

Contaminação fúngica no leite humano e em sítios anatômicos de lactantes e lactentes

Fungal contamination in human milk and in the anatomic sites of breastfeeding mothers and infants

RIALA6/1489

Geraldo dos Santos OLIVEIRA¹, Rosa Helena LUCHESE^{2*}, Franz Reis NOVAK³, Daniel Paiva Barros de ABREU⁴, Amanda Mattos Dias MARTINS²

*Endereço para correspondência: ²Departamento de Tecnologia de Alimentos, Instituto de Tecnologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, BR 465, km 07, CEP: 23890-000, Seropédica, RJ, Brasil. E-mail: rhluche@ufrj.br

¹Instituto Fernandes Figueira, Fiocruz

³Laboratório de Controle de Qualidade de Leite Humano, Instituto Fernandes Figueira, Fiocruz

⁴Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

Recebido: 09.06.2012 – Aceito para publicação: 05.09.2012

RESUMO

As infecções bacterianas ou fúngicas causam quadro clínico de mastite, que motiva desmame precoce. Os micro-organismos patogênicos, como leveduras do gênero *Candida*, quando em número elevado no intestino, podem causar disbiose. Nesta pesquisa, foram realizadas a detecção e a identificação de microbiota fúngica nas amostras de leite humano e de sítios anatômicos de mulheres e crianças atendidas pelo Banco de Leite Humano do Instituto Fernandes Figueira. A virulência dos isolados de levedura foi determinada pelos testes de atividade proteolítica. De 64 amostras analisadas, 81% foram positivas para fungos, com maior prevalência de *Candida albicans* (73%), seguida do complexo *C. parapsilosis* (15,4%). Perfis semelhantes aos verificados no total de amostras foram encontrados nas amostras de leite, nas mamas e na cavidade oral, sugerindo-se a ocorrência de associação entre a infecção cutânea da mãe e do lactente com o leite ingerido. O perfil associado à virulência dos isolados de *Candida* foi determinado pelo teste de produção de proteases, e 100% das amostras mostraram resultados fortemente positivos, indicando alto grau de infecciosidade. A alta prevalência de *C. albicans* nas amostras coletadas de mamas, no leite e na cavidade oral, é importante fator de risco à saúde de lactentes.

Palavras-chave. mastite, cavidade oral, *Candida albicans*, complexo *C. parapsilosis* (grupo *psilosis*), virulência.

ABSTRACT

Bacterial or fungal infections might produce a clinical feature of mastitis, which is one of the main causes of precocious breast-feeding discontinuity. In addition, when the potentially pathogenic microorganisms as yeast of *Candida* genera were in high counting in the intestine, might cause dysbiosis. This study aimed detecting and identifying fungi in human milk and anatomical sites of breast-feeding women and infants who were enrolled at Human Milk Bank of the Institute Fernandes Figueira. The virulence of the yeast isolates was evaluated by means of proteolytic activity tests. Eight-one percent of 64 analyzed samples showed positive results to fungi, with a highest prevalence of *Candida albicans* (73%) followed by *C. parapsilosis* complex (15.4%). Similar profiles were found in samples of milk, of breasts and of infants mouth cavity, suggesting a correlation between breast-feeding mothers and infants cutaneous infections with the ingested milk. The virulence of the isolated *Candida* was determined by the proteolytic activity test. All of the isolates (100%) were strongly positive, indicating a high degree of infectivity. The high prevalence of *C. albicans* in samples collected from breasts, mouth cavity and milk is a crucial risk factor for the infants health.

Keywords. mastitis, mouth cavity, *Candida albicans*, *C. parapsilosis* complex (*psilosis* group), virulence.

INTRODUÇÃO

Infecções cutâneas e de partes moles causadas por espécies de fungos, como as dermatofitoses e dermatomicoses, são bastante comuns. Aquelas causadas por espécies do gênero *Candida* nas mamas das nutrizes tendem a ser manifestar como lesão eritematosa e pruriginosa no sulco inframamário, levando ao quadro conhecido por mastite. Essa é uma das principais causas de abandono precoce de amamentação, com consequências nefastas à saúde do lactente, incluindo sua exposição a fungos patogênicos^{1,2}.

