
A biologia molecular como ferramenta para identificação fúngica em amostras de tecido

Juliana Possatto Fernandes TAKAHASHI¹, Estella Zago BECEGATO¹, Nathália ROCHA¹, Lidia Midori KIMURA¹, Karoline Rosa FERNANDES², Juliana Mariotti GUERRA¹

¹Núcleo de Patologia Quantitativa - Centro de Patologia - Instituto Adolfo Lutz

²Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses - Centro de Imunologia - Instituto Adolfo Lutz

Os avanços tecnológicos e metodológicos dos últimos tempos têm ampliado a utilização da biologia molecular como resposta à demanda de diagnósticos de infecções fúngicas, em situações de resultados discrepantes em exames histopatológicos¹. Pode-se enumerar diversas dificuldades encontradas na identificação pelo exame histopatológico, como: quantidade limitada de tecido obtido na biópsia, ausência de estruturas características de gênero ou, ainda, de respostas teciduais inespecíficas e, por fim, alteração morfológica dos agentes fúngicos durante processamento histológico da amostra ou por ação de medicação antifúngica^{1,2}. Quanto ao aspecto morfológico podemos citar, como exemplo, *Cryptococcus* spp. e *Paracoccidioides* spp., que dada a variabilidade de tamanho celular, podem ser confundidos com outros gêneros fúngicos³.

No uso de colorações diferenciais, há limitações do diagnóstico de infecção por fungos melanizados, denominados demáceos que não podem ser distinguidos em gênero, por corantes usuais em histologia, como ocorre em muitos fungos hialinos. Alguns fungos demáceos podem apresentar pouca melanina e, assim, a coloração de Fontana-Masson é necessária para destacar esse pigmento. Contudo, recomenda-se precaução ao interpretar este exame, uma vez que, alguns gêneros, como *Aspergillus* spp. e alguns Mucorales também podem se apresentar com a coloração castanho-amaronzada⁴.

Outra problemática no exame histopatológico

é a co-infecção por diferentes microrganismos, sendo nesses casos, a complementação com o isolamento dos distintos agentes poderá esclarecer o diagnóstico. A cultura do agente em meios sintéticos, nunca deve ser negligenciado, especialmente em se tratando de infecções oportunistas. É importante ressaltar que a cultura é considerada o padrão-ouro no diagnóstico da infecção fúngica, porém, o sucesso do isolamento e a correta identificação de um fungo, tanto na cultura como no exame histopatológico, bem como avaliação de sua importância clínica dependem de vários fatores, como a coleta adequada do espécime clínico e o correto processamento do material no laboratório⁵.

Devido a essas variáveis, um número crescente de técnicas moleculares, mais sensíveis para o diagnóstico de infecções fúngicas, tem sido desenvolvidas nos últimos anos. A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é uma das técnicas mais empregadas, podendo ser realizada em sangue periférico, fluidos corporais incluindo aqueles obtidos por punção e, tecidos in natura ou fixados em formalina e embebidos em parafina⁶. Outra técnica molecular que pode ser empregada é a hibridização *in situ*, que utiliza sondas de ácidos nucleicos específicos para detectar a presença de fungos, diretamente no tecido, preservando a morfologia do agente e a reação do tecido ao organismo¹. As sondas comumente utilizadas identificam o gênero do fungo. Algumas sondas apresentam boa sensibilidade para os gêneros *Blastomyces*, *Coccidioides*, *Cryptococcus*,

Sporothrix, *Pneumocystis*, *Candida*, *Fusarium*, e *Pseudallescheria*^{7,8,9,10}. A hibridização deve ser realizada nos casos em que os elementos fúngicos já foram demonstrados nas colorações histopatológicas de rotina^{8,9,10}.

Os painéis de sondas e *primers* para os testes moleculares devem ser construídos levando em conta tecido e tipo hospedeiro. Apesar de ser mais caro, o uso de painéis permitirá a detecção de infecções simples e co-infecções, além de diagnóstico mais preciso, importante para o tratamento adequado do paciente. Com o aumento de casos avaliados pela metodologia de PCR, tornou-se evidente que as infecções por múltiplos agentes fúngicos são bastante frequentes¹¹.

Apesar dos avanços nas técnicas moleculares, adversidades como a quantidade limitada de tecido e microrganismos na biópsia, bem como a presença de determinadas substâncias no processamento histológico que inibem as reações moleculares, continuam a representar obstáculos significativos para um diagnóstico definitivo.

REFERÊNCIAS

1. Guarner J, Brandt ME. Histopathologic Diagnosis of Fungal Infections in the 21st Century. *Clin Microbiol Rev*. 2001; 24: 247-280.
2. Gazzoni AF, Pega KL, Severo LC. Histopathological techniques for diagnosing cryptococcosis due to capsule-deficient *Cryptococcus*: case report. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2008; 41(1):76-8.
3. Gazzoni AF, Severo CB, Salles EF, Severo LC. Histopathology, serology and cultures in the diagnosis of cryptococcosis. *Rev Inst Med Trop. São Paulo*. 2009; 51:255–259.
4. Kimura M, McGinnis MR. Fontana-Masson-stained tissue from culture-proven mycoses. *Arch Pathol Lab Med*. 1989; 122:1107–1111.
5. Unis G, Da Silva VB, Severo LC. Histoplasmose disseminada e SIDA: Importância do meio de cultivo para o espécime clínico-broncoscópico. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2004; 37(3).
6. Melhem MSC, Giannini MJSM, Almeida AMF. Aplicação de Métodos de Biologia Molecular em Micologia Médica. In: Zaitz C, Campbell I, Marques SA, Ruiz LRB, Framil VMS. *Compêndio de Micologia Médica*. 2ed. Guanabara: Rio de Janeiro. 2010, p.50-74.
7. Kobayashi M, Urata T, Ikezoe T, Hakoda E, Uemura Y, Sonobe H, *et al*. Simple detection of the 5S ribosomal RNA of *Pneumocystis carinii* using *in situ* hybridisation. *J Clin Pathol*. 1996;49: 712–716.
8. Hayden RT, Qian X, Roberts GD, Lloyd RV. *In situ* hybridization for the identification of yeast like organisms in tissue section. *Diagn Mol Pathol*. 2001;10:15–23.
9. Hayden RT, Qian X, Procop GW, Roberts GD, Lloyd RD. *In situ* hybridization for the identification of filamentous fungi in tissue section. *Diagn Mol Pathol*. 2002; 11:119–126.
10. Hayden RT, Isotalo PA, Parrett T, Wolk DM, Qian X, Roberts G, *et al*. *In situ* hybridization for the differentiation of *Aspergillus*, *Fusarium*, and *Pseudallescheria* species in tissue section. *Diagn Mol Pathol*. 2003;12:21–26.
11. Burd EM. Validation of laboratory-developed molecular assays for infectious diseases. *Clin Microbiol Rev*. 2010; 23:550–576.