



## Genotipagem de *Candida parapsilosis* com marcadores de DNA microssatélite: uma ferramenta para o estudo e controlo das infeções hospitalares

Raquel Sabino<sup>1</sup>, Paula Sampaio<sup>2</sup>, Cristina Veríssimo<sup>1</sup>,  
Célia Pais<sup>2</sup>

raquel.sabino@insa.min-saude.pt

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

(2) Centro de Biologia Molecular e Ambiental. Departamento de Biologia, Escola de Ciências, Universidade do Minho.

### Introdução

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

*Candida parapsilosis* é um fungo leveduriforme oportunista causador de infeções sistémicas, principalmente em doentes oncológicos (1), doentes internados em unidades de cuidados intensivos (2) e em recém-nascidos (3). O controlo das infeções nosocomiais por *Candida* requer um conhecimento aprofundado da estirpe infetante e do estado imunológico do doente internado.

Os fungos reproduzem-se por libertação de esporos de pequena dimensão e têm uma elevada dispersão ambiental. São fontes comuns de aquisição de infeções fúngicas em ambiente hospitalar, os sistemas de ventilação e de ar condicionado, a água, poeira, matéria orgânica em decomposição, plantas e flores ornamentais, alimentos, obras de construção no hospital ou nas suas imediações e, até, os próprios doentes, visitantes e profissionais de saúde (4).

O modo de transmissão ocorre por contacto, ingestão ou inalação de partículas contaminadas. O grupo de doentes com risco acrescido de adquirir uma infeção fúngica nosocomial são os doentes transplantados ou oncológicos, bem como os doentes em cuidados intensivos e/ou continuados como os doentes queimados. Os do-

entes oncológicos, principalmente os doentes hematológicos apresentam um maior risco de desenvolvimento de infeções fúngicas invasivas. De facto, cerca de 20 a 50% destes doentes evidenciam sinais de infeção fúngica invasiva aquando da autópsia (5).

Na Europa e América Latina, a *Candida parapsilosis* é uma das espécies predominantemente isoladas da corrente sanguínea (1,6) e têm sido descritos vários surtos hospitalares causados por esta levedura, associados ao uso de cateteres, sondas, ou dispositivos prostéticos contaminados (7,8). Acresce que, e ao contrário de outras espécies de *Candida*, a *Candida parapsilosis* é frequentemente isolada das mãos dos profissionais de saúde (9).

A rápida identificação de estirpes envolvidas na infeção fúngica e o conhecimento da diversidade genética são questões de grande importância clínica, uma vez que podem contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias na prevenção e tratamento das infeções nosocomiais e, conseqüentemente, assegurar a melhoria do estado geral do doente.

### Objetivo

Este estudo teve como objetivo desenvolver novas ferramentas moleculares, que permitam responder atempadamente a questões epidemiológicas contribuindo, assim, para a redução do risco de infeções hospitalares por *Candida parapsilosis*.

### Material e métodos

Foram desenvolvidos métodos moleculares de genotipagem de DNA microssatélite de estirpes de *Candida parapsilosis* (10). O protocolo desenvolvido foi aplicado a 233 isolados de *Candida parapsilosis*. Estes isolados foram obtidos de 194 produtos biológicos (sangue; secreções do trato respiratório; urina, pele e unhas) de doentes internados e de 39 amostras provenientes do ar, de superfícies hospitalares, de dispositivos médicos e das mãos dos profissionais de saúde.

Na genotipagem foram utilizados quatro marcadores de DNA microssatélite 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, este método foi posteriormente aplicado ao estudo de casos em ambiente hospitalar, para os quais se procuravam respostas a nível epidemiológico.

## Resultados e discussão

Utilizando o método de genotipagem desenvolvido (10), observou-se que em casos de isolados múltiplos do mesmo doente, o genótipo multilocus de estirpes colonizadoras e causadoras de infeção manteve-se, podendo, este facto, indicar que determinado genótipo confere alguma adaptação ao hospedeiro.

Tendo como finalidade a deteção ou exclusão de surtos, bem como a detecção de possíveis fontes de contaminação, foram estudadas as estirpes de *Candida parapsilosis*, isoladas de diferentes doentes, bem como isolados colhidos em vários locais do ambiente hospitalar. Dos resultados obtidos descrevem-se as três investigações seguintes:

### Investigação 1

Foram genotipados três isolados de *Candida parapsilosis*, cujas amostras clínicas foram colhidas num intervalo de 2 semanas, a partir de sangue e de urina de três doentes internados no serviço de pediatria de uma unidade hospitalar. Observou-se que os três isolados apresentavam o mesmo perfil genotípico, indicando que se tratava da mesma estirpe ou estirpes muito relacionadas (Tabela 1).

A presença, no mesmo período de tempo e no mesmo serviço hospitalar, da mesma estirpe em três doentes internados sugere a existência de um surto nosocomial. Nenhuma estirpe de *Candida parapsilosis* foi isolada durante este período de colheita em outros serviços deste hospital.

### Investigação 2

Foi encontrado o mesmo genótipo ou um genótipo multilocus com um elevado grau de similaridade em estirpes de *Candida parapsilosis*, isoladas de diferentes superfícies do meio ambiente hospitalar, bem como das mãos de um profissional de saúde e, ainda, de um doente internado de um hospital (Tabela 2). O alto grau de similaridade genética entre estes isolados indica uma via de transmissão única da estirpe, provavelmente através do contacto direto com doentes e/ou com superfícies contaminadas.

Os isolados ambientais M, O e P (Tabela 2) foram todos colhidos no mesmo dia, um deles a partir de um carrinho de apoio clínico e os outros dois das maçanetas das portas de um mesmo serviço hospitalar. Os locais de colheita sugerem uma cadeia de transmissão da estirpe de *Candida parapsilosis* por contacto manual. Nenhum dos outros doentes internados no serviço hospitalar em análise apresentou infeções causadas por esta estirpe com um genótipo multilocus igual ou similar no mesmo período de tempo.

No isolado F, cuja amostra foi colhida das mãos de um profissional de saúde, foi identificado o mesmo genótipo, que nos isolados Q e R, colhidos de uma torneira de água e de um carrinho de apoio clínico 3 meses após a colheita do isolado F. Observou-se, ainda, que um doente internado neste mesmo serviço apresentou uma infeção por *Candida parapsilosis* com o mesmo genótipo (isolado C), 5 meses depois da colheita realizada das mãos do profissional de saúde (Tabela 2).

Tabela 1: ↓ Genotipagem de marcadores de DNA microssatélite em isolados clínicos de *Candida parapsilosis* colhidos num serviço de pediatria de um hospital.

Doente #	Sexo	Produto Biológico	Serviço Hospitalar	Genótipo Multilocus			
				CP1	CP4	CP6	B
1	Feminino	Urina	Pediatria	222/243	354/354	282/336	127/127
2	Masculino	Hemocultura	Pediatria	222/243	354/354	282/336	127/127
3	Masculino	Hemocultura	Pediatria	222/243	354/354	282/336	127/127

Tabela 2: **Genotipagem por marcadores de DNA microsatélite de *Candida parapsilosis* em isolados ambientais e clínicos colhidos num serviço de hematologia de um hospital.**

Identificação do isolado	Origem	Genótipo Multilocus			
		CP1	CP4	CP6	B
M	Maçaneta da porta do quarto de um doente	240/240	342/342	285/285	103/103
O	Maçaneta da porta de instalações sanitárias	240/240	342/342	285/285	103/103
P	Carrinho de apoio clínico	240/240	342/342	285/285	103/103
F	Mãos de profissional de saúde	222/243	354/354	282/336	129/129
Q	Torneira	222/243	354/354	282/336	129/129
R	Carrinho de apoio	222/243	354/354	282/336	129/129
C	Hemocultura	222/243	354/354	282/336	129/129

No que respeita aos resultados obtidos das colheitas feitas nas mãos dos profissionais de saúde hospitalar, *Candida parapsilosis* revelou ser a levedura mais frequentemente isolada. Conforme apresentado na **Figura 1**, a lavagem e desinfeção das mãos mostrou ser essencial, quer na remoção de leveduras quer de fungos filamentosos.

### Investigação 3

Foi realizada a genotipagem em 49 isolados provenientes de diferentes produtos biológicos e do meio ambiente de um hospital. Verificou-se que em cinco destes isolados, (4 hemoculturas e 1 catéter), cujas colheitas foram efetuadas em cinco doentes durante o período de dois anos, partilhavam o mesmo genótipo multilocus (**Tabela 3**). Durante este período de tempo, não foi detetado este genótipo multilocus em nenhum dos isolados de *Candida parapsilosis* colhidos e analisados noutros serviços deste hospital. Este facto, sugere a presença de uma estirpe residente no hospital em estudo.

Figura 1: **Placas de contacto das mãos dos profissionais de saúde hospitalares antes (a) e depois (b) da lavagem e desinfeção das mãos.**

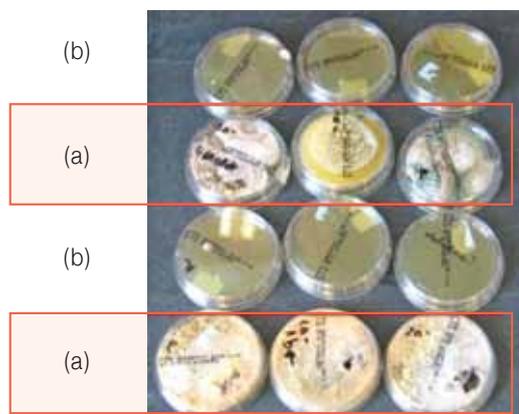


Tabela 3: **Genotipagem por marcadores de DNA microsatélite de isolados de *Candida parapsilosis* obtidos de um dispositivo médico e de quatro doentes internados de um hospital.**

Doente #	Produto	Genótipo Multilocus			
		CP1	CP4	CP6	B
1	Hemocultura	240/252	300/300	285/285	147/149
2	Hemocultura	240/252	300/300	285/285	147/149
3	Catéter	240/252	300/300	285/285	147/149
4	Hemocultura	240/252	300/300	285/285	149/149
5	Hemocultura	240/252	300/300	285/285	149/149

## \_Conclusões

Para uma melhor compreensão da epidemiologia de *Candida parapsilosis* em ambiente hospitalar e também em prol da melhoria do estado de saúde do doente internado, vários métodos de tipagem têm sido desenvolvidos. A genotipagem por marcadores de DNA microssatélite mostrou ser uma metodologia altamente discriminatória, podendo assim, ser uma ferramenta valiosa para apoiar as investigações epidemiológicas.

Com este estudo, e assumidas as limitações conceptuais do mesmo, constatou-se que a presença simultânea de casos de infeção por *Candida parapsilosis* no mesmo serviço hospitalar (investigação 1 e 3) e a presença continuada da mesma estirpe de *Candida parapsilosis* nas mãos de um profissional de saúde, num doente internado e em diferentes superfícies (investigação 2), indicam que esta espécie fúngica é um importante veículo de infeção nosocomial, que merece a melhor atenção pelas comissões de controlo de infeção e entidades hospitalares competentes.

O desenvolvimento de marcadores de DNA microssatélite na genotipagem de estirpes de *Candida parapsilosis*, abre a possibilidade de investigações epidemiológicas futuras em meio hospitalar, nomeadamente a identificação atempada de potenciais reservatórios de infeções endógenas e exógenas por *Candida parapsilosis*. Por outro lado, a utilização desta ferramenta molecular alerta também para a adoção de medidas preventivas adequadas, que irão certamente contribuir para a diminuição da incidência das infeções fúngicas nosocomiais, fundamentar ações de sensibilização periódicas para os profissionais hospitalares e, ainda, sustentar uma monitorização sistemática da carga fúngica em ambiente hospitalar.

## \_Agradecimentos

Os autores agradecem, a todos que colaboraram na obtenção dos dados e produção deste artigo; à Doutora Cristina Furtado pela revisão científica do artigo.

## Referências bibliográficas:

- (1) 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(5):1681-5. [LINK](#)
- (2) Diab-Elschahawi M, Forstner C, Hagen F, et al. Microsatellite genotyping clarified conspicuous accumulation of *Candida parapsilosis* at a cardiothoracic surgery intensive care unit. *J Clin Microbiol.* 2012;50(11):3422-6. [LINK](#)
- (3) Romeo O, Delfino D, Cascio A, et al. Microsatellite-based genotyping of *Candida parapsilosis sensu stricto* isolates reveals dominance and persistence of a particular epidemiological clone among neonatal intensive care unit patients. *Infect Genet Evol.* 2013;13:105-8.
- (4) Kordbacheh P, Zaini F, Ansari K, et al. 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(2):1-8. [LINK](#)
- (5) 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. *J Appl Microbiol.* 2002;92(3):549-55.
- (6) Tortorano AM, Kibbler C, Peman J, et al. Candidemia in Europe: epidemiology and resistance. *Int J Antimicrob Agents.* 2006;27(5):359-66.
- (7) 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(7):2363-9. [LINK](#)
- (8) 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(4):283-309.
- (9) Wenzel R, Edmond M. The impact of hospital-acquired bloodstream infections. *Emerg Infect Dis.* 2001;7(2):174-7. [LINK](#)
- (10) Sabino R, Rosado L, Sampaio P, et al. New polymorphic microsatellite markers able to distinguish among *Candida parapsilosis sensu stricto* isolates. *J Clin Microbiol.* 2010;48(5):1677-82. [LINK](#)