as metodologias se complementam e dessa forma, a aplicação simultânea da hemocultura automatizada e das culturas micológicas em Sabouraud e Mycosel oferecem a possibilidade de detectar uma diversidade maior de agentes fúngicos e melhora a sensibilidade do diagnóstico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARENDRUP, M. C. et al. Diagnostic issues, clinical characteristics, and outcomes for patients with fungemia. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 49, n. 9, p. 3300–3308, set. 2011.

ANVISA. Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde. Módulo 4: Procedimentos Laboratoriais: da requisição do exame à análise microbiológica e laudo final/Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Microbiologia Clínica Para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde, v. 9, p. 95, 2013.

BONGOMIN, F., GAGO, S., OLADELE, R.O., DENNING, D.W.. Global and Multi-National Prevalence of Fungal Diseases-Estimate Precision. *J Fungi* (Basel). 2017 Oct 18;3(4):57. doi: 10.3390/jof3040057. PMID: 29371573; PMCID: PMC5753159.

COLOMBO, A. L. et al. Brazilian guidelines for the management of candidiasis - a joint meeting report of three medical societies: Sociedade Brasileira de Infectologia, Sociedade Paulista de Infectologia and Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 17, n. 3, p. 283–312, 2013.

CUENCA-ESTRELLA, M. et al. ESCMID guideline for the diagnosis and management of Candida diseases 2012: Diagnostic procedures. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. SUPPL.7, p. 9–18, 2012.

FALCI, DI. R. et al. Histoplasmosis, An Underdiagnosed Disease Affecting People Living with HIV/AIDS in Brazil: Results of a Multicenter Prospective Cohort Study Using Both Classical Mycology Tests and Histoplasma Urine Antigen Detection. **Open Forum Infectious Diseases**, v. 6, n. 4, 13 abr. 2019.

FIRACATIVE, C. et al. The status of cryptococcosis in latin America Memorias do Instituto Oswaldo Cruz. **Fundação Oswaldo Cruz**, 1 jul. 2018.

NACHER, M. et al. Disseminated Histoplasmosis: Fighting a neglected killer of patients with advanced HIV disease in Latin America. **PLoS Pathogens**, v. 16, n. 5, 1 maio 2020.

OLIVEIRA, J. C. DE. Tópicos em Micologia Médica. Rio de Janeiro, 2013. Disponível em:https://controllab.com/pdf/topicos_micologia_4ed.pdf/. Acessado em 15/08/2020.

VAN RHIJN, N.; BROMLEY, M. The consequences of our changing environment on life threatening and debilitating fungal diseases in humans. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 5, 2021.

WISPLINGHOFF, H. et al. Cases from a Prospective Nationwide Surveillance Study BSI in US Hospitals. Disponível em: <<https://academic.oup.com/cid/article/39/3/309/351413>>.