

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

MELIZA ARANTES DE SOUZA BESSA

PERFIL MOLECULAR DE ESPÉCIES DE *CANDIDA* ISOLADAS EM UMA UNIDADE
DE TERAPIA INTENSIVA NEONATAL DE UM HOSPITAL UNIVERSITÁRIO

UBERLÂNDIA
2020

MELIZA ARANTES DE SOUZA BESSA

PERFIL MOLECULAR DE ESPÉCIES DE *CANDIDA* ISOLADAS EM UMA UNIDADE
DE TERAPIA INTENSIVA NEONATAL DE UM HOSPITAL UNIVERSITÁRIO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Coordenação do Curso de Ciências Biológicas,
da Universidade Federal de Uberlândia, como
requisito parcial para a obtenção do grau de
Licenciatura em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Microbiologia Médica

Orientadora: Profa. Dra. Denise Von Dolinger
de Brito Röder

UBERLÂNDIA

2020

MELIZA ARANTES DE SOUZA BESSA

PERFIL MOLECULAR DE ESPÉCIES DE *CANDIDA* ISOLADAS EM UMA UNIDADE
DE TERAPIA INTENSIVA NEONATAL DE UM HOSPITAL UNIVERSITÁRIO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Coordenação do Curso de Ciências Biológicas,
da Universidade Federal de Uberlândia, como
requisito parcial para a obtenção do grau de
Licenciatura em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Microbiologia Médica

Uberlândia, 02 de Dezembro de 2020.

Banca Examinadora

Prof. Dra. Denise Von Dolinger de Brito Röder – ICBIM/UFU

Dra. Ralciane de Paula Menezes – ESTES/UFU

Prof. Dr. Mário Paulo Amante Penatti – ESTES/UFU

Dedico esse trabalho a todas as famílias que sofreram
e/ou sofrem com ausência de seus recém-nascidos
que ficam no hospital lutando bravamente pela vida.

Que todos os esforços da equipe da UTIN
permitam sempre devolver os filhos
de vocês gozando de plena saúde.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida, pela saúde e por ter me capacitado diariamente me possibilitando realizar esse sonho de concluir essa etapa na minha vida. Pude ver *Sua* bondade e cuidado comigo em cada detalhe e por isso *bendito seja Deus, que não me rejeita a oração e nem afasta de mim a sua graça (Salmos 66:20)*;

Agradeço aos meus pais Marcos Arantes de Souza e Neuza M^a Alves de Souza (*in memoriam*) por sempre acreditarem em mim, por serem minha inspiração para nunca desistir e por me mostrar que *tudo é possível ao que crê (Marcos 9:23b)*;

Ao meu amado esposo, Rodrigo de Araújo Bessa, agradeço pelo incentivo e por oportunizar minha retomada aos estudos, sem sua ajuda e cooperação teria sido muito mais árduo, obrigada por transformar meus dias difíceis em leves e alegres com seu sorriso e presença confortante. Aos meus lindos e amados filhos, Melinda Arantes Bessa e Gustavo Arantes Bessa agradeço pelo apoio e pela compressão nas minhas ausências, vocês foram e são meus melhores motivos para me levantar da cama e ir luta por dias melhores.

Agradeço ao meu irmão Alexandre Arantes de Souza Neto, minha cunhada Leila Gama Arantes, sobrinhos Calele e Kalita, por compreender minha ausência e por me incentivar; de igual forma agradeço a todos meus tios Arantes: Marta, Marly, Mariza, Nilva, Valéria, Mauro e em especial, Alexandre Arantes Filho por ser um árduo incentivador da busca pelo conhecimento, ele foi o tio que mais me cobrava estudar, pois não se conformava de ter me casado sem começar a graduação, enfim “Tili”, cheguei ao final do primeiro ciclo da vida acadêmica, obrigada por nunca ter desistido de acreditar no meu potencial. Agradeço a todos meus primos e primas pela compreensão das minhas ausências, tenho muito orgulho de cada um;

Agradeço aos sogros, Gilberto Bessa e Maria Abadia de Araújo Bessa, por ter investido tempo em me ajudar a voltar a estudar, olhando os netos por um período quando estavam pequenos, sem vocês teria sido muito mais difícil. Agradeço meus cunhados: Luciana Bessa, Yata Anderson Muniz, Gilberto Junior e Kênia Portes; e sobrinhos, Gabriela, Davi e Geovana por serem grandes incentivadores;

Ao professor Dr. Mário Paulo Amante Penatti por ter aberto as portas da Escola Técnica de Saúde (ESTES/UFU) para mim, por ter me dado todo suporte necessário e ensinado com muito critério ter paixão pelo que se faz. Obrigada pela confiança, pelo coração generoso, pelas cobranças e broncas, percebo claramente que o seu único intuito, era de nos tornar mais resilientes e preparados para irmos mais longe e eu irei, prometo!!!

Ao professor Dr. Reginaldo dos Santos Pedroso que me ensinou a seriedade em pesquisar, de sempre questionar, refletir e sempre buscar melhorar os processos. Obrigada pela coragem de ter me colocado no caminho da pesquisa e acreditado em mim, sempre carregarei a seriedade que você me ensinou;

À Dra. Ralciane de Paula de Paula Menezes pela confiança depositada desde os primeiros experimentos, pela autonomia, pelo profissionalismo e dedicação demonstrada com tudo que faz, fico tão feliz de ter seu suporte, dicas e incentivo que me faz viver uma verdade, *“o Senhor está comigo entre aqueles que me ajudam” (Salmo 118:7)*. Desejo retribuir toda a confiança, o companheirismo e amizade sempre;

À professora Dra. Denise von Dollinger de Brito Röder que aceitou o desafio de me orientar, agradeço pela serenidade, paciência e resiliência, saiba que todos seus esforços somaram muito para meu aprendizado. Finalizo com o único sentimento no meu coração, GRATIDÃO por tudo, pelo grupo que formamos durante longos anos, por cada um que contribuiu com minha formação: Felipe, Gabriel, Lara, Maria Gabriela, Murilo, Nagela, Renner, Sávia, Samuel, o técnico do laboratório Eurípedes e em especial a doutoranda Priscila Guerino Vilela Alves, que desde meu ingresso na pesquisa me acompanhou, ajudando e me incentivando. Seguimos juntas até o final, quero te dizer que *“quando um membro sofre, todos os outros sofrem com ele; quando um membro é honrado, todos os outros se alegram com ele” (1º Coríntios 12:26)*. Te digo que vou estar lá no dia da sua defesa para celebrar sua vitória e me alegrar com você. Enfim esta é a prova que juntos somos mais fortes. Agradeço cada um desse grupo, onde ganhei tanto, ganhei amigos que vou levar para vida inteira, torço pelo sucesso de cada um;

Agradeço a todos meus amigos da Turma 13 da Biologia, a turma melhor que já existiu na UFU e a todos os outros que foram agregados a ela. Agradeço a todos os professores pela seriedade com o ensino e por compartilhar, cooperar e instruir no caminho do conhecimento.

Agradeço à coordenação do curso de Ciências Biológicas nas pessoas dos nossos secretários: Leandro, Stefhanía e Gilvane por todo apoio necessário prestado; e a todos que direta e indiretamente colaboraram para a concretização desse sonho;

Agradeço a Escola Técnica de Saúde da Universidade Federal de Uberlândia (ESTES-UFU) que forneceu todo o subsídio para que esse trabalho fosse executado;

À PROGRAD/UFU e ao CNPq pelo apoio financeiro.

*“Você ganha forças, coragem e confiança
a cada experiência em que você enfrenta
o medo. Você tem que fazer exatamente
aquilo que acha que não consegue.*

*Você precisa fazer aquilo que
não é capaz de fazer.”*

(Eleanor Roosevelt)

*“Ainda que a figueira não floresça,
nem haja fruto na vide;
o produto da oliveira minta,
e os campos não produzam mantimento;
as ovelhas sejam arrebatadas do aprisco,
e nos currais não haja gado, todavia,
eu me ALEGRO no Senhor,
EXULTO no Deus da minha salvação.
O Senhor Deus é a minha fortaleza,
e faz os meus pés como os da corça,
e me faz andar altaneiramente.”*
(Habacuque 3:17-19 ARA)

*“A mente que se abre a uma nova ideia
jamais volta ao seu tamanho original.”*
(Albert Einstein)

