

Contribuição para o controlo da infeção nosocomial de *Candida parapsilosis* por tipagem com marcadores de DNA microsatélite

Contribution to the study of nosomial infections due to *Candida parapsilosis* by microsatellite genotyping

Sabino, Raquel^a; Sampaio, Paula^b; Viegas, Carla^c; Veríssimo, Cristina^d; Pais, Célia^e

^a Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, Av. Padre Cruz, 1649-016 Lisboa, Portugal
raquelsabino@hotmail.com

^b Centro de Biologia Molecular e Ambiental, Departamento de Biologia, Escola de Ciências, Universidade do Minho, Campus de Gualtar, 4710-057 Braga, Portugal
psampaio@uminho.pt

^c Escola Superior de Tecnologias da Saúde de Lisboa, Instituto Politécnico de Lisboa, Av. D. João II, 1990 - 096 Lisboa, Portugal
carla.viegas@estesl.ipl.pt

^d Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, Av. Padre Cruz, 1649-016 Lisboa, Portugal
crisrina.verissimo@insa.min-saude.pt

^e Centro de Biologia Molecular e Ambiental, Departamento de Biologia, Escola de Ciências, Universidade do Minho, Campus de Gualtar, 4710-057 Braga, Portugal
cpais@uminho.pt

1. RESUMO

As infeções fúngicas constituem um problema hospitalar relevante em todo o mundo. A fácil transmissão dos fungos pelo ar, água ou pelo contato direto ou indireto com pessoas, superfícies ou objetos contaminados conduz a uma crescente preocupação com este tipo de infeções, principalmente em pacientes imunocomprometidos.

Considerando a grande relevância da levedura *Candida parapsilosis* em Portugal como agente etiológico de infeções sistémicas e de surtos hospitalares, o trabalho apresentado teve como objetivo contribuir para o desenvolvimento de novas ferramentas moleculares que permitissem responder a questões epidemiológicas relacionadas com esta espécie e posterior aplicação desta ferramenta em prol da segurança do paciente.

SUMMARY

Fungal infections constitute a relevant problem in hospitals from all over the world. Their easy transmission through the air, water, or by direct or indirect contact with contaminated persons, surfaces or objects lead to an increasing preoccupation with those infections, particularly in immunocompromised patients.

Regarding the enormous importance of *Candida parapsilosis* as agent of bloodstream infections and hospital outbreaks, the presented work aimed to contribute to the development of new molecular tools able to answer to epidemiological questions related with infections by this species and their application in favor of patient safety.

2. INTRODUÇÃO

O ambiente hospitalar desempenha um papel fundamental na epidemiologia das infeções fúngicas nosocomiais e, conseqüentemente, na segurança do doente.

Os fungos reproduzem-se por libertação de esporos de pequena dimensão e têm elevada taxa de dispersão ambiental, tendo como suas fontes em ambiente hospitalar os sistemas de ventilação ou ar condicionado, água, poeira, matéria orgânica em decomposição, plantas ornamentais, flores, frutas frescas, alimentos, obras de construção (no hospital ou em seu redor) ou mesmo os seus ocupantes e visitantes (1).

A presença ubíqua de fungos é uma potencial ameaça para a saúde em determinados grupos de pacientes e a sua transmissão ocorre através do contato, ingestão, inalação de partículas contaminadas, aerossóis ou mesmo através das mãos dos profissionais de saúde. Os grupos de pacientes de maior risco são os sujeitos a cuidados intensivos e/ou continuados bem como pacientes queimados, transplantados ou oncológicos. Destes últimos, são os pacientes hematológicos que apresentam um maior risco de desenvolvimento de infecções fúngicas invasivas. Cerca de 20 a 50% destes pacientes evidenciam sinais de infecção fúngica invasiva aquando da autópsia (2).

Na Europa e América Latina, *Candida parapsilosis* é uma das espécies de *Candida* predominantemente isoladas da corrente sanguínea (3,4) e têm sido descritos numerosos surtos hospitalares causados por esta levedura, nomeadamente associados a cateteres, hiperalimentação ou dispositivos prostéticos contaminados (5,6). Ao contrário de outras espécies de *Candida*, *C. parapsilosis* é frequentemente isolada das mãos dos profissionais de saúde, que instalam e mantêm os dispositivos médicos mencionados, sugerindo assim uma potencial via de transmissão o que conduz a uma possível ocorrência de surtos hospitalares (7).

A rápida identificação de estirpes envolvidas na infecção e a elucidação dos seus padrões de diversidade genética e epidemiológica são questões de grande importância clínica, uma vez que podem contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias na prevenção e tratamento das infecções e, por conseguinte, contribuir para a segurança do doente.