Diversas espécies de *Candida* são naturalmente encontradas vivendo como comensais no organismo de indivíduos com sistema imunológico normal, numa proporção de 47% na cavidade oral, 34% na região retal e 23% na cavidade vaginal, sem causar infecções aos seus hospedeiros, ainda que, por vezes, sejam detectadas em número elevado³. Isolados de *C. parapsilosis* previamente classificadas como pertencentes aos grupos II e III foram recentemente reclassificadas como espécies independentes, denominadas *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis*⁴. De Toro et al.⁴ estudaram 122 isolados do complexo *C. parapsilosis*, e classificaram 91% como sendo *C. parapsilosis sensu stricto*. A espécie isolada com mais frequência do trato gastrointestinal é *Candida albicans*, seguida por *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. kefyr*, *C. guilliermondii*, *C. lusitanae*, *C. dubliniensis* e *C. glabrata*⁵⁻⁸. *C. albicans* é um importante comensal da microbiota de humanos e animais, mas é também o principal fungo patogênico de humanos, considerado o quarto entre os micro-organismos responsáveis por infecções sistêmicas de origem hospitalar^{9,10}. Micro-organismos potencialmente patogênicos, como leveduras do gênero *Candida*, também podem estar presentes em número elevado em caso de disbiose intestinal⁹.

A produção de aspartil proteinase (Sap), assim como a produção de fosfolipase, está correlacionada com a habilidade de aderência ao tecido do hospedeiro¹¹⁻¹⁶, incluindo adesão às proteínas da matriz extracelular como fibronectina, laminina e colágeno¹⁷⁻¹⁹. Pela formação de tubo germinativo, podem aumentar o potencial de virulência nas infecções em mucosas e pele e na disseminação endovenosa²⁰.

Tendo em vista a importância da alimentação com leite humano para a saúde do lactente, esta pesquisa

objetivou detectar e identificar a microbiota fúngica de leite humano e de sítios anatômicos de mulheres e crianças atendidas pelo banco de leite humano do Instituto Fernandes Figueira da Fiocruz.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta de amostras

Foram avaliadas um total de 64 amostras, sendo 25 de leite humano ordenhado e 39 de *swabs* de sítios anatômicos de lactentes e lactantes atendidos pelo banco de leite humano ordenhado do Instituto Fernandes Figueira (IFF). Dos lactentes, coletaram-se 18 amostras da cavidade oral, enquanto que, das lactantes, foram amostradas as mamas (mamilo e aréola), num total de 21.

Das 25 amostras de leite humano ordenhado cru, 18 foram provenientes das mesmas lactantes das quais foram coletados *swabs* das mamas, aréolas e da boca dos seus respectivos lactentes. Outras sete amostras de leite foram de doadoras voluntárias do banco de leite Humano do IFF.

Só foram incluídos no estudo as lactantes e os recém-nascidos cujos pais concordaram em participar por meio de consentimento livre e devidamente esclarecidos a despeito de alguma doença de base.

Exame microscópico direto

Inicialmente, as amostras de leite foram centrifugadas por 15 minutos a $3.000 \times g$ e o sedimento examinado “a fresco” ao microscópio. Nas amostras de *swabs*, foram feitos esfregaços e corados pelo método de Gram e analisados ao microscópio.

Exame por cultivo

Amostras de leite (após centrifugação) e *swabs* foram semeados por estriamento em meio Sabouraud (Difco) e Mycosel® (BD-BBL) e, após o crescimento, foram reisoladas em meios especiais, ágar batata dextrose (Difco) e Lactrimel, preparados de acordo com Sidrim e Moreira²¹. Culturas presuntivas para leveduras foram semeadas em ágar extrato de arroz (Rice Extract Ágar, Difco) para prova do tubo germinativo e formação de clamidoconídeos. Além dos testes morfológicos, os isolados de leveduras foram identificados por meio de testes bioquímicos com o auxílio do equipamento VITEK® (bioMérieux, França) e por semeadura em CHROMágar *Candida*® (BD-BBL).