RESUMO

Introdução: Infecções relacionadas à assistência a saúde causadas espécies de *Candida* estão cada vez mais frequentes, comprometendo ainda mais a saúde dos pacientes internados, inclusive o desenvolvimento de neonatos críticos em função de sua maior suscetibilidade. Apesar da grande importância, há poucos relatos na literatura que busquem estabelecer uma relação entre os isolados provenientes de infecções invasivas com aqueles provenientes do ambiente hospitalar. **Objetivos:** Analisar o perfil molecular dos isolados de *Candida* spp., provenientes de infecções invasivas em neonatos, das mucosas oral e perianal desses e do ambiente da Unidade de Terapia Intensiva Neonatal (UTIN) do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HC-UFU), pela técnica de Amplificação Aleatória de DNA Polimórfico (RAPD-PCR). **Material e Métodos:** Foram avaliadas 40 amostras de *C. albicans* e *C. parapsilosis* provenientes da UTIN do HC-UFU obtidas entre junho de 2015 a maio de 2017 pela metodologia RAPD-PCR, utilizando dois *primers* específicos (OPB11 e OPA09) com intuito de verificar se há alguma relação genética entre os isolados e tentar estabelecer as possíveis rotas de infecção. **Resultados:** Dos 40 isolados, 23 (57,5%) eram de *C. albicans* e 17 (42,5%) do complexo *C. parapsilosis*. A análise molecular demonstrou 23 genótipos para *C. albicans* e 14 para *C. parapsilosis*. Alta similaridade foi encontrada entre os isolados de *C. albicans* (CA05 e CA07), obtidos de corrente sanguínea e mucosa perianal do recém-nascido (RN2) com o isolado (CA06) da mucosa oral da mãe. E também entre os isolados (CA11 e CA14) de neonatos distintos (RN3 e RN4), além dos isolados (CA16 e CA17) de mucosa oral e perianal (RN5). Situação semelhante foi encontrada entre os isolados ambientais de *C. parapsilosis* (CP7 e CP14) obtidos de incubadora e pia de higienização de mãos, respectivamente, assim como (CP6 e CP8) obtidos da porta de entrada de funcionários da UTIN e da porta da sala de higienização de mãos, além dos isolados (CP4 e CP5) obtidos de incubadoras diferentes que apresentaram genótipo idêntico. **Conclusão:** Este estudo revelou que os isolados de *C. albicans* apresentou similaridade entre amostras clínicas dos neonatos indicando colonização prévia, sugerindo infecção de origem endógena. Já os isolados de *C. parapsilosis* apresentou maior similaridade genética entre isolados ambientais, indicando o ambiente como possível reservatório, possibilitando a disseminação da espécie na unidade. Conhecer o parentesco dos isolados é essencial para estabelecer possíveis medidas de controle e prevenção a fim de evitar disseminação na unidade e reduzir a incidência de candidíases invasivas.

Palavras-chave: UTIN; *C. albicans*; *C. parapsilosis*; ambiente; recém-nascido; RAPD-PCR

ABSTRACT

Introduction: Infections related to health care caused by *Candida* species are more and more frequent, compromising the health of inpatients even more, including the development of critical neonates due to their greater susceptibility. Despite its great importance, there are few reports in the literature that seek to establish a relationship between isolates from invasive infections and those from the hospital environment. **Objectives:** To analyze the molecular profile of *Candida* spp. Isolates from invasive infections in neonates, their oral and perianal mucosa and the environment of the Neonatal Intensive Care Unit (NICU) at Hospital de Clínicas, Universidade Federal de Uberlândia (HC-UFU), by the technique of Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD-PCR). **Material and Methods:** 40 samples of *C. albicans* and *C. parapsilosis* from the NICU of HC-UFU obtained between June 2015 and May 2017 by the RAPD-PCR methodology were evaluated, using two specific *primers* (OPB11 and OPA09) in order to check if there is any genetic relationship between the isolates and try to establish the possible routes of infection. **Results:** Of the 40 isolates, 23 (57.5%) were from *C. albicans* and 17 (42.5%) from the *C. parapsilosis* complex. The molecular analysis showed 23 genotypes for *C. albicans* and 14 for *C. parapsilosis*. High similarity was found among *C. albicans* isolates (CA05 and CA07), obtained from blood and perianal mucosa of the newborn (RN2) with the isolate (CA06) from the mother's oral mucosa. And also among isolates (CA11 and CA14) from different neonates (RN3 and RN4), in addition to isolates (CA16 and CA17) from oral and perianal mucosa (RN5). A similar situation was found among the environmental isolates of *C. parapsilosis* (CP7 and CP14) obtained from an incubator and hand washing sink, respectively, as well as (CP6 and CP8) obtained from the NICU entrance door and the room door hand hygiene, in addition to the isolates (CP4 and CP5) obtained from different incubators that had identical genotype. **Conclusion:** This study revealed that *C. albicans* isolates showed similarity between clinical samples of neonates indicating previous colonization, suggesting infection of endogenous origin. The *C. parapsilosis* isolates, on the other hand, showed greater genetic similarity between environmental isolates, indicating the environment as a possible reservoir, enabling the dissemination of the species in the unit. Knowing the kinship of the isolates is essential to establish possible control and prevention measures in order to avoid dissemination in the unit and to reduce the incidence of invasive candidiasis.

Keywords: UTIN; *C. albicans*; *C. parapsilosis*; environment; Newborn; RAPD-PCR.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS	16
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
3.1 Amostra de estudo.....	16
3.2 Avaliação do perfil molecular pela técnica de RAPD-PCR	17
3.2.1 Extração do DNA.....	17
3.2.2 Técnica molecular.....	18
3.3 Análise dos dados.....	19
3.4 Comitê de Ética.....	19
4 RESULTADOS	20
5 DISCUSSÃO	25
6 CONCLUSÃO	28
REFERÊNCIAS	29
ANEXO A – PARECER COMITÊ DE ÉTICA COM PESQUISA EM SERES HUMANOS – UFU	33

1 INTRODUÇÃO

A sobrevivência de recém-nascidos (RN) prematuros aumentou consideravelmente nos últimos anos em virtude dos avanços ocorridos na Neonatologia e pelo emprego de modernas tecnologias na Medicina, que permitiram a manutenção do RN em ambiente hospitalar até que o mesmo complete o seu desenvolvimento e maturação de órgãos e sistemas. Durante a permanência dos mesmos no ambiente hospitalar, os RN fazem uso de vários dispositivos invasivos que auxiliam na manutenção das funções vitais e permitem a administração de nutrientes e medicamentos. A permanência prolongada dos mesmos em ambiente hospitalar, somado aos diversos procedimentos invasivos aos quais são submetidos e ao sistema imune imaturo, favorecem a instalação e desenvolvimento de infecções que podem ser graves e levar o paciente ao óbito (GARZILLO, 2017).

Em Unidades de Terapia Intensiva Neonatal (UTIN) os RN apresentam alto risco de desenvolver Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) por fatores intrínsecos como: pouca idade gestacional (<28 semanas), baixo peso ao nascer (<1500g), malformação congênita, cirurgias variadas, patologias pulmonares, sendo displasia broncopulmonar a mais frequente, cirurgias abdominais por causa de enterocolite necrotizante, imaturidade das barreiras (pele, mucosa) e das respostas imunes sistêmicas (GARCÍA et al. 2019; BOO; CHEAH, 2016; CHARISZADEH, 2018; CANTEY; MILSTONE, 2015; DAHAN, 2016).

Além disso, alguns procedimentos que são importantes no suporte e no cuidado para sustentar a vida, não estão isentos de apresentar riscos e complicações aos neonatos e podem ser considerados fatores de risco extrínsecos para ocorrência de IRAS em neonatos admitidos em UTIN (GARCÍA et al, 2019). Dentre eles, destacam: uso de cateter venoso central (CVC), cateter venoso umbilical (CVU), cateter de inserção periférica (PICC), ventilação mecânica, nutrição parenteral, drenos, sondas, uso prolongado de CVC (>21 dias) e nutrição parenteral (>14 dias), elevada manipulação de cateteres (>200 vezes ao dia), além do tempo de hospitalização prolongado e terapia antimicrobiana de amplo espectro (GARCÍA et al, 2019; ROSADO et al, 2018; TZIALLA et al., 2015).

Estudos científicos mostram que a taxa de IRAS em neonatos de extremo baixo peso (<1000g) e/ou pequena idade gestacional (<28 semanas) em países desenvolvidos, como a Alemanha, pode chegar a 42,8%, sendo *Pseudomonas aeruginosa* o patógeno que apresentou maior taxa de letalidade (50%), seguido por *Candida albicans* (24%), *Escherichia coli* e *Klebsiella* spp., ambos com frequência de 11% (HÄRTEL et al, 2020). O principal micro-organismo responsável pela ocorrência de IRAS em países desenvolvidos, como a Itália, é o

Staphylococcus coagulase negativa (SCoN) (21,4%), seguidos de *Escherichia coli* (15,1%), *Staphylococcus aureus* (12,4%) (BERARDI et al, 2019).

Entre os SCoN destaca-se *S. epidermidis*, que coloniza pele e mucosas e ganha destaque pois, pode translocar desses sítios para a corrente sanguínea, visto que a pele do RN é mais delgada e não é totalmente queratinizada. Assim, *S. epidermidis* pode penetrar mais facilmente essas barreiras e causar infecção nos neonatos mais do que em outros pacientes. *S. aureus* também é responsável por elevadas taxas de IRAS em berçários ao redor do mundo (11% a 34%), como nos Estados Unidos, onde há relatos de que os membros da equipe multiprofissional são o principal reservatório (HSU et al, 2020; CAMACHO-GONZALEZ; SPEARMAN; STOLL, 2013).

Entre as espécies de micro-organismos Gram-negativos, *Escherichia coli* é mais frequente, e apresenta uma taxa de mortalidade igual a 11,2%, porém *Pseudomonas aeruginosa*, apesar da frequência menor, é líder em mortalidade (57,1%) (HÄRTEL et al, 2020).

Já em países em desenvolvimento, bacteremias por bactérias Gram-negativas são mais comuns, sendo responsáveis por até 45% dos casos. Os micro-organismos mais frequentemente isolados são *Klebsiella* spp. (22,8%), *E. coli* (4,84%) e *Acinetobacter* spp. (4,59%). A taxa de mortalidade por IRAS chega a 20,59%, sendo *Klebsiella* spp. responsável por mais de um terço das mortes, enquanto *Pseudomonas* spp. apresentam maior letalidade com 51,4% dos casos (HAMMOUD et al, 2017).

