

TIPAGEM MOLECULAR DE *Candida parapsilosis* ISOLADAS DE PACIENTES HOSPITALIZADOS

Felipe Antonio Carvalho da Costa (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Karina Mayumi Sakita (PBF/UEM), Patrícia de Souza Bonfim de Mendonça (Co-orientadora), Érika Seki Kioshima Cotica (Orientador), e-mail: eskioshima@gmail.com

Universidade Estadual de Maringá/Centro de Ciências Biológicas e da Saúde/Maringá, PR.

Área e subárea: Farmácia – Análise Toxicológica

Palavras-chave: *Candida parapsilosis*, RAPD, infecções hospitalares.

Resumo

As infecções hospitalares ocasionadas pelo gênero *Candida* são responsáveis por alta mortalidade, especialmente em pacientes imunodeprimidos. A espécie *C. parapsilosis* se destaca pelos frequentes casos de infecções disseminadas em pacientes neonatos. A colonização das mãos dos profissionais de saúde e o ambiente hospitalar, são importantes reservatórios potenciais destas leveduras. Métodos moleculares têm possibilitado estudos epidemiológicos e a determinação do perfil genético dos microrganismos, permitindo assim a adoção de medidas profiláticas adequadas. Neste trabalho seis amostras de três pacientes foram analisadas pela técnica de RAPD. Os resultados do agrupamento indicam que as amostras são muito semelhantes entre elas, com valores de $S_{AB} > 0,8$. Os isolados dos três pacientes, acomodados em locais diferentes de um mesmo hospital, apresentaram alta similaridade nas análises de RAPD por três primers diferentes, sugerindo uma origem comum para pelo menos parte deles. Assim, a aplicação de técnicas de RAPD fornece uma análise rápida e eficiente para investigação de similaridade entre isolados nosocomiais.

Introdução

Infecções fúngicas invasivas (IFI) são infecções severas, que atingem a corrente sanguínea ou se disseminam para órgãos profundos. *C. albicans* foi, até alguns anos, a espécie que mereceu maior atenção clínica. No entanto, em paralelo com o aumento global das infecções fúngicas tem sido observado que as infecções causadas por *Candida* não-*C. albicans* (CNCA) tem emergindo de modo alarmante (Luzzati, et al. 2016). Dentre as quais, *Candida parapsilosis* tem sido um patógeno frequentemente associado a infecções em neonatos (Sriram, et al. 2014). Especialmente nesse grupo de pacientes, as infecções por *C. parapsilosis* são responsáveis pelo aumento do tempo de permanência hospitalar, altas taxas de mortalidade e prejuízo do desenvolvimento neurológico. Diversos autores têm destacado o aumento da resistência de *C. parapsilosis* aos antifúngicos.

O relevante aumento das infecções fúngicas hospitalares trouxe consequências como o aumento da taxa de isolados clínicos clonais entre isolados

clínicos, entre outros fatores, a disseminação intra-hospitalar, seja por meios diretos ou indiretos. Apesar disso, pouco se investiga sobre a origem das leveduras. O conhecimento sobre os isolados clínicos clonais entre isolados clínicos de *Candida* sp. tem grande relevância para o diagnóstico clínico, tratamento e epidemiologia de infecções de repetição e, sobretudo das infecções fúngicas hospitalares (Sakita et al., 2017). Neste contexto, a aplicação de técnicas de tipagem molecular tem sido utilizadas para distinguir isolados de *Candida* spp e contribuir na investigação de isolados clínicos clonais. Desta forma, o presente projeto tem como objetivo principal aplicar a metodologia de RAPD para genotipagem de isolados nosocomiais de *C. parapsilosis*.

Materiais e métodos

Análise literária: Uma coleção de textos foi selecionada da base de dados *PubMed*, filtrada com os *Mesh Terms* adequados para a formação dos blocos. O bloco 1 continha "*Candida*"[Mesh] AND "*Random Amplified Polymorphic DNA Technique*"[Mesh]. Em seguida, um bloco de exclusões foi definido e aplicado como NOT ao bloco 1. Foram excluídas da revisão publicações do tipo editorial, comentário, relato de caso, *guidelines*, notícias, relatórios técnicos e meta-análises, devendo ter o resumo livre em inglês e publicados entre as datas de 2009 e 2019. Os artigos achados a partir disso entraram para serem avaliados individualmente por leitura completa.