Análise de virulência

Os isolados de leveduras foram testados para atividade de proteinase utilizando ágar proteinase preparado de acordo com Ruchel et al.¹¹. Inoculou-se uma alçada de cada isolado no centro da placa de Petri contendo ágar proteinase seguida de incubação a 36 °C por quatro dias. A presença da enzima foi observada pela formação de um halo transparente devido à hidrólise da proteína ao redor da colônia. A atividade enzimática (Pz) foi medida de acordo com Price et al.²² (Tabela 1), calculando-se a razão entre o diâmetro da colônia e o diâmetro do halo transparente de hidrólise.

Tabela 1. Interpretação da atividade enzimática para avaliação do grau de virulência conforme estabelecido por Price et al.²²

| Pz | Atividade enzimática | Código |
|--------------|----------------------|--------|
| = 1,0 | Negativa | 1 |
| ≥ 0,64 < 1,0 | Positiva | 2 |
| < 0,64 | Fortemente positiva | 3 |

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Exame microscópico direto

O exame microscópico direto revelou apenas 5,4% de positividade. Por outro lado, quando as amostras foram semeadas em meio de cultivo, 81% apresentaram contaminação fúngica (Figura 1), sugerindo que o exame microscópico direto não pode ser empregado como única forma de diagnóstico.

Identificação e ocorrência de espécies fúngicas

O percentual das diferentes espécies encontradas no total de amostras contaminadas com fungos é mostrado na Figura 2. *C. albicans* seguida do complexo *C. parapsilosis* predominaram no total de amostras positivas. De maneira similar, outros autores também observaram dominância de *C. albicans*, seguida de *C. parapsilosis* em sítios anatómicos e fungemias^{5-8,23-26}. Foi verificado que mulheres que amamentam com dor no mamilo são mais frequentemente diagnosticadas como portadoras de candidíase por *C. albicans* que mulheres que amamentam sem dor². Da mesma forma, Andrews et al.¹ encontraram *C. albicans* mais frequentemente em mães que amamentam e relatam dor quando comparadas a mães assintomáticas.

Krcméry e Kovacicová²⁶ verificaram em um período de dez anos que, embora *C. albicans* permaneça como a espécie mais frequentemente isolada, houve aumento de outras espécies de *Candida* em 46,3%, de

1991 a 1998. *C. albicans* representou 61,6% de todas as fungemias, seguidas de *C. parapsilosis* (9,9%), *C. krusei* (5,8%), *C. tropicalis* (4,1%), *C. glabrata* (3,2%), *C. guilliermondii* (1,2%) e *C. lusitaniae* (0,9%). Na presente pesquisa, foram encontrados, 73% de *C. albicans*, 15,4% do complexo *C. parapsilosis* e 5,8% de *C. tropicalis*, sendo que fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* representaram a terceira espécie fúngica de maior incidência (7,7%). Quando são consideradas apenas as amostras de leite, fungos do gênero *Aspergillus* representaram a segunda espécie mais incidente (15,8%), juntamente com o complexo *C. parapsilosis*.

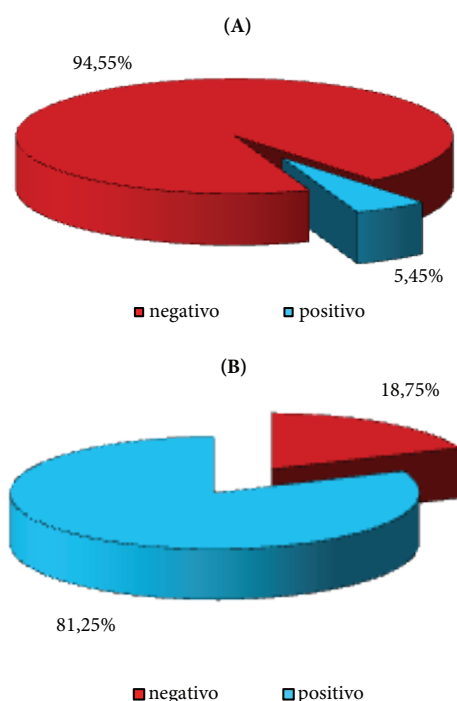


Figura 1. Percentuais de positividade para a presença de fungos pelo exame microscópico direto (A) e por cultivo (B) do total de 64 amostras coletadas de leite humano e swabs de sítios anatómicos de lactentes e lactantes

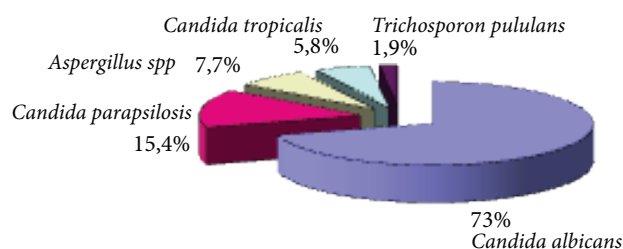


Figura 2. Percentual de diferentes espécies fúngicas encontradas no total de 52 amostras positivas (81,25%)

Perfis semelhantes aos verificados no total de amostras foram encontrados no leite, nas mamas e na cavidade oral (Figura 3), sugerindo uma transferência da infecção das mamas das lactantes para o leite e, conseqüentemente, para os lactentes.

Por outro lado, leveduras do gênero *Trichosporon* foram encontradas somente no leite, indicando contaminação proveniente do ambiente e/ou manipulação.

Segundo Contreras et al.²⁷, *C. albicans* representou 40% dos isolamentos (23,3% em crianças saudáveis e 82,4% naquelas com candidíase bucal) de 124 crianças acompanhadas longitudinalmente, dos 15 dias de vida até os 16 meses. Assim, a combinação destas duas características de *C. albicans*, alta incidência e longa permanência, podem comprometer severamente a sanidade de lactentes.

Tortora et al.²⁸ afirmaram que a microbiota da mucosa da boca usualmente suprime o crescimento de fungos como *C. albicans*. Entretanto, neste estudo, todas as amostras da cavidade oral foram positivas para fungos, com predominância de *C. albicans* (83,3%). De outra forma não foram encontradas as leveduras *C. tropicalis* e *T. pululans* presentes no leite.

Embora muitos membros desse gênero sejam encontrados intraoralmente (*C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. guilliermondii*), eventualmente causam doença, sendo a candidíase bucal provocada mais frequentemente por *C. albicans*, considerada a mais patogênica²⁹⁻³¹.

Almeida³² observou a ocorrência de bolores e leveduras em 69,4% das amostras de leite humano coletadas no IFF, com contagens na ordem de 10^6 UFC/mL. Foram efetuadas modificações na técnica de coleta e as contagens foram repetidas, revelando redução na incidência desses micro-organismos para 16,7% das amostras e contagens inferiores a $3,0 \times 10^2$ UFC/mL.

A alta incidência de *C. albicans* nas mamas, cavidade oral de lactentes e no leite é uma fator de risco à sanidade dos lactentes. O gênero *Candida*, composto por leveduras comensais na pele humana e dos animais vertebrados, vem sendo estudado recentemente em várias reformulações a respeito de sua classificação, taxonomia e virulência, e com relação ao seu papel na doença cutânea e sistêmica³³. Espécies de *Candida* estão relacionadas ao abandono da amamentação e quadros de diarreia apresentados por crianças internadas e alimentadas com leite

materno e leite maternizado, sobretudo em pacientes imunodeprimidos. Em adição, leveduras do gênero *Candida* são consideradas potencialmente patogênicas quando presentes em número elevado em casos de disbiose intestinal⁹.