As infecções fúngicas, assim como as causadas por Gram-negativos, têm se tornado prevalente em UTIN devido às condições da prematuridade dos RN que requer uso de nutrição parenteral, CVC, ventilação mecânica, intubação traqueal e uso de terapia antimicrobiana (CANTEY; MILSTONE, 2015; TZIALLA et al., 2015). Espécies de *Candida* são responsáveis pela maioria das infecções fúngicas invasivas, sendo a de corrente sanguínea, denominada Candidemia, a mais frequente, e a que apresenta maiores taxas de mortalidade (CANTEY; MILSTONE, 2015; TZIALLA et al., 2015).

As IRAS por *Candida* spp. apresentam destacada importância médica e econômica por estar associada ao aumento das taxas de morbimortalidade e, conseqüentemente, dos custos hospitalares (WARRIS et al, 2020; CHARISIZADEH et al, 2018; SILVA et al, 2015).

Em UTIN, *Candida* spp. é o quinto micro-organismo mais isolado de infecções invasivas nos Estado Unidos (HSU et al, 2020), terceiro no Kuwait (HAMMOUD et al, 2017), terceiro em países em desenvolvimento, como a Brasil e Chile, e quinto na Colômbia

(CORTÉS et al, 2020; URZEDO et al, 2014; IZQUIERDO; SANTOLAYA, 2014), sendo *C. albicans* e *C. parapsilosis* as espécies mais frequentes (MENEZES et al, 2019; SENEVIRATNE et al, 2016; URZEDO et al, 2014; IZQUIERDO; SANTOLAYA, 2014). Além disso, apresenta a segunda maior taxa de mortalidade em países como Alemanha (HARTEL, et al, 2020).

As candidíases invasivas geralmente têm origem endógena, pois pode resultar da proliferação ou alteração da microbiota humana, devido ausência ou deficiência da resposta imune adequada do hospedeiro (SABINO et al., 2015). Entretanto, sabe-se que algumas infecções por *Candida* spp. tem origem exógena, já que as leveduras podem estar presentes desde o chão do hospital até no leito do paciente, nos dispositivos médicos, nas soluções de nutrição parenteral e até mesmo na superfície dos dispositivos intravasculares. Dessa forma, a presença desse micro-organismo no ambiente hospitalar propicia inicialmente a colonização dos pacientes e, em muitos casos, o desenvolvimento da infecção naqueles indivíduos que apresentem alguma lesão na pele ou estejam em uso de dispositivo invasivo, como cateter, dreno, dentre outros (CHARSIZADEH et al., 2018; MUSKETT et al., 2011).

C. albicans é o principal patógeno responsável por micoses superficiais e invasivas em neonatos (36,4%), crianças e adolescentes (49,8%) em países europeus (WARRIS, et al, 2020), porém, espécies de *Candida* não-*albicans* como *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. krusei* podem ser responsáveis por mais da metade dos casos de candidíase invasiva ao redor do mundo (WARRIS, et al, 2020; ALVES et al, 2020; KOOSHKI et al., 2018; SILVA et al., 2015). Infecções causadas por *Candida* não-*albicans* possui uma importância clínica maior devido a sua gravidade e, em alguns casos, por geralmente mostrarem-se menos susceptíveis a ação dos azóis, antifúngicos mais empregados na terapia (RUIZ-GAITÁN et al, 2019; KOOSHKI et al., 2018; CHARSIZADEH et al., 2018; MALEK et al., 2017).

Dentre as espécies não-*albicans* destaca-se *C. auris*, identificada primeiramente no Japão, e que tem avançando pela África, Europa e América, levantando preocupação por sua alta taxa de mortalidade (58,2%) e capacidade de provocar surtos, devido sua dificuldade de identificação, alta transmissão, resistência a antifúngicos e a compostos desinfetantes (RUIZ-GAITÁN et al, 2019).

Estudos realizados em todo o mundo têm mostrado a associação das infecções adquiridas no ambiente hospitalar à prática inadequada de higienização das mãos e à reservatórios inanimados (CAMPANARO et al., 2016; SORIA et al., 2016; HERNÁNDEZ-

CASTRO et al., 2010). Estima-se que 1,7 milhões de infecções estejam associadas ao cuidado em saúde e, deste, 100.000 mortes associadas a IRAS (CAMPANARO et al., 2016).

Nesse sentido, os profissionais de saúde, na condição de colonizados por micro-organismos em decorrência das atividades no ambiente de trabalho, e muitas das espécies resistentes a algumas classes de antimicrobianos utilizadas no tratamento de infecções invasivas, passam a veicular esses agentes para pacientes e outros profissionais de saúde, como Ben Abdeljelil et al. (2011) relatou em seu trabalho, transmissão horizontal de isolados encontrados nas unhas dos profissionais de uma UTIN na Tunísia. Dessa forma os profissionais de saúde tornam-se participantes da cadeia epidemiológica das IRAS (SILVA et al., 2016).

A incorporação de métodos moleculares para a tipagem de patógenos nosocomiais tem ajudado nos esforços para obter uma avaliação mais assertiva dos micro-organismos. Estabelecer a clonalidade dos agentes patogênicos pode auxiliar na identificação da fonte (ambiental ou pessoal) e distinguir as amostras infecciosas de não infecciosas. Muitas das espécies que são principais causas de infecção adquiridas no hospital também são micro-organismos comensais e, portanto, é importante determinar se o isolado recuperado do paciente é um micro-organismo patogênico que causou a infecção ou uma contaminante comensal que provavelmente não é a fonte da infecção (BERTONE et al., 2016; BEN ABDELJELIL et al, 2011).

A resposta ao tratamento medicamentoso muitas vezes depende da correta identificação das espécies envolvidas no processo infeccioso de forma rápida e precisa (SARIGUZEL et al., 2015). Nas últimas décadas, uma grande variedade de técnicas de tipagem de amostras tornou-se disponível através do uso de ferramentas moleculares que incluem Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE), Reação em Cadeia pela Polimerase em tempo real (qPCR), Microsatélite, análise de Polimorfismo de Comprimento de Fragmento de Restrição (RFLP), Polimorfismo de DNA Amplificado Aleatoriamente (RAPD), Polimorfismo de Comprimento de Fragmento Amplificado (AFLP), Eletroforese de Enzima Multilocus (MLEE), PCR uniplex e multiplex, sequenciamento de regiões específicas, Espectrometria de Massa de Tempo de Voo com Dessorção a Laser Assistida por matriz (MALDI-TOF MS) dentre outras, cujo intuito consiste na identificação e caracterização dos patógenos (ARASTEHFAR et al., 2019; ASADZADEH et al., 2019; BARBEDO et al., 2017; ZAMBRANO et al., 2015). Os métodos genotípicos têm vantagens sobre os métodos fenotípicos, principalmente por causa da estabilidade de marcadores

genômicos, o que possibilita sua utilização para investigação das relações genéticas entre os isolados em surtos hospitalares (BARBEDO et al., 2017).

Dentre as metodologias empregadas na identificação das amostras, a técnica do RAPD-PCR, geralmente é precisa, de simples execução, rápida e econômica, quando comparada com outras técnicas consideradas padrão ouro em discriminar linhagens, como PFGE, sendo esta bastante utilizada em estudos epidemiológicos e para traçar surtos hospitalares. Porém, apresenta algumas limitações como: longo tempo necessário para obtenção dos resultados, complexidade da técnica e alto custo, o que dificulta realização de grande número de testes. Há relatos de que a técnica de RAPD-PCR apresenta maior poder discriminatório quando comparado com PFGE, e a importância de se combinar as duas ou mais técnicas pode contribuir para o entendimento da dinâmica populacional de microorganismos patogênicos e na identificação da fonte de infecção da qual depende a abordagem preventiva (BEN ABDELJELIL et al., 2011).

2 OBJETIVOS

Apesar da grande importância das infecções desencadeadas por leveduras do gênero *Candida*, há ainda poucos relatos na literatura que busquem estabelecer uma relação entre os isolados provenientes de infecções invasivas com aqueles provenientes do ambiente hospitalar. Essa escassez de trabalhos que abordem essa temática levou à proposição deste trabalho com o objetivo de analisar o perfil molecular dos isolados de *Candida* spp., provenientes de infecções invasivas em neonatos internados na UTIN do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HC-UFU), das mucosas oral e perianal desses RN com infecção fúngica confirmada e do ambiente da unidade, com intuito de avaliar se há alguma relação genética entre esses isolados e estabelecer as possíveis rotas de infecção por espécies de *Candida* na unidade.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostra de estudo

Entre julho de 2015 e maio de 2017 foram obtidos 40 isolados de *Candida* spp. provenientes de amostras clínicas de neonatos internados e do ambiente da na UTIN do HC-UFU, como demonstrado na Figura 1. Esses isolados foram estocados em caldo Brain Heart Infusion (BHI) com glicerol em freezer a -20°C no Laboratório do Curso Técnico em Análises

Clínicas da Escola Técnica de Saúde (ESTES) da Universidade Federal de Uberlândia.