Cultivo e extração do DNA : Os seis isolados clínicos analisados neste trabalho são provenientes de 3 pacientes, que estiveram internados na UTI neonatal (RN) e pediátrica (PAC1 e PAC2) no mesmo período. Estas leveduras se encontravam na micoteca do Laboratório de Micologia Médica da Universidade Estadual de Maringá, armazenadas a -80°C. O projeto foi aprovado pelo COPEP (parecer n. 2.748.843). A reativação foi feita em meio *Sabouraud Dextrose Broth* (SDB), 37°C por 48h. Os cultivos foram mantidos em SDA. Para extração do DNA, uma colônia, de cada amostra, foi transferida para SDB e incubado a 35°C, por 18 horas, sob agitação. Para extração do DNA foi utilizado o protocolo de Bonfim *et al.* (2013). O DNA genômico foi quantificado por densidade óptica em espectrofotômetro e analisado em gel de agarose 1%

Análises RAPD: Os isolados de *C. parapsilosis* foram analisados usando três diferentes primers: P4 (5'-AAGAGCCCGT-3'), OPA-18 (5 'AGCTGACCGT3') e OPE18 (5 'GGACTGCAGA 3'), conforme Bonfim *et al.* (2013). Os perfis de RAPD foram analisados no software Bionumerics versão 7.6 (Applied Maths, Carlsbad, CA, USA). A similaridade foi verificada pelo coeficiente (S_{AB}) entre cada par de padrão de isolados A e B e calculado com a fórmula $S_{AB} = 2E/(2E+a+b)$, sendo E o nº bandas comuns nos padrões A e B, a é o nº bandas com um padrão a não correlacionado com padrão B, e b é o nº bandas com padrão B não correlacionado ao padrão A. A partir da matriz de similaridade, as unidades foram agrupadas pelo método UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetical Average*).

Resultados e Discussão

A confluência dos blocos criados na análise bibliográfica resultou em 50 artigos, os quais entraram para serem avaliados individualmente por leitura completa. No final, somente 38 artigos ficaram na tabela definitiva. A maioria dos trabalhos aplicava a técnica no DNA genômico (34,21%). Das cepas selecionadas, *C. albicans* (60,52%) foi a mais predominante, seguida por *C. parapsilosis* (31,58%). A variedade dos primers foi grande, mas M13 (15,78%), OPE-18 (10,52%), OPBA (7,89%) e P4 (7,89%) se destacaram. No geral, o Brasil merece destaque na produção científica sobre a aplicação da RAPD-PCR, sendo o país mais predominante em publicações nesse sentido, acompanhado na Polônia e China, dado que valoriza a pesquisa brasileira no diagnóstico molecular de candidemias.

Tabela 1 - Artigos selecionados na revisão literária

Autor (ano)	País	Espécie analisada	Breve descrição	Primer e Região amplificada
Sakita, K., <i>et al.</i> (2017)	Brasil	<i>C. albicans</i> <i>C. tropicalis</i> <i>C. parapsilosis</i>	Amostras das mãos de profissionais da saúde e UTI foram avaliadas em sua susceptibilidade e potencial de virulência.	Primer: P4:(5'-AAGAGCCCGT-3'), OPA-18: (5'AGCTGACCGT3') e OPE-18: (5'GGACTGCAGA 3'). Região: ITS
Bacelo, K. L., <i>et al.</i> (2009)	Brasil	<i>C. albicans</i>	Avaliar a semelhança entre isolados micológicos para saber sua trajetória patológica e vias de transmissão.	Primer: OPE-18: (5'-GGACTGCAGA-3'), OPB-11: (5'-GTAGACCCGT-3') e OPA-9: (5'-GGGTAACGCC-3') Região: gDNA.
Bonatti, H., <i>et al.</i> (2009)	Áustria	<i>C. krusei</i>	Diferenciar amostras clínicas de isolados vindos de pacientes que receberam transplantes e fizeram cirurgia em um hospital.	Primer: M13: (5'-GAGGGTGGCGGTTCT-3'), OPA-18: (5'-AGGTGACCGT-3'), e OPE-18: (5'-GGACTGCAGA-3'). Região: gDNA

As análises de RAPD utilizando três primers indicaram que estes isolados são muito semelhantes entre eles, uma vez que os valores do coeficiente de similaridade apresentaram-se entre 0,8 e 0,99 (**Fig 1**). As amostras de hemocultura do paciente 1 apresentaram similaridade de 100%, para os três conjuntos de primers. Já as amostras do paciente 2, agruparam-se com 100% de similaridade para os primers P4 e OPA18. A amostra da hemocultura deste paciente não amplificou com primer OPE18. O DNA amplificado do paciente recém-nascido clusterizou principalmente com as amostras do paciente 2, com alta similaridade para os primers OPA18 (100%) e P4 (86%). Já na amplificação com o primer OPE18 esta amostra clusterizou com o paciente 1. Tanto a identificação morfológica pelos métodos clássicos, quanto a identificação pela técnica de MALDI-TOF apontaram que os seis isolados clínicos são *Candida parapsilosis* (*sensu stricto*).

Em seus estudos Bonfim et al, (2013) também encontraram isolados clínicos com alta similaridade no ambiente hospitalar. Mais recentemente, Sakita et al. (2017) mostrou que profissionais da área da saúde podem funcionar como veiculadores de espécies de *Candida* sp. Este fato é bastante relevante quando se trata da espécie *C. parapsilosis*, uma levedura que fazer parte da microbiota transitória das mãos. Em seus estudos Bonfim et al, (2013) também encontraram isolados clínicos com alta

similariedade no ambiente hospitalar. Mais recentemente, Sakita et al. (2017) mostrou que profissionais da área da saúde podem funcionar como veiculadores de espécies de *Candida* sp. Este fato é bastante relevante quando se trata da espécie *C. parapsilosis*, uma levedura que fazer parte da microbiota transitória das mãos. Assim, uma correta assepsia das mãos antes da manipulação de pacientes, no ambiente hospitalar, parece ser indispensável no controle das infecções nosocomiais.

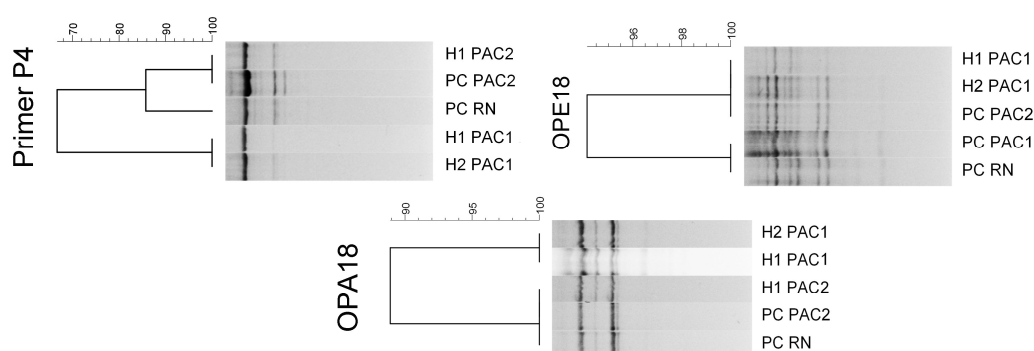


Figura 1. Dendrograma gerado pela amplificação dos primers P4, OPE18 e OPA18 e clusterização pelo UPGMA. Os valores de S_{AB} foram calculados pelo coeficiente de Dice para isolados de *Candida parapsilosis*. **P4** – S_{AB} $0,80 \pm 0,16$; **OPE18** – S_{AB} $0,94 \pm 0,05$; **OPA18** – S_{AB} $0,98 \pm 0,01$. H1 - Hemocultura 1ª amostra. H2 - Hemocultura 2ª amostra. PC – ponta de cateter. PAC1 – paciente 1 da UTI pediátrica. PAC2 – paciente 2 da UTI pediátrica. RN - paciente da UTI neonatal.

Conclusão

Neste estudo foi possível identificar alta similaridade entre os isolados dos três pacientes acomodados em dois locais diferentes de um mesmo hospital, sugerindo origem comum para pelo menos parte deles. Assim, a aplicação de técnicas de RAPD fornece uma análise rápida e eficiente para investigação de similaridade entre isolados nosocomiais.

Agradecimentos

Agradecemos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo incentivo à pesquisa e a expansão da ciência.

Referências

- LUZZATI, R., et al. Nosocomial candidemia in patients admitted to medicine wards compared to other wards: a multicentre study. **Infection** 44, 747-755, 2016.
- SRIRAM, B., et al. Systemic candidiasis in extremely low birth weight (ELBW) neonates despite the routine use of topical miconazole prophylaxis: trends, risk factors and outcomes over an 11-year period. **Ann Acad Med Singapore** 43, 255-262, 2014
- SAKITA, K. M., et al. Healthcare workers' hands as a vehicle for the transmission of virulent strains of *Candida* spp.: A virulence factor approach. **Microb Pathog.** v. 113, p. 225-232, 2017.
- BONFIM-MENDONÇA, P. S., et al. Molecular typing of *Candida albicans* isolates from hospitalized patients. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.** v. 55, 2013