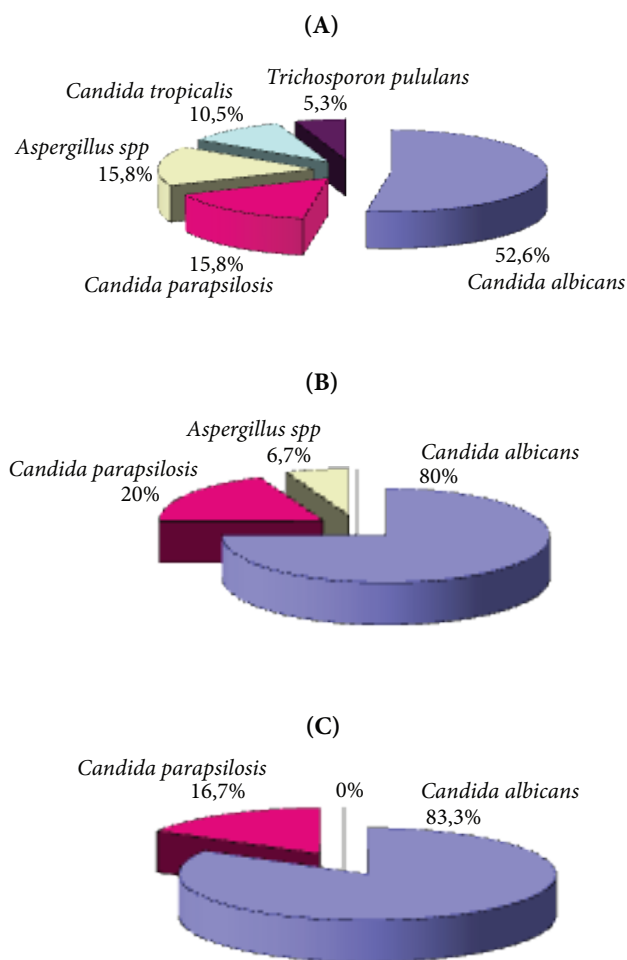


Figura 3. Percentual de ocorrência de diferentes espécies fúngicas no leite humano (A), nas mamas das nutrizes (B) e na cavidade oral de lactentes (C)

Produção de proteinase

Um dos fatores de virulência do gênero *Candida* mais estudado é a produção de enzimas extracelulares, como proteinases ácidas e fosfolipases, uma vez que exercem importante papel na patogênese. O perfil associado à virulência das espécies de *Candida* foi determinado pelo teste de produção de proteinase ácida, sendo observado que 100% foram fortemente positivas, indicando alto potencial de virulência. Foram testados

18 isolados de *C. albicans*, sendo seis das mamas, seis da cavidade oral e seis do leite, que apresentaram atividade enzimática (Pz) média e desvio-padrão de $0,37 \pm 0,06$, $0,42 \pm 0,11$ e $0,35 \pm 0,10$, respectivamente. De maneira similar, três isolados de *Candida* do complexo *psilosis* (respectivamente de mama, cavidade oral e leite) apresentaram Pz de 0,54, 0,38 e 0,45, e também foram classificados como fortemente positivos para produção de proteinases. Um isolado de leite de *C. tropicalis* foi igualmente fortemente positivo para o teste de proteinase (Pz 0,37).

Ruchel et al.¹¹ e MacDonald³⁴ demonstraram que atividades distintas de proteinases podem ser apresentadas por diferentes linhagens de *C. albicans* e diferentes espécies de *Candida*. Também foi observado que existe tendência de correspondência entre quantificação de proteinases e ordem de virulência de espécies (*C. albicans* > *C. tropicalis* > *C. parapsilosis* > *C. krusei* > *C. glabrata* > *C. guilliermondii*). Diferentemente, os resultados aqui apresentados mostraram que todas as leveduras isoladas independentemente da espécie foram fortemente proteolíticas. Conclui-se que os isolados de *Candida* spp. podem ser considerados potencialmente oportunistas e/ou patogênicos.

Resultados semelhantes foram relatados por Penha³⁵, que observou elevada atividade proteolítica em 100% dos isolados de *C. albicans* de pacientes da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo. Candido et al.³⁶ relataram atividade proteolítica em 66,7% de *C. albicans* isoladas da mucosa bucal de pacientes da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto.

Holmstrup e Samaranayake³⁷ acreditam que o desequilíbrio da microbiota bucal e a imaturidade dos mecanismos de defesa são responsáveis pela sensibilidade aumentada à candidíase durante o período neonatal. Dependendo do estado imunológico do hospedeiro, a colonização por *Candida*, inicialmente superficial, pode se disseminar. A infecção por espécies do gênero *Candida*, segundo Ghannoum¹³, começaria pela aderência da levedura às células da pele e das mucosas, e seguiria com a multiplicação celular, formando posteriormente tubo germinativo e hifas que produziriam proteinases e fosfolipases, permitindo a sua penetração e a consequente resposta inflamatória.

CONCLUSÃO

Todas as espécies de leveduras apresentaram elevada atividade de proteases e, portanto, com alto

potencial associado à virulência e potencial para tornarem-se patogênicas. Existe uma relação da infecção cutânea da mãe e do lactente, assim como do leite ingerido, indicando alto grau de infectividade dessas leveduras. Conclui-se que o aspecto higiene é fundamental quando da entrega da alimentação ao recém-nascido, seja por meio da amamentação por fórmulas ou ao peito.

REFERÊNCIAS

1. Andrews JI, Fleener DK, Messer SA, Hansen WF, Pfaller MA, Diekema DJ. The yeast connection: is *Candida* linked to breastfeeding associated pain? *Am J Obstet Gynecol*. 2007;197(4):424e1-4.
2. Panjaitan M, Amir, LH, Costa AM, Rudland E, Tabrizi S. *Breastfeed Med*. 2008;3(3):185-7
3. Odds FC. Pathogenesis of *Candida* infections. *J Amer Acad Dermatol*. 1994;31(3):S2-S5.
4. De Toro M, Torres MJ, Maite R, Aznar J. Characterization of *Candida parapsilosis* complex isolates. *Clin Microbiol Infect*. 2011;17(3):418-24.
5. Furlaneto-Maia L, Specian AFL, Thörn DSW, Oliveira MT. Estudo da incidência de amostras clínicas do gênero *Candida* isoladas de diversos sítios anatômicos. *Acta Sci Health Sci*. 2007;29(1):33-7.
6. Murray PR. *Manual of Clinical Microbiology*. Washington, DC: ASM Press; 1995. p. 85-93.
7. Sullivan DJ, Moran G, Donnelly S, Gees, Pinjon E, McCartan B, et al. *Candida dubliniensis* sp. *Rev Iberoam Micol*. 1999;16:72-6.
8. Vargas KG, Joly S. Carriage Frequency, intensive of Carriage, and Strains of Oral Yeast Species Vary in the Progression to Oral Candidiasis in Human Immunodeficiency Virus-Positive Individuals. *J Clin Microbiol*. 2002;40(2):341-50.
9. Sgarbieri, V. Propriedades fisiológicas-funcionais das proteínas do soro de leite. *Rev Nutrição*. 2004;17(4):397-409.
10. Bounoux ME, Aanensen DM, Morand S, Théraud M, Spratt BG, d'Enfert C. Multilocus sequence typing of *Candida albicans*: strategies, data exchange and applications. *Infect Genet Evol*. 2004;4(3):243-52.
11. Ruchel R, Tegeler R, Trost M. A comparison of secretory proteinase from different stains of *Candida albicans*. *Saborandia*. 1982;20:233-4.
12. Bennett DE, McCreary CE, Coleman DC. Genetic characterization of phospholipase C gene from *Candida albicans*: presence of homologous sequences in *Candida* species other than *Candida albicans*. *Microbiol*. 1998;144:55-72.
13. Ghannoum MA. Phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin Microbiol Rev*. 2000;13(1):124-34.
14. Hanula J, Saarela M, Dogan B, Paatsama J, Koukila-Kahkola P, Pirinen S, et al. Comparison of virulence factors of oral *Candida dubliniensis* and *Candida albicans* isolates in healthy people and patients with chronic candidiasis. *Oral Microbiol Immunol*. 2000;15(4):238-44.
15. Bein M, Scaller M, Hans CK, Baur S, Hamm G, Monod M, et al. The secreted aspartyl proteinase sap1 and sap2 cause tissue damage in an vitro model of vaginal candidiasis based on reconstituted human vaginal epithelium. *Infect Immun*. 2003;71(6):3227-34.

16. Alvares CA, Suidzzinski TE, Lopes MEL. Candidíase vulvovaginal: fatores predisponentes do hospedeiro e virulência das leveduras. *J Bras Patol Med Lab*. 2007;41(5):319-27.
17. Hoyer LL. The ALS Gene Family of *Candida albicans*. *Trends Microbiol*. 2001;9(4):176-80.
18. Goes VFF. Ação de extratos, óleos essenciais e frações isoladas de plantas Medicinais sobre a formação do biofilme em *Candida* ssp. [tese de doutorado]. São Paulo (SP): Unicamp; 2009.
19. Tronchin G, Bouchara IP, Annaix V, Robert T, Senet JM. Fungal cell adhesion in *Candida albicans*. *Eur J Epidemiol*. 1991;7:23-33.
20. Kretschmar M, Hube B, Bertsch T, Sanglaard D, Merker R, Schoroder M, et al. Germ tubes and proteinase activity contribute to virulence of *Candida albicans* in murine peritonitis. *Infect Immun*. 1999;67(12):6637-42.
21. Sidrim JJC, Moreira JLB. Fundamentos clínicos e laboratoriais de micologia médica. Rio de Janeiro (RJ): Guanabara Koogan; 1999.
22. Price FM, Genetrays IO, Wclacinson IP. Plate method for detection for phospholipase activity in *Candida albicans*. *Sabourandia*. 1982;20:27-34.
23. Nucci M. Candiduria in hospitalized patients: A review. *Bras J Infec Dis*. 2000;4:168-72.
24. Rodriguez-Tudella JL, Cuenca-Estrella M. Fungemia by yeast: a multicenter study in Spain. *Rev Clin Esp*. 1999;199:356-61.
25. Morgan J. Global trends in candidemia: Review of reports from 1995-2005. *Curr Infect Dis Rep*. 2005;7:429-39.
26. Krcmery V Jr., Kovacicová G. Longitudinal 10-year prospective survey of fungaemia in Slovak Republic: Trends in etiology in 310 episodes. The Slovak Fungaemia Study Group *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2000;36:7-11.
27. Contreras I, Ponton J, Quindos G. Prevalence of *Candida parapsilosis* in the oral cavities of infants in Spain. *Clin Infect Dis*. 1994;18(3):480-1.
28. Tortora GF, Funke BR, Case CL. *Microbiologia*. 6. ed. Porto Alegre: Artes Médicas Sul; 2000.
29. Budtz-Jorgensen E. Etiology, pathogenesis, therapy and profilaxis of oral yeast infections. *Acta Odontol Scand*. 1990;48(1):61-9.
30. Neville BW, Dann DD, Allen CM, Bouquot JE. Fungal and Protozoal diseases. *In: Oral & Maxillofacial pathology*. Filadélfia; 1995.
31. Nisengard RJ, Newman MG. *Microbiologia oral e imunologia*. 2. ed. Rio de Janeiro (RJ): Guanabara Koogan; 1997.
32. Almeida JAG. Qualidade do leite humano coletado e processado em banco de leite [dissertação de mestrado]. Viçosa (MG): Universidade Federal de Viçosa; 1986.
33. Kurtzman CP, Fell JW, Boekhout T. *The Yeasts, a taxonomic study*. 5. ed. San Diego (CA): Elsevier; 2011. 2080 p.
34. MacDonald F. Secretion of inducible proteinase by pathogenic *Candida* species. *Sobouraudia*. 1984;22(1):79-82.
35. Penha SS. Frequency and enzymatic activity (proteinase and phospholipase) of *Candida albicans* from edentulous patients with and without denture stomatitis. *Pesq Odont Bras*. 2000;14(2):119-22.
36. Candido RC, Azevedo RVP, Komesu MC. Enzimotipagem de espécies do gênero *Candida* isoladas da cavidade bucal. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2000;33(5):437-42.
37. Holmstrup P, Samaranayake LP. Acute and AIDS related oral candidoses. *In: Samaranayake LP, Mac Farlane TW. Oral Candidosis*. London: Wright; 1990. cap. 8, p. 133-55.