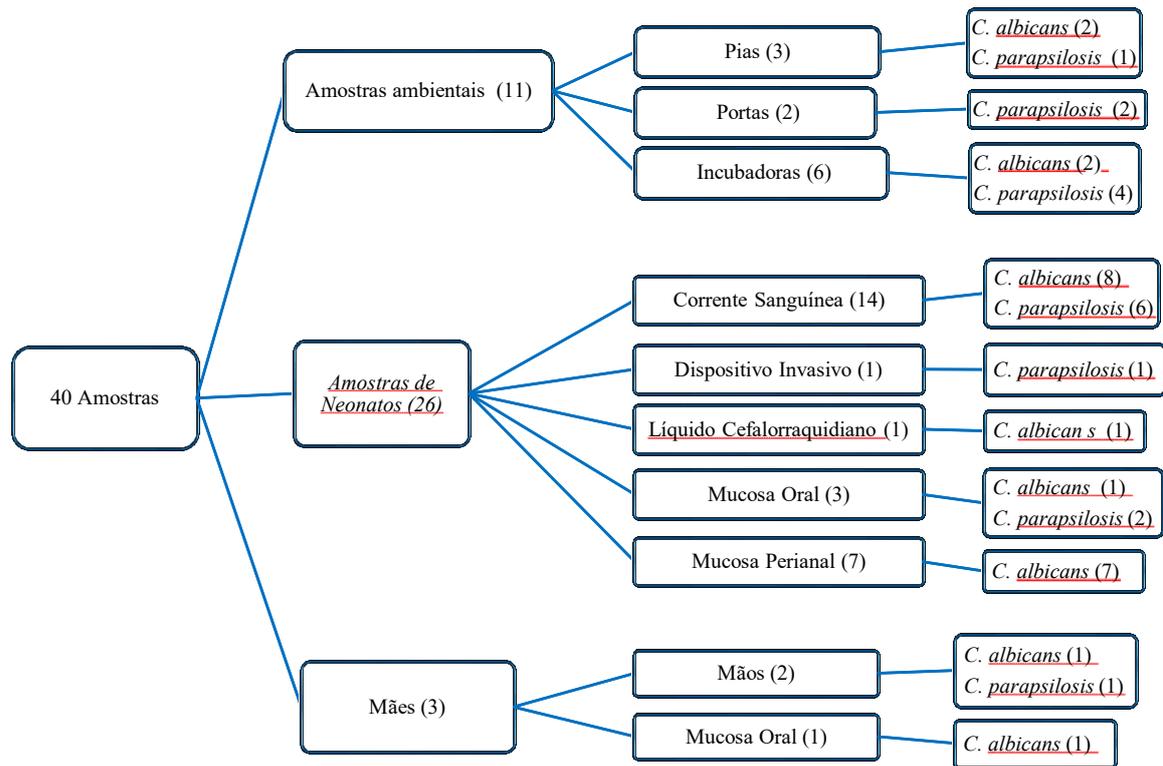


Figura 1: Fluxograma dos locais de isolamento das amostras de *Candida* spp. incluídas no estudo

3.2 Avaliação do perfil molecular pela técnica de RAPD-PCR

3.2.1 Extração do DNA

Esse procedimento foi realizado a partir de cultivo dos isolados em meio Agar Sabouraud Dextrose (ASD), incubado por 24 horas a 35°C. Após este período, as células foram coletadas através de alça bacteriológica, suspensas em 500µL de tampão de extração (2,2g de Cloreto de Sódio; 0,75g de Dodecil Sulfato de Sódio; 60 mL de Tris HCL pH 8,5 a 0,5 M; 7,5mL EDTA; 150 mL água destilada) com 0,2µL de esferas de Zircônia seguida de agitação em agitador tipo vórtex por dois minutos. A suspensão foi centrifugada em 2000rpm por cinco minutos e transferida para outro tubo tipo *ependorf* de 2 mL, sendo adicionado 500µL da mistura de Fenol-Clorofórmio, homogeneizado por 10 segundos, manualmente e seguido de centrifugação (15 minutos a 18.000g a 4°C). O sobrenadante foi coletado e tratado com isopropanol absoluto gelado e deixado no freezer a -20°C *overnight*. Após esse período, foi realizada nova centrifugação (por 10 minutos a 18.000g). O sedimento (DNA) foi lavado pela adição de etanol gelado (70%) com uma nova centrifugação por 10 minutos. Após seco à

temperatura ambiente o DNA foi ressuspensão em 50 µL de água destilada esterilizada e mantido em *overnight* a 4°C. Em seguida, foi acrescentado 10 µg/mL de RNase e incubada a 37°C por 30 minutos. Posteriormente, o DNA em solução foi estocado à temperatura de -20°C até o momento do uso. O DNA extraído foi quantificado utilizando um espectrofotômetro (BioDrop Duo, Harvard Bioscience, Holliston, United States) e a qualidade do DNA extraído foi verificada através de uma eletroforese a 90 Volts (V) por 1 hora, utilizando 5µL do DNA de cada amostra acrescido de 5 µL da solução de corrida em gel de agarose 0,8% preparado com TBE 0,5X (54g de Tris-Base; 3,72g de EDTA; 27,83g de Ácido Bórico; qsp 1000 mL de água destilada, ajustado pH a 8,5 com HCl 50%). Após a corrida eletroforética, os géis foram observados sob luz ultravioleta e as imagens capturadas empregando o sistema de fotodocumentação (L-Pix HE, Locus Brasil, Cotia, SP, Brasil) (BACELO et al. 2009).

3.2.2 Técnica Molecular

Para a análise do DNA a técnica da Reação em Cadeia da Polimerase do DNA Polimórfico Amplificado Aleatoriamente (RAPD-PCR) foi utilizada (WILLIAMS et al., 1995) com os *primers* OPA9 e OPB11 (Operon Technologies Inc.), com as seguintes sequências: OPA9: (5' GGGTAACGCC 3') e OPB11: (5' GTAGACCCGT 3'). As reações foram realizadas em volume final de 25µL contendo 1µL de DNA molde (5ng/mL); 0,25mMol de cada desoxinucleotídeos (dATP, dCTP, dTTP e dGTP) (Neotaq – NeoBio, Botucatu, SP, Brasil); 1,25U da Taq Polimerase Platinum™ (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA) com o tampão de reação apropriado, 2,5mM de MgCl₂ e 40 pmol do oligonucleotídeo iniciador. Todas as amplificações foram realizadas em termociclador (Eppendorf, Mastercycle gradiente). O ciclo inicial de amplificação foi de 4 minutos a 94°C, seguido de 40 ciclos de: 94°C por 1 minuto, 36°C por 1 minuto e 72°C por 1,5 minutos; ao final dos 40 ciclos uma extensão de 10 minutos à temperatura de 72°C.

Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2% contendo 2µL/mL do corante fluorescente EasyView (EasyPath, São Paulo, SP, Brasil). Os géis foram observados sob luz ultravioleta (L-Pix HE, Locus Brasil, Cotia, SP, Brasil) e imagens foram capturadas utilizando o sistema de fotodocumentação (Image Lab-1D Locus Brasil, Cotia, SP, Brasil). O tamanho de cada banda formada no gel RAPD-PCR eletroforese foi comparada com os padrões moleculares (100bp, Ludwig Biotec, Alvorada, RS, Brasil). O perfil de cada amostra foi analisado visualmente. As bandas foram representadas como presentes (1) ou ausentes (0). Estes dados permitiram a construção de matrizes de valores

binários que foram analisadas utilizando o conjunto de programas estatísticos Multi-variate Statistical Package (MVSP) versão 3.21 (Kovach Computing Services, UK.).

3.3 Análises dos dados

As relações genéticas (coeficientes de similaridade) foram calculadas através do coeficiente de Jaccard (S_j), que se baseia na posição dos fragmentos. S_j é calculado pela fórmula: $S_j = n_{AB} / (n_{AB} + a + b)$, onde n_{AB} representa o número de bandas compartilhadas por duas amostras, a representa o número de bandas exclusivas para a primeira amostra e b representa o número de bandas exclusivas para segunda amostra (SOLL, 2000). Um valor de S_j de 1,00 e 0,99 representa o mesmo genótipo, valores entre 0,80 e 0,99 representam amostras relacionadas clonalmente (altamente similares, mas não idênticas) e valores inferiores a 0,80 representam amostras distintas. Os dendrogramas baseados nos valores de S_j foram gerados pelo método UPGMA (Unweighted Pair-Group Method With Arithmetical Averages).

3.4 Comitê de Ética

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Uberlândia (CEP-UFU), com número de CAAE: 40921314.4.0000.5152, parecer número: 989.139.

4 RESULTADOS

Durante o período de estudo foram obtidos 40 isolados *Candida* spp., sendo 23 de *C. albicans* (57,5%) e 17 de *C. parapsilosis* (42,5%), dos quais 26 (65%) foram provenientes de amostras clínicas de 13 neonatos internados na UTIN do HC-UFU, com destaque para as candidemias (n=14; 35%), das quais 57,2% foram causadas por *C. albicans*; seguidas por colonização perianal (n=7; 17,5%) ocasionadas 100% por *C. albicans* e dos isolados ambientais (11/40; 27,5%), dos quais a espécie mais frequente foi *C. parapsilosis* (7/11; 63,6%) (Tabela 1).

Aqui, destacamos o RN6, que apresentou dois episódios de candidemia, sendo o primeiro por *C. albicans* e o segundo por *C. parapsilosis*.

Tabela 1. Distribuição das espécies de *Candida* incluídas no estudo por sítio de isolamento.