3. MÉTODOS

Foram desenvolvidas metodologias moleculares baseadas na tipagem de DNA microsatélite de estirpes de *Candida parapsilosis* (8). O protocolo desenvolvido foi aplicado a duzentos e trinta e três isolados independentes de *C. parapsilosis* obtidos de diferentes produtos biológicos dos pacientes, bem como do ambiente hospitalar. Cem das estirpes analisadas provinham de hemoculturas, nove do trato respiratório, vinte sete de pele e unhas, cinquenta e oito de outros produtos biológicos e ainda trinta e nove do ar, superfícies hospitalares e das mãos dos profissionais de saúde.

Após a genotipagem destas estirpes, determinou-se o poder discriminatório do método e aplicou-se essa metodologia ao estudo de casos concretos a nível hospitalar.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Quatro marcadores de DNA microsatélite foram utilizados em genotipagem por análise multiplex. O poder discriminatório combinado dos quatro marcadores foi de 0.99, o que significa que este método tem uma precisão de 99% na discriminação de estirpes de *Candida parapsilosis*. Dado o elevado poder discriminatório desta técnica, essa metodologia foi aplicada ao estudo de casos para os quais se procurava respostas a nível epidemiológico.

Utilizando o método de genotipagem desenvolvido, observou-se que em casos de isolados múltiplos do mesmo paciente o genótipo multilocus de estirpes colonizadoras e causadoras de infecção é, de forma geral, mantido. Isolados provenientes de possíveis surtos, colhidos em diferentes pacientes, bem como isolados recolhidos em ambiente hospitalar foram também estudados e genotipados. Dois desses casos de estudo são de seguida apresentados:

- **CASO 1**

Três isolados de *C. parapsilosis* recolhidos num pequeno intervalo temporal (29 de Agosto a 17 de Setembro) e a partir de sangue e de urina de três pacientes diferentes internados na Unidade de Pediatria foram genotipados (Tabela 1). Observou-se que os três isolados partilhavam o mesmo genótipo multilocus, indicando que se tratava da mesma estirpe ou estirpes muito relacionadas. A presença, no mesmo período de tempo, da mesma estirpe em três pacientes diferentes sugerem a existência de um possível surto nosocomial nesta unidade hospitalar. Curiosamente, nenhuma outra estirpe de *C. parapsilosis* foi isolada durante este período de colheita nesta unidade hospitalar.

Tabela 1 - Aplicação da metodologia por genotipagem de marcadores de DNA microsatélite em diferentes isolados clínicos de *Candida parapsilosis*.

| Patient # | Produto Biológico | Unidade Hospitalar | Data | Genótipo Multilocus | | | |
|-----------|-------------------|--------------------|------------|---------------------|---------|---------|---------|
| | | | | CP1 | CP4 | CP6 | B |
| 1 | Urina | Pediatria | 29-08-2003 | 222/243 | 354/354 | 282/336 | 127/127 |
| 2 | Hemocultura | Pediatria | 08-09-2003 | 222/243 | 354/354 | 282/336 | 127/127 |
| 3 | Hemocultura | Pediatria | 17-09-2003 | 222/243 | 354/354 | 282/336 | 127/127 |

- **CASO 2**

O mesmo genótipo multilocus ou muito similar foi encontrado em estirpes de *C. parapsilosis* isoladas de superfícies hospitalares, mãos do pessoal hospitalar e pacientes internados (Tabela 2). O alto grau de similitude genética entre estes isolados indica uma possível via de transmissão da estirpe através das mãos do pessoal hospitalar e de superfícies contaminadas, como maçanetas das portas e carros médicos. Os isolados ambientais M, O e P foram todos colhidos no mesmo dia, um deles a partir de um carrinho médico e os outros dois das maçanetas das portas de uma mesma unidade hospitalar. Os locais de onde foram isolados sugerem uma possível transmissão da estirpe devido a contacto manual. Nenhum dos pacientes internados na unidade hospitalar analisada apresentaram infecções causadas por estirpes de *C. parapsilosis* com um genótipo multilocus semelhante.

Num outro caso, o isolado F foi recolhido das mãos de um profissional de saúde em janeiro/07 e apresentou o mesmo genótipo multilocus que um isolado recolhido de uma torneira de água em abril/07 e outro de um carrinho médico também em abril/07. Contrariamente ao observado no caso anterior, dois pacientes apresentaram infecções causadas por isolados com o genótipo multilocus, sendo que um dos pacientes estava internado nesta mesma unidade hospitalar, tendo a estirpe sido isolada a partir de uma hemocultura em Maio/07.

Tabela 2- Aplicação da metodologia de genotipagem por marcadores de DNA microssatélite em diferentes isolados de *Candida parapsilosis* provenientes de ambiente hospitalar

| Identificação do isolado | Origem | Unidade hospitalar | Data | Genótipo Multilocus | | | |
|--------------------------|---|--------------------|------------|---------------------|---------|---------|---------|
| | | | | CP1 | CP4 | CP6 | B |
| M | Maçaneta porta do quarto de um paciente | Hematologia | 11-04-2007 | 240/240 | 342/342 | 285/285 | 103/103 |
| O | Maçaneta porta da W.C. | Hematologia | 11-04-2007 | 240/240 | 342/342 | 285/285 | 103/103 |
| P | Carrinho médico | Hematologia | 11-04-2007 | 240/240 | 342/342 | 285/285 | 103/103 |
| F | Mãos pessoal hospitalar | Hematologia | 20-01-2007 | 222/243 | 354/354 | 282/336 | 129/129 |
| Q | Torneira | Hematologia | 11-04-2007 | 222/243 | 354/354 | 282/336 | 129/129 |
| R | Carrinho médico | Hematologia | 11-04-2007 | 222/243 | 354/354 | 282/336 | 129/129 |
| Isolado clínico | Hemocultura | Hematologia | 04-05-2007 | 222/243 | 354/354 | 282/336 | 129/129 |

No que respeita aos resultados obtidos nas colheitas das mãos do pessoal hospitalar, *Candida parapsilosis* revelou ser a levedura mais frequentemente isolada das mãos. A amostragem efectuada antes e depois da lavagem e desinfectação das mãos adequadas a ambiente hospitalar mostrou ser 100% eficaz.

5. CONCLUSÕES

Candida parapsilosis é um fungo leveduriforme oportunista causador de infecções sistémicas, principalmente em pacientes oncológicos e recém-nascidos. O controlo das infecções nosocomiais por *Candida* requer um conhecimento aprofundado, quer da estirpe infectante, quer do estado imunológico do paciente. Para uma melhor compreensão da epidemiologia desta espécie e também em prol da segurança do paciente, vários métodos de tipagem têm sido utilizados e a genotipagem por marcadores de DNA microssatélite mostrou ser uma metodologia altamente discriminatória, podendo assim ser uma ferramenta valiosa para apoiar investigações epidemiológicas. Este conhecimento, para o qual este trabalho visa contribuir, abre a possibilidade de pesquisas futuras neste campo. Medidas preventivas adequadas podem representar uma forma eficiente de diminuição da incidência das infecções fúngicas e o controlo de potenciais fontes de infecção endógenas e exógenas. Estas medidas incluem, por exemplo,

ações de sensibilização para o pessoal hospitalar e uma monitorização sistemática da carga fúngica do ambiente hospitalar durante a hospitalização.

6. REFERÊNCIAS

1. Kordbacheh P, Zaini F, Ansari K, Safara M. Study on the sources of nosocomial fungal infections at intensive care unit and transplant wards at a teaching hospital in Tehran. *Iranian J Publ Health*. 2005;34:1-8
2. Traoré O, Springthorpe V, Sattar S. A quantitative study of the survival of two species of *Candida* on porous and non-porous environmental surfaces and hands. *Journal of Appl Microbiol*. 2002;92:549-555
3. Almirante B, Rodriguez D, Cuenca-Estrella M, et al. (). Epidemiology, risk factors and prognosis of *Candida parapsilosis* bloodstream infections: case-control population-based surveillance study of patients in Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. *J Clin Microbiol*. 2006;44:1681-1685.
4. Tortorano AM, Kibbler C, Peman J, et al. Candidemia in Europe: epidemiology and resistance. *Int J Antimicrob Agents*. 2006;27:359-366.
5. Lupetti A, Tavanti A, Davini P et al. Horizontal transmission of *Candida parapsilosis* candidemia in a neonatal intensive care unit. *J Clin Microbiol*. 2002;40:2363–2369.
6. van Asbeck EC, Clemons KV, Stevens DA. *Candida parapsilosis*: a review of its epidemiology, pathogenesis, clinical aspects, typing and antimicrobial susceptibility. *Crit Rev Microbiol*. 2009;35:283-309.
7. Wenzel R, Edmond M. The impact of hospital-acquired bloodstream infections. *Emerg Infect Dis*. 2001;7:174-77.
8. Sabino R, Rosado L, Sampaio P, Stevens DA, Clemons KV, Pais C . New polymorphic microsatellite markers able to distinguish among *Candida parapsilosis sensu stricto* isolates. *J Clin Microbiol*. 2010;48:1677-82.