



Aspergillus em ambiente hospitalar: um risco para o desenvolvimento de infeções nosocomiais?

Raquel Sabino¹, Cristina Veríssimo¹, Carla Viegas², João Brandão¹, Helena Parada¹, Carlos Martins³, Cristina Furtado¹, Karl V Clemons^{4,5,6}, David A Stevens^{4,5,6}

raquel.sabino@insa.min-saude.pt

(1) Laboratório Nacional de Referência de Infeções Parasitárias e Fúngicas. Departamento de Doenças Infecciosas, INSA.

(2) Área Científica de Saúde Ambiental. Escola Superior de Tecnologias da Saúde de Lisboa, Instituto Politécnico de Lisboa.

(3) Centro Hospitalar Lisboa Norte, EPE.

(4) California Institute for Medical Research.

(5) Department of Medicine. Division of Infectious Diseases, Santa Clara Valley Medical Center.

(6) Department of Medicine. Division of Infectious Diseases and Geographic Medicine, Stanford University.

Introdução

As infeções fúngicas invasivas dependem da interação entre a suscetibilidade do hospedeiro, a exposição ambiental e o microorganismo (1). Os indivíduos imunocomprometidos são mais suscetíveis a adquirir infeções nosocomiais provocadas por fungos isolados a partir do meio ambiente, como são exemplo os fungos do género *Aspergillus*.

A aspergilose invasiva é uma infeção fúngica por *Aspergillus* spp. que afeta sobretudo os doentes oncológicos transplantados, causando infeções graves em doentes altamente imunocomprometidos, e apresenta com uma taxa de letalidade que pode atingir os 85% (2). O género *Aspergillus* é ubíquo e composto por várias centenas de espécies: *Aspergillus fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger* e *A. terreus* são as mais frequentemente associadas a infeções.

No meio ambiente hospitalar, os fungos são frequentemente detetados no ar não filtrado, nos sistemas de ventilação, em poeira, água, alimentos e plantas ornamentais (3). Os conídios de *Aspergillus* são pequenos e facilmente inalados, podendo colonizar as vias aéreas superiores e inferiores (4). De acordo com estudos internacionais, estima-se que os custos hospitalares relacionados com a aspergilose invasiva sejam 27880€-44890€ mais elevados do que os valores gastos no internamento de doentes sem infeção por *Aspergillus* (5). Em 2009 o custo estimado nos E.U.A para tratamento da aspergilose invasiva foi de 69.797,16 EUR por doente.

Diferentes espécies de *Aspergillus* apresentam diferentes padrões de suscetibilidade aos antifúngicos (6), pelo que o conhecimento das espécies existentes em ambiente hospitalar é determinante para uma decisão terapêutica mais rápida e adequada no tratamento das infeções fúngicas nosocomiais.

Objetivo

Este estudo teve como objetivo caracterizar a distribuição do género *Aspergillus* no meio ambiente de três unidades hospitalares de um Hospital Central que apresentam um risco acrescido de aquisição de infeção fúngica invasiva (Unidades de Transplante Medular, Hemato-Oncologia e Cuidados Intensivos).

Metodologia

Durante o ano de 2013, efetuaram-se quatro amostragens do ambiente hospitalar uma em cada estação do ano, nas Unidades de Hematologia, de Oncologia e Unidade de Cuidados Intensivos (UCI) de um Hospital Central Português. No total, foram colhidas 101 amostras de ar e 99 amostras de superfícies, nomeadamente em puxadores, torneiras, janelas, grelhas de ar condicionado e mesas-de-cabeceira.

As colheitas de ar e das superfícies foram realizadas de acordo com normas internacionais (7); A inoculação das amostras foi realizada de acordo com a metodologia seguida por Samson *et al* (8). A colheita do ar (500 m3) foi efetuada com um amostrador de ar M AIRT-Millipore através do método impactação do ar em placas de malte agar com cloranfenicol, utilizando um caudal de 140L/minuto, a um metro de altura. A concentração fúngica total foi calculada em unidades formadoras de colónias (UFC) por metro cúbico de ar. As placas resultantes da colheita ambiental foram incubadas a 25±2°C durante 5-7 dias e as culturas obtidas, analisadas através de características morfológicas (macro e microscópicas), de crescimento e termotolerância.

Os isolados de *Aspergillus*, foram identificados recorrendo a uma abordagem molecular. O DNA fúngico de cada uma das culturas de *Aspergillus* foi amplificado utilizando os primers ITS (Internal Transcribed Spacers) das regiões conservadas do DNA ribossomal 18s (ITS1) e 28s (ITS4) (9). Ambas as cadeias dos produtos amplificados foram sequenciadas com BigDye Terminator (Applied Biosystems).

As sequências resultantes foram alinhadas usando os programas Cromas v.2.33 e Clustal X2 e comparadas com bases de dados disponíveis em websites (NCBI Blast e CBS Database). Utilizou-se como critério para aceitação das sequências a homologia superior a 98%. A análise estatística foi efetuada com programa SPSS v21.0 para Windows.

Resultados e discussão

Em 200 amostras de ar e superfícies colhidas obtiveram-se 548 isolados fúngicos. Destes, *Aspergillus* foi o género fúngico mais frequentemente isolado (19.7%), seguido dos géneros *Cladosporium* (18.6%) e *Penicillium* (17.3%) (Gráfico 1).

No total, foram identificados 80 isolados de *Aspergillus* durante os quatro períodos sazonais de colheita. Vinte e três (28.8%) destes isolados foram colhidos durante a primavera, 18 (22.5%) no verão, 23 (28.8%) no outono e 16 (20.0%) no inverno (Tabela 1). Verificou-se

uma associação significativa entre a estação do ano e os complexos de espécies isolados, sendo o inverno a estação do ano onde se detetou o menor número de complexos de espécies de *Aspergillus* ($p = 0.001$).

As espécies de *Aspergillus* pertencentes ao complexo *Versicolores* foram as únicas isoladas nas quatro estações do ano, tendo sido detetadas desde 2 a 28 UFC/m³ de ar. Já as espécies pertencentes aos complexos *Candidi* e *Usti* foram detetadas apenas no inverno e no verão. Estas variações sugerem que podem existir diferenças nas necessidades hídricas e nutricionais de cada espécie de *Aspergillus*, pelo que a sua distribuição difere em função das estações do ano.

Nas unidades de doentes hematológicos (unidade de transplantes de medula e unidade de hemato-oncologia) foram identificados 35 isolados de *Aspergillus* das 86 amostras colhidas (Gráfico 2).

Gráfico 1: ↓ Géneros fúngicos identificados nas amostras colhidas no ambiente hospitalar (ar e superfícies) de um Hospital Central Português.

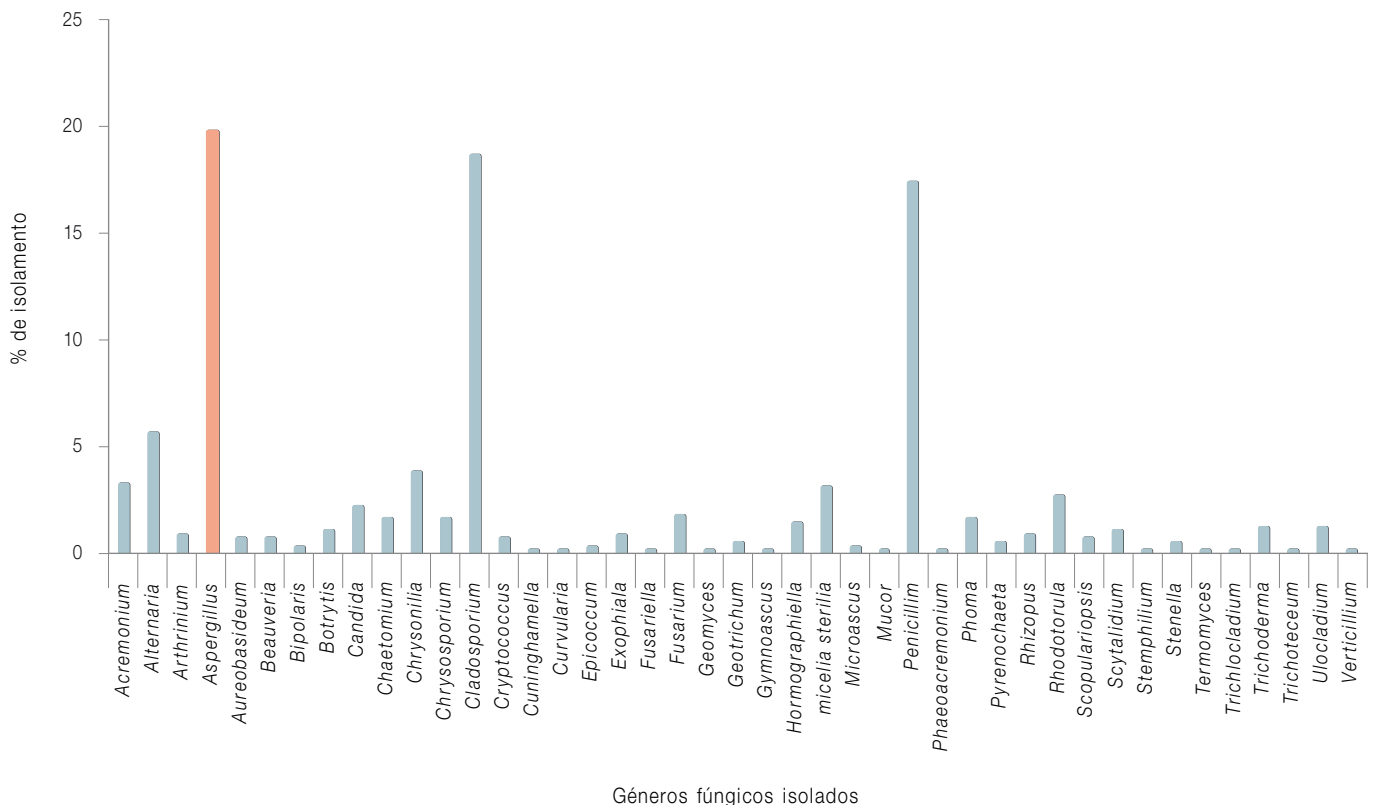
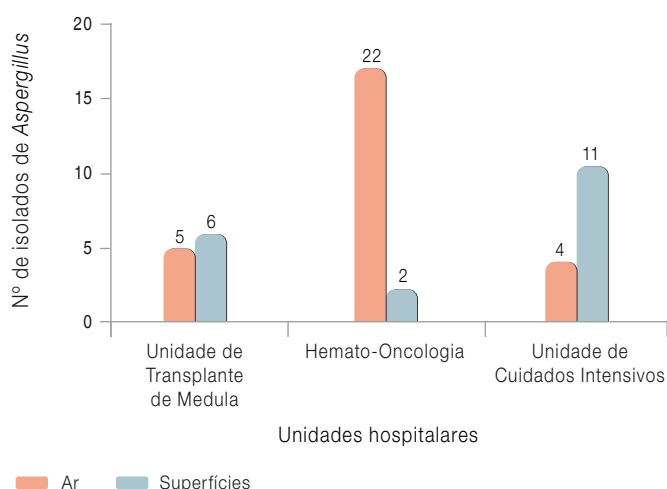


Tabela 1: Distribuição dos diferentes complexos de espécies de *Aspergillus* ao longo dos diferentes períodos de colheita.

Complexo de espécies de <i>Aspergillus</i>	Primavera (23 isolados)	Verão (18 isolados)	Outono (23 isolados)	Inverno (16 isolados)	Total
<i>Aspergilli</i>	1	0	0	4	5
<i>Candidi</i>	0	0	0	2	2
<i>Circumdati</i>	5	1	0	0	6
<i>Flavi</i>	5	1	5	0	11
<i>Fumigati</i>	0	3	3	1	7
<i>Nidulantes</i>	1	2	1	0	4
<i>Nigri</i>	4	6	0	1	11
<i>Terrei</i>	1	0	3	0	4
<i>Usti</i>	0	4	0	0	4
<i>Versicolores</i>	6	1	11	8	26

Gráfico 2: Número isolados de *Aspergillus* recolhidos nas diferentes unidades de um Hospital Central Português.



Na unidade de transplante de medula óssea, cujos quartos individuais são protegidos por filtros HEPA, foram detetados e identificados cinco isolados de *Aspergillus* (complexos *Fumigati*, *Terrei* e *Versicolores*), provenientes do ar e quatro deles colhidos durante o outono. A importância da utilização de filtros HEPA na contenção da contaminação por *Aspergillus* na unidade de transplante medular pode ser confirmada pela diferença significativa obtida ($p = 0.0058$) quando se compara o número de isolados de *Aspergillus* detetados das diferentes unidades hospitalares estudadas (com e sem filtros HEPA).

No que respeita à unidade de cuidados intensivos, foram identificados 15 isolados de *Aspergillus*, onze dos quais obtidos a partir de colheitas às superfícies (Gráfico 2). Nestes casos, observou-se a predominância de isolados pertencentes ao complexo *Flavi*, muitos deles isolados a partir das frestas da janela, o que sugere a existência de uma contaminação de origem externa.

Em todas as unidades hospitalares estudadas foram obtidas 27 amostras contaminadas por mais de uma espécie de *Aspergillus* (em 21 amostras de ar e em seis amostras de superfície), o que evidencia a importância de uma correta identificação das diferentes espécies, dado que diferentes espécies apresentam diferentes susceptibilidades aos antifúngicos.

_Conclusões

Neste estudo *Aspergillus* foi o género fúngico mais frequentemente isolado. A maior frequência observada no período de outono poder-se-á dever à existência de obras no hospital, nas proximidades das unidades estudadas nesta estação do ano. Os trabalhos de construção em ambiente hospitalar são conhecidos por serem uma das causas do aumento dos casos de aspergilose invasiva, uma vez que com o levantamento de poeiras são também transportados conídios de *Aspergillus* que rapidamente se disseminam.



artigos breves_ n. 3

Apesar dos dados apresentados serem meramente indicativos, esta realidade reforça a importância de uma vigilância contínua da presença de *Aspergillus* em ambiente hospitalar, sobretudo nas unidades onde a população de doentes apresenta maior predisposição para adquirir infeções fúngicas, quer seja por deficiência imunitária, nomeadamente doentes transplantados ou sob terapia citotóxica, quer seja por quebra da proteção natural como é o caso dos doentes com queimaduras extensas.

A vigilância activa e o conhecimento atempado da presença e distribuição de fungos ambientais nos hospitais leva ao estabelecimento precoce de medidas preventivas e/ou corretivas adequadas, de forma a diminuir o número de infeções fúngicas nosocomiais. Acresce que, a adoção de boas práticas diárias no controlo ambiental é fundamental para prevenir ou controlar um surto de aspergilose nosocomial. Por outro lado, compreender a biodiversidade de espécies fúngicas em ambiente hospitalar é determinante para a instituição de uma terapêutica mais rápida e adequada, uma vez que a susceptibilidade aos antifúngicos varia consoante as espécies.

Referências bibliográficas:

- (1) Eduard W. Fungal spores: a critical review of the toxicological and epidemiological evidence as a basis for occupational exposure limit setting. *Crit Rev Toxicol.* 2009;39(10):799-864.
- (2) Lin S-J, Schranz J, Teutsch SM. Aspergillosis case-fatality rate: systematic review of the literature. *Clin. Infect. Dis.* 2001;32(3):358-66. [LINK](#)
- (3) Klich MA. Health effects of *Aspergillus* in food and air. *Toxicol Ind Health.* 2009;25(9-10):657-67.
- (4) Ben-Ami R, Lewis R, Kontoyiannis DP. Enemy of the (immunosuppressed) state: an update on the pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* infection. *Br J Haematol.* 2010;150(4):406-17.
- (5) Krueger K, Nelson A. Economic considerations in the treatment of invasive aspergillosis: a review of voriconazole pharmaco-economic studies. *Clinicoecon Outcomes Res.* 2009;1:35-43. [LINK](#)
- (6) Van Der Linden JW, Warris A, Verweij PE. *Aspergillus* species intrinsically resistant to antifungal agents. *Med Mycol.* 2011;49(Suppl1):S82-9.
- (7) ISO 14698-1:2003 (E) Cleanrooms and associated controlled environments – Biocontamination control – Part 1: General principles and methods. Geneva: International Organization for Standardization; Brussels: European Committee for Standardization, sep 2003.
- (8) Samson R, Hoekstra E, Frisvad J, et al. *Introduction to Food and Airborne Fungi.* 6th ed. Utrecht, The Netherlands, ASM Press/Centralalbureau Voor Schimmelcultures, 2000.
- (9) 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, Inc, 1990: 315-322.