Sítio de isolamento	<i>C. albicans</i> (n=23)	<i>C. parapsilosis</i> (n=17)	Total por sítio
Corrente sanguínea	8 (34,5%)	6 (35%)	14 (35%)
LCR*	1 (4,5%)	-	1 (2,5%)
Dispositivo (dreno abdominal)	-	1 (6%)	1 (2,5%)
Mucosa perianal	7 (30,5%)	-	7 (17,5%)
Mucosa oral	1 (4,5%)	2 (12%)	3 (7,5%)
Ambiente	4 (17%)	7 (41%)	11 (27,5%)
Mães	2 (9%)	1 (6%)	3 (7,5%)
Total de isolados	23 (100%)	17 (100%)	40 (100%)

Nota: *Líquido Cefalorraquidiano.

A análise molecular combinada realizada por RAPD-PCR com os *primers* OPA9/OPB11 revelou a existência de vinte e três perfis genéticos diferentes entre os isolados de *C. albicans* (Tabela 2).

Tabela 2. Caracterização genotípica dos isolados *C. albicans* provenientes da UTIN do HC-UFU entre julho de 2015 e maio de 2017

Origem amostra	Código isolado	Genótipo OPA9	Genótipo OPB11	OPA9/OPB11	Sítio de isolamento	Data da Coleta	Local de internação
Amb1	CA01	N	k	g1	Incubadora 36	03 Julho de 2015	-
RN1	CA02	O	l	g2	Corrente sanguínea RN1	14 Outubro de 2015	L39
RN1	CA03	P	m	g3	LCR RN1	19 Outubro de 2015	L39
Amb2	CA04	Q	n	g4	Incubadora 38	12 Dezembro de 2015	-
RN2	CA05	R	o	g5	Corrente sanguínea RN2	12 Janeiro de 2016	L37
RN2	CA06	R	p	g6	Mãe boca RN2	12 Janeiro de 2016	-
RN2	CA07	R	q	g7	Mucosa Perianal RN2	12 Janeiro de 2016	L37
Amb3	CA08	S	n	g8	Pia Ralo canto UTI2	12 Janeiro de 2016	-
RN3	CA09	T	r	g9	Mucosa Perianal RN3	01 Março de 2016	L34
Amb4	CA10	U	s	g10	Ralo pia 2 UTI2 TR	01 Março de 2016	-
RN3	CA11	U	t	g11	Corrente sanguínea RN3	23 Março de 2016	L35
RN3	CA12	V	t	g12	Mucosa Perianal RN3	23 Março de 2016	L32
RN4	CA13	W	u	g13	Corrente sanguínea RN4	23 Março de 2016	L32
RN4	CA14	U	u	g14	Mucosa Perianal RN4	23 Março de 2016	L32
RN5	CA15	X	v	g15	Corrente sanguínea RN5	21 Junho de 2016	L36
RN5	CA16	Y	w	g16	Mucosa Oral RN5	21 Junho de 2016	L36
RN5	CA17	Y	x	g17	Mucosa Perianal RN5	21 Junho de 2016	L36
RN5	CA18	Y	y	g18	Mão da mãe RN5	21 Junho de 2016	-
RN6	CA19	Z	z	g19	Corrente sanguínea RN6	01 Julho de 2016	L36
RN7	CA20	Y	aa	g20	Corrente sanguínea RN7	02 Fevereiro de 2017	L32
RN7	CA21	AA	ab	g21	Mucosa Perianal RN7	02 Fevereiro de 2017	L32
RN8	CA22	AB	t	g22	Corrente sanguínea RN8	15 Maio de 2017	L35
RN8	CA23	AA	t	g23	Mucosa Perianal RN8	15 Maio de 2017	L35

Nota: Amb: Amostras do ambiente; CA: *C. albicans*; L: Leito=incubadora; RN: recém-nascido; Letras N – AB: denominação dos genótipos observados após análise combinada testes com *primer* OPA09, Letras k – ab: análise com *primer* OPB11; Números: g1 – g23: genótipos observados após análise combinada de resultados de RAPD-PCR com os *primers* OPA09 e OPB11.

Os três isolados relacionados ao RN2 (CA5, CA6 e CA7) apresentaram perfil genético altamente similar entre si, formando o cluster A1 e o isolado CA6 e CA7 formaram o cluster interno A por estarem mais intimamente relacionado ($SJ \geq 0,90$). Da mesma forma, dois isolados clínicos (CA11 e CA14) provenientes de dois neonatos distintos, RN3 e RN4 respectivamente, apresentaram alta similaridade, formando o cluster B. Por fim, a análise

molecular revelou que os isolados CA16 e CA17, provenientes das mucosas oral e perianal do RN6 foram altamente similares, formando o cluster C (Figura 2 e 3).

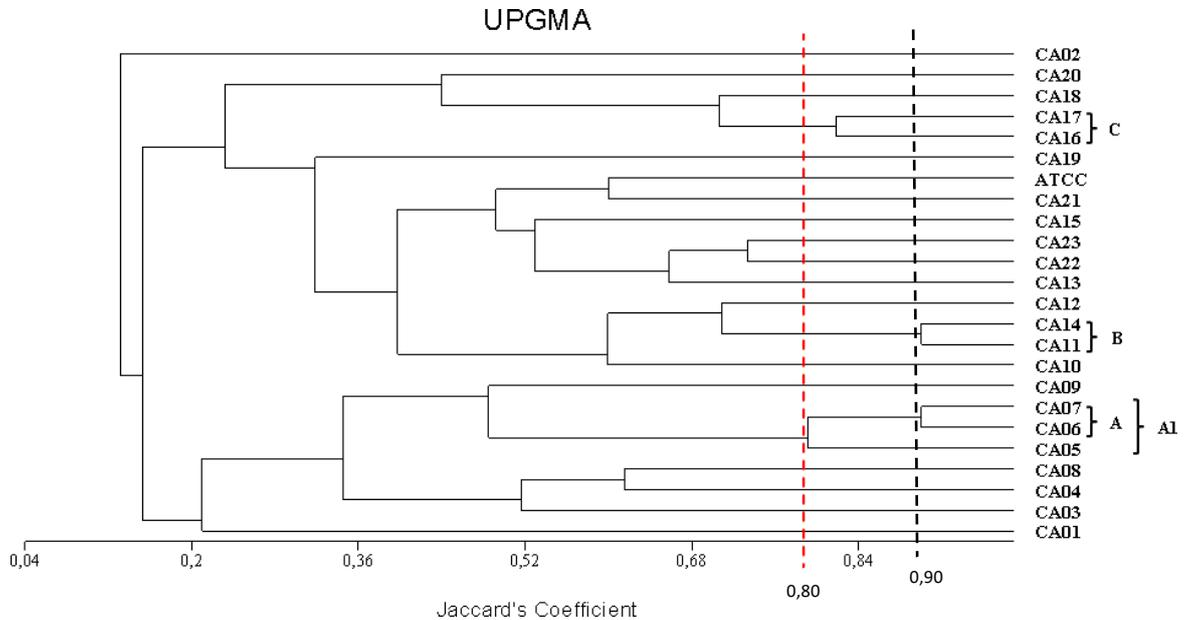


Figura 2: Dendrograma obtido com a análise realizada com os *primers* OPA09 e OPB11 com os isolados de *C. albicans* incluídos no estudo.

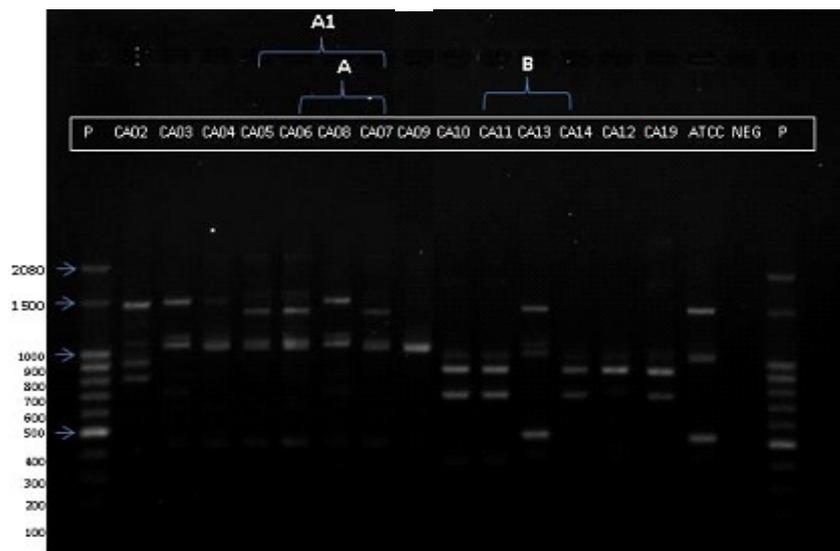


Figura 3: Variação genética em isolados de *C. albicans* determinada por análise RAPD-PCR usando *primer* OPA09. Coluna P: peso molecular padrão 100 pb; coluna NEG: controle negativo; ATCC: estirpe 90028; outras colunas: amostras clínicas ou ambientais; A, A1 e B são os *clusters* formados, representação demonstrando similaridade genética entre os isolados.

A identificação, os locais de isolamento e a análise molecular combinada realizada pelos *primers* OPA9 e OPB11 revelou a existência de quatorze perfis genéticos diferentes para *C. parapsilosis* (Tabela 3).

Tabela 3. Caracterização genotípica dos isolados *C. parapsilosis* provenientes da UTIN do HC-UFU entre julho de 2015 e maio de 2017

Origem amostra	Código isolado	Genótipo OPA9	Genótipo OPB11	Genótipo OPA9/OPB11	Sítio de isolamento	Data da Coleta	Local internação
RN9	CP1	A	a	I	Mucosa Oral RN9	01 Março de 2016	L34
RN9	CP2	A	a	I	Corrente sanguínea RN9	01 Março de 2016	L34
RN9	CP3	A	b	II	Mão da mãe RN9	01 Março de 2016	-
Amb5	CP4	B	c	III	Incubadora 33	01 Março de 2016	-
Amb6	CP5	B	c	III	Incubadora 35	01 Março de 2016	-
Amb7	CP6	C	d	IV	Porta de entrada funcionários UTIN	01 Março de 2016	-
Amb8	CP7	D	c	V	Incubadora 35	23 Março de 2016	-
Amb9	CP8	E	c	VI	Porta da sala de higienização mãos	23 Março de 2016	-
RN10	CP9	F	e	VII	Corrente sanguínea RN10	17 Julho de 2016	L39
RN10	CP10	G	f	VIII	Dispositivo invasivo (dreno) RN10	17 Julho de 2016	L39
RN6	CP11	H	g	IX	Corrente sanguínea RN6	20 Julho de 2016	L32
RN11	CP12	I	h	X	Corrente sanguínea RN11	30 Janeiro de 2017	L35
Amb10	CP13	J	i	XI	Incubadora 35	30 Janeiro de 2017	-
Amb11	CP14	K	c	XII	Pia de higienização das mãos	30 Janeiro de 2017	-
RN12	CP15	L	c	XIII	Corrente sanguínea RN12	24 Março de 2017	L32
RN12	CP16	L	c	XIII	Mucosa oral RN12	24 Março de 2017	L32
RN13	CP17	M	j	XIV	Corrente sanguínea RN13	04 Abril de 2017	L41

Nota: Amb: Amostras do ambiente; CP: *C. parapsilosis*; L: Leito=incubadora; RN: recém-nascido; Letras A – M: denominação dos genótipos observados após análise com *primer* OPA09, Letras a – j: análise com *primer* OPB11; Números I-XIV: genótipos observados após análise combinada de resultados de RAPD-PCR com os *primers* OPA09 e OPB11.

Os dois isolados provenientes do RN9 (CP1 e CP2) apresentaram perfil genético idêntico, representado pelo genótipo I. Da mesma forma, dois isolados ambientais, CP4 e CP5, ambos obtidos na mesma coleta, porém de leitos distintos, mostraram perfis idênticos por apresentarem o mesmo genótipo III. Por fim, a análise molecular revelou que os isolados CP15 e CP16, provenientes da isolados clínicos do RN5, respectivamente, são idênticos – genótipo XIII. Os isolados ambientais (CP6; CP8 e CP7; CP14), que apresentaram alta similaridade, foram identificados pela formação de dois *clusters* (X e Y) respectivamente, e o *cluster* (Z) foi formado por dois isolados (CP9 e CP10) provenientes de amostras clínicas (corrente sanguínea e dispositivo invasivo) do RN10 (Figura 4).

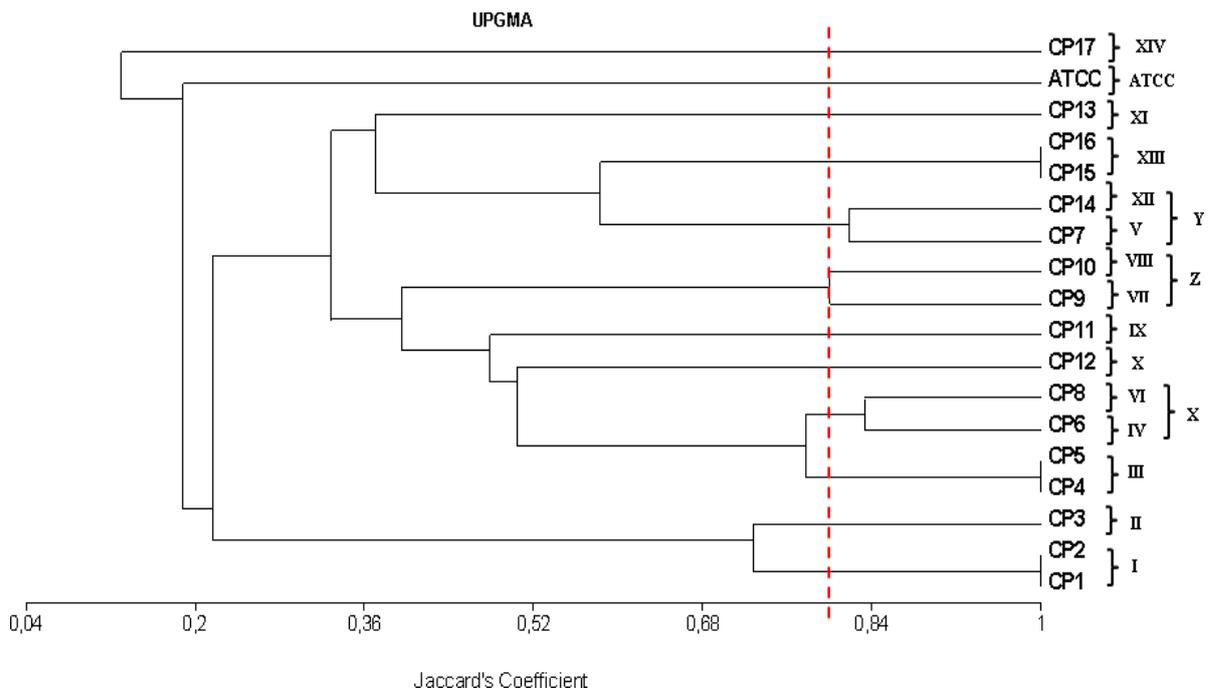


Figura 4: Dendrograma obtido com a análise realizada com os *primers* OPA09 e OPB11 com os isolados de *C. parapsilosis* incluídos no estudo.

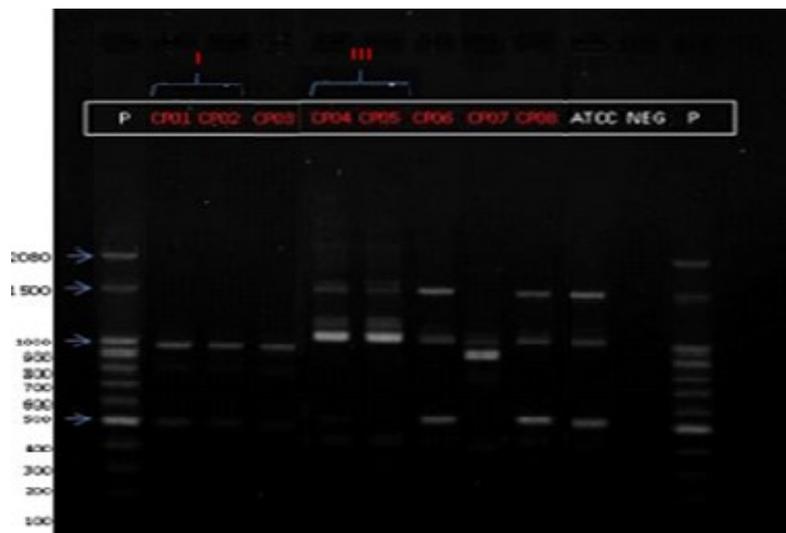


Figura 5: Variação genética em isolados de *C. parapsilosis* determinada por análise RAPD-PCR usando *primer* OPA09. Coluna P: peso molecular padrão 100 pb; coluna NEG: controle negativo; ATCC: estirpe 90028; outras colunas: amostras clínicas e ambientais; I e III *clusters* formados, representação demonstrando similaridade genética entre os isolados.

A análise molecular demonstrou uma alta similaridade entre os isolados (CP6 e CP8), provenientes da porta de acesso a UTIN e da porta da sala de higienização das mãos, respectivamente. São locais distintos, porém próximos e coletados em período distintos (intervalo de 22 dias), conforme demonstrados na Figura 6.

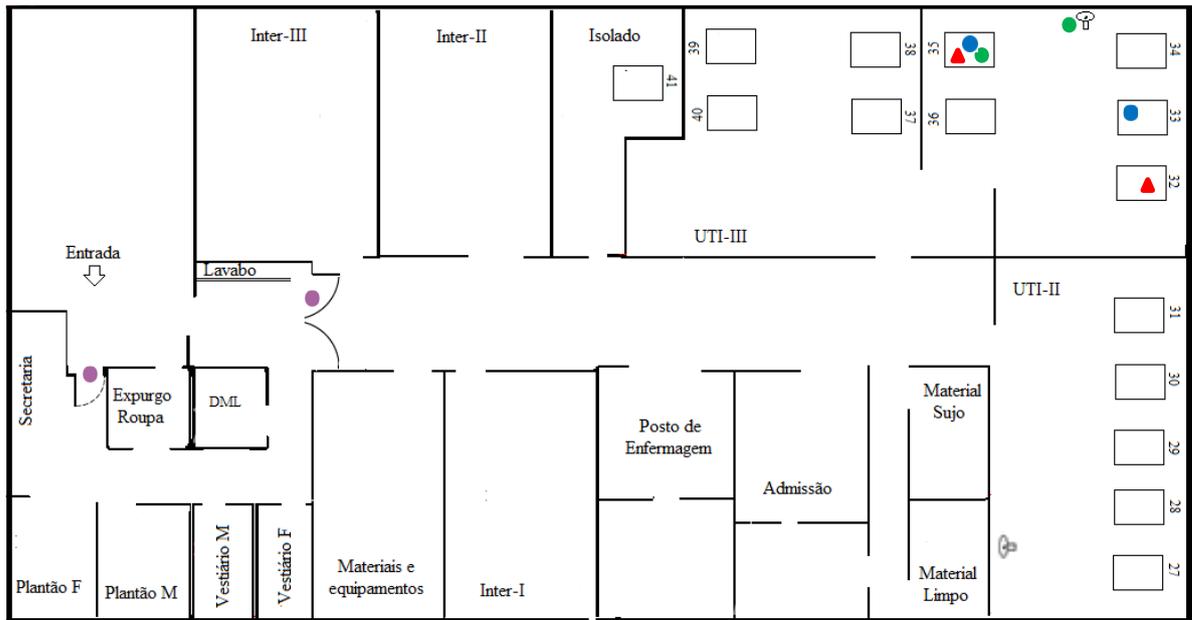


Figura 6: Representação esquemática da UTIN do HC-UFU e local da coleta dos isolados que apresentaram similaridade entre si. Os retângulos enumerados na parte superior representam as incubadoras e os seus respectivos leitos. Os círculos representam os isolados de *C. parapsilosis* do ambiente e os triângulos os isolados de *C. albicans* clínicos. Os círculos azuis representam os isolados (CP4 e CP5), os verdes representam os isolados (CP7 e CP14) e os roxos representam os isolados (CP6 e CP8). Os triângulos vermelhos representam isolados (CA11 e CA14).

5 DISCUSSÃO

As Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde, causadas por *Candida* spp., são um problema de saúde pública devido a sua gravidade e por apresentarem elevadas taxas de morbimortalidade (KELLY; BENJAMIN; SMITH, 2015). A incidência e as espécies podem variar entre regiões geográficas, hospitais e até mesmo entre unidades de um mesmo hospital e é afetada por atores como diferenças nas práticas de saúde e nos perfis dos pacientes. Mesmo o tamanho do hospital estudado, os antifúngicos disponíveis, o modo e o tempo demandado para o diagnóstico podem influenciar nas taxas de incidência de candidemia. (CANELA et al, 2018).

Durante o período de estudo foi observado 14 casos de candidemia, sendo oito por *C. albicans* (57,1%) e seis *C. parapsilosis* (42,9%), que corresponde 4,8% do total de infecções no período. Esse resultado foi menor em comparação com estudos anteriores realizados na unidade que apresentaram taxas de 7,3% e 6,7% (URZEDO et al., 2014; MENEZES et al., 2020). A porcentagem de candidemia ocasionada por *C. albicans* em UTIN chega a 60,1% em alguns países, resultados que estão em consonância com distribuição da espécie do nosso estudo (WARRIS et al., 2020). Porém, a frequência de candidemias por *C. parapsilosis* segue

mais alta quando comparada com países da Europa (27,7%) (WARRIS et al., 2020) e Irã (24.4%) (CHARSIZADEH et al., 2018).

Saber se pacientes críticos, como neonatos, estão colonizados por micro-organismos patogênicos é de extrema importância para o entendimento de infecções invasivas, especialmente as candidemias, já que a maioria dessas infecções tem origem endógena e são precedidas de colonização, especialmente do Trato Gastrointestinal (SABINO et al., 2015). Neste estudo, podemos inferir que a colonização de mucosas foi um fator importante para ocorrência de infecções, devido à alta similaridade genética encontrada entre alguns isolados. A colonização é um marcador forte e confiável para potencial candidíase invasiva, portanto, o monitoramento próximo e a detecção precoce de colonização por *Candida* spp. em pacientes críticos e internados em UTI torna-se crucial (CHARSIZADEH, et al., 2018).

A análise molecular de *C. albicans* demonstrou elevada similaridade genética entre isolados clínicos (CA11 e CA14), de neonatos distintos (RN3 e RN4) que estavam em leitos diferentes (L33 e L35), porém próximos. Essa semelhança sugere que esses isolados podem pertencer a um mesmo reservatório e que podem estar sendo levados através das mãos dos profissionais da saúde. Esses resultados chamam a atenção para importância da conscientização dos profissionais de saúde para a correta higienização das mãos, bem como da higienização do ambiente hospitalar, a fim de evitar a disseminação de micro-organismos patogênicos para pacientes críticos, como os neonatos. Tais medidas evitam a transmissão horizontal de micro-organismos presentes no ambiente hospitalar (CAMPANARO et al., 2016).

Elevada similaridade genética também foi observada entre dois isolados (CA16 e CA17) de mucosas, ambos de um mesmo neonato (RN5) porém de sítios diferentes, sugerindo colonização do trato gastrointestinal por *C. albicans*. Estes resultados estão em consonância com a literatura, que relatam que grande parte das candidemias tem origem endógena e que são precedidas por colonização do Trato Gastrointestinal, de mucosas ou da pele (SABINO et al., 2015; SAMPAIO et al., 2003).

Situação semelhante também foi observada entre os isolados de hemocultura (CA05) e mucosa perianal (CA07) provenientes do RN2, sugerindo infecção de origem endógena. Além disso, verificou-se que o isolado obtido da boca da mãe do RN2 (CA06) apresentou uma similaridade ainda maior ($S_j=0,90$) com o isolado da mucosa perianal do neonato. Isso sugere que possa ter ocorrido transmissão horizontal do isolado, pois na UTIN do HC-UFU as mães participam dos cuidados e tem contato constante com o neonato. Essa condição, apesar de

ser comprovadamente importante para o desenvolvimento do neonato, pode potencializar transmissão de micro-organismos patogênicos e demonstra ser importante no entendimento da rota de aquisição de *Candida* spp. (ABDALLAH et al, 2015).

Para confirmar essa similaridade, é necessário a realização de estudos mais robustos com a aplicação de técnicas moleculares mais sensíveis, como o sequenciamento genético. Porém, nossos achados apontam para necessidade de campanhas de conscientização para pais de recém-nascidos internados na UTIN sobre a importância da higienização das mãos antes e após o contato com o neonato, a fim de diminuir as chances de transmissão de patógenos (MENEZES et al., 2020).

A análise molecular de *C. parapsilosis* revelou genótipos idênticos (I e III) entre isolados (CP1; CP2) e (CP15; CP16), ambos de corrente sanguínea e mucosa oral de neonatos distintos, RN9 e RN12 respectivamente, sugerindo também infecção de origem endógena. Sabe-se que a maioria dos casos de candidíases invasivas é precedida por colonização principalmente da pele e mucosas (KOOSHKI et al., 2018; SABINO et al., 2015).

Observou-se também uma alta similaridade entre os isolados (CP9 e CP10) de corrente sanguínea e dreno abdominal do RN10, sugerindo que o neonato possa ter sido colonizado durante a inserção do dreno abdominal, e que possa ter ocorrido uma translocação intestinal do micro-organismo. Mesmo que nem sempre seja possível identificar fonte ou via de transmissão (RUIZ et al. 2013), a data das coletas e os sítios nos ajudar a fazer as inferências.

Isolados ambientais (CP4 e CP5) apresentaram o mesmo genótipo III, ambos de leitos distintos (L33 e L35), indicando que o ambiente pode estar atuando como reservatório de *C. parapsilosis* na UTIN em estudo. Essa hipótese se reforça pelos resultados de alta similaridade encontrados nas análises dos isolados da porta de acesso a UTIN (CP06) e da porta da sala de higienização das mãos (CP08), com 22 dias intervalo entre as coletas. Essa semelhança também foi encontrada entre isolados da incubadora 35 (CP7) e de uma pia de higienização das mãos (CP14), obtidos num intervalo de tempo grande. Esses achados estão de acordo com aqueles encontrados por Rodero et al. (2000), que também sugeriram o ambiente hospitalar como um reservatório de *C. parapsilosis*.

Para confirmar se esses isolados obtidos em épocas diferentes são realmente os mesmos, são necessárias análises com um maior número de *primers* ou a utilização de técnicas moleculares mais sofisticadas e dispendiosas, como PFGE, ou ainda a associação de análises fenotípicas e genotípicas como Sequenciamento de regiões específicas ou do DNA completo (ANDRADE et al., 2014).

6 CONCLUSÃO

Este estudo mostrou que os isolados clínicos de *C. albicans* apresentaram alta similaridade, especialmente entre aqueles provenientes do mesmo neonato, sugerindo colonização prévia e infecção de origem endógena. Esses achados evidenciam a importância dos cuidados com neonatos prematuros extremos, que quando colonizados previamente, possuem altas chances da ocorrência de translocação.

Já em relação a *C. parapsilosis* verificou-se que os isolados com maior similaridade foram aqueles provenientes do ambiente da UTIN, indicando que esse atue como reservatório de micro-organismos importantes com potencial de disseminação pelo ambiente. Esses achados reforçam a necessidade de higienização rigorosa do ambiente hospitalar e das mãos dos profissionais de saúde para evitar a permanência e disseminação desses micro-organismos, especialmente em unidades críticas como as UTIN.

Assim, nossos achados reforçam a importância do conhecimento das rotas de transmissão em unidades hospitalares a fim de detectar possíveis reservatórios e fatores de risco para infecção, bem como estabelecer medidas de prevenção como a desinfecção adequada do ambiente e higienização das mãos dos profissionais da saúde, e conscientizá-los que eles são participantes da cadeia epidemiológica das infecções relacionadas à assistência à saúde.

Nosso estudo apresenta limitações, pois foi um estudo unicêntrico que incluiu poucas amostras. No entanto, este estudo forneceu resultados importantes sobre a similaridade genética dos isolados de *Candida* spp., o que permitiu demonstrar a ocorrência de infecções precedidas de colonização (via endógena) e possível carregamento de isolados no ambiente na UTIN em estudo. Estudos envolvendo técnicas moleculares mais sofisticadas devem ser feitos para comprovar a semelhança entre os isolados demonstrados aqui.

REFERÊNCIAS

- ABDALLAH, Y. et al. Prevalence and immediate outcome of candida colonized preterm neonates admitted to Special Care Unit of Mulago Hospital, Kampala Uganda. **African health sciences**, v. 15, n. 1, p. 197-205, 2015.
- ALVES, P. G. V. et al. Risk factors associated with mortality among patients who had candidemia in a university hospital. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 53, 2020.
- ANDRADE, L. N. et al. Expansion and evolution of a virulent, extensively drug-resistant (polymyxin B-resistant), QnrS1-, CTX-M-2-, and KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* ST11 international high-risk clone. **Journal of clinical microbiology**, v. 52, n. 7, p. 2530-2535, 2014.
- ARASTEHFAR, A. et al. Molecular characterization and antifungal susceptibility testing of *Candida nivariensis* from blood samples—an Iranian multicentre study and a review of the literature. **Journal of Medical Microbiology**, v. 68, n. 5, p. 770-777, 2019.
- ASADZADEH, M. et al. High-resolution fingerprinting of *Candida parapsilosis* isolates suggests persistence and transmission of infections among neonatal intensive care unit patients in Kuwait. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1340, 2019.
- BACELO, K. L.; COSTA, K. R. C.; FERREIRA, J. C.; CANDIDO, R. C. Biotype stability of *Candida albicans* isolates after culture storage determined by randomly amplified polymorphic DNA and phenotypical methods. **Micoses**, v. 53, n. 6, p. 468-474, 2009.
- BARBEDO, L. S. et al. Comparison of four molecular approaches to identify *Candida parapsilosis* complex species. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 112, n. 3, p. 214-219, 2017.
- BEN ABDELJELIL, J. et al. Molecular typing of *Candida albicans* isolates from patients and health care workers in a neonatal intensive care unit. **Journal of applied microbiology**, v. 111, n. 5, p. 1235-1249, 2011.
- BERARDI, A. et al. Epidemiology and complications of late-onset sepsis: an Italian area-based study. **PloS one**, v. 14, n. 11, p. e0225407, 2019.
- BERTONE, A. M. et al. Genetic-relatedness of peri-implants and buccal *Candida albicans* isolates determined by RAPD-PCR. **Acta Odontológica Latinoamericana**, v. 29, n. 3, p. 197-205, 2016.
- BOO, N. Y.; CHEAH, I. G. Factors associated with inter institutional variations in sepsis rates of very-low-birth-weight infants in 34 Malaysian neonatal intensive care units. **Singapore Med J**, Singapura, v. 57, n. 3, p. 144-152, Mar 2016
- CAMACHO-GONZALEZ, A.; SPEARMAN, P. W.; STOLL, B. J. Neonatal infectious diseases: evaluation of neonatal sepsis. **Pediatric Clinics of North America**, v. 60, n. 2, p. 367, 2013.
- CAMPANARO, M. P. et al. Higiene das mãos no controle de infecções hospitalares em uma Unidade de Terapia Intensiva. In: **Salão do conhecimento; Ciência alimentando o Brasil**, UNIJIÚ, 2016.

- CANELA H. M. S. et al. Prevalence, virulence factors and antifungal susceptibility of *Candida* spp. isolated from bloodstream infections in a tertiary care hospital in Brazil. **Mycoses**, v. 61, n. 1, p. 11–21, 2018.
- CANTEY, J. B.; MILSTONE, A. M. Bloodstream infections: epidemiology and resistance. **Clinic Perinatology**, v. 42, n. 1, p. 1-16, 2015.
- CHARSIZADEH, A. et al. Microbial epidemiology of candidemia in neonatal and paediatric intensive care units at the Children’s Medical Center, Tehran. **Mycoses**, v. 61, p.22-29, 2018.
- CORTÉS, J. A. et al. Candidemia en Colombia. **Biomédica**, v. 40, n. 1, p. 195-207, 2020.
- DAHAN M, O’DONNELL S, HEBERT J, et al. CLABSI risk factors in the NICU: potential for prevention: a PICNIC study. **Infect Control Hosp Epidemiol**. 2016;37:1446–52.
- GARCÍA, H. et al. Risk factors for central line-associated bloodstream infection in critically ill neonates. **The Indian Journal of Pediatrics**, v. 86, n. 4, p. 340-346, 2019.
- GARZILLO, C. et al. Risk factors for *Candida parapsilosis* bloodstream infection in a neonatal intensive care unit: a case-control study. **Italian journal of pediatrics**, v. 43, n. 1, p. 10, 2017.
- HAMMOUD, M S. et al. Late-onset neonatal sepsis in Arab states in the Gulf region: two-year prospective study. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 55, p. 125-130, 2017.
- HÄRTEL, C. et al. Sepsis related mortality of extremely low gestational age newborns after the introduction of colonization screening for multi-drug resistant organisms. **Antimicrobial Resistance & Infection Control**, v. 9, n. 1, p. 1-9, 2020.
- HERNÁNDEZ-CASTRO, R. et al. Outbreak of *Candida parapsilosis* in a neonatal intensive care unit: a health care workers source. **Eur J Pediatr**, v. 169, n. 7, p. 783-787, 2010.
- HSU HE, MATHEW R, WANG R, et al. Health Care-Associated Infections Among Critically Ill Children in the US, 2013-2018. **Jama Pediatr**. Publicado online em 05 de outubro de 2020. doi:10.1001/jamapediatrics.2020.3223
- IZQUIERDO, G.; SANTOLAYA, M. E. Candidiasis invasoras en recién nacidos: diagnóstico, tratamiento y prevención. **Rev Chil Infect**, v. 31, n. 2, p. 73-83, 2014.
- KELLY, M. S.; BENJAMIN, D. K.; SMITH, P. B. The epidemiology and diagnosis of invasive candidiasis among premature infants. **Clinics in perinatology**, v. 42, n. 1, p. 105-117, 2015.
- KOOSHKI, P.; REZAEI-MATEHKOLAEI, A.; MAHMOUDABADI, A.Z. The patterns of colonization and antifungal susceptibility of *Candida*, isolated from preterm neonates in Khorramabad, South West of Iran. **J Mycol Med**, v. 28, n. 2, p. 340-344, 2018.
- MAŁEK, M.; PALUCHOWSKA, P.; BOGUSZ, B.; Budak, A. Molecular characterization of *Candida* isolates from intensive care unit patients, Krakow, Poland. **Rev Iberoam Micol**, v. 34, n.1, p.10-16, 2017.
- MENEZES, R. P. et al. Frequency of *Candida* spp. in a tertiary care hospital in Triangulo Mineiro, Minas Gerais State, Brazil. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 57, p. 185-191, 2015.

- MENEZES, R.P. et al. Characterization of *Candida* species isolated from the hands of the healthcare workers in the neonatal intensive care unit. *Medical mycology*, v. 57, n. 5, p. 588-594, 2019.
- MENEZES, R. P. et al. Candidemia by *Candida parapsilosis* in a neonatal intensive care unit: human and environmental reservoirs, virulence factors, and antifungal susceptibility. **Brazilian Journal of Microbiology**, p. 1-10, 2020.
- MUSKETT, H.; SHAHIN, J.; EYRES, G.; HARVEY, S.; ROWAN, K.; HARRISON, D. Risk factors for invasive fungal disease in critically ill adult patients: a systematic review. **Crit Care**, v. 15, n. 6, p. R287, 2011.
- RODERO, L. et al. Nosocomial transmission of *Candida albicans* in newborn infants. **Revista Argentina de microbiologia**, v. 32, n. 4, p. 179-184, 2000.
- ROSADO V, CAMARGOS PAM, ANCHIETA LM, et al. Risk factors for central venous catheter-related infections in a neonatal population - systematic review. **J Pediatr**. 2018; 94:3–14.
- RUIZ-GAITÁN, A. et al. Detection and treatment of *Candida auris* in an outbreak situation: risk factors for developing colonization and candidemia by this new species in critically ill patients. **Expert review of anti-infective therapy**, v. 17, n. 4, p. 295-305, 2019.
- RUIZ, L. S. et al. Outbreak of fungemia caused by *Candida parapsilosis* in a neonatal intensive care unit: molecular investigation through microsatellite analysis. *Revista Iberoamericana de Micología*, v. 30, n. 2, p. 112-115, 2013.
- SABINO, R. et al. Analysis of clinical and environmental *Candida parapsilosis* isolates by microsatellite genotyping—a tool for hospital infection surveillance. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 21, n. 10, p. 954. e1-954. e8, 2015.
- SAMPAIO, P. et al. Highly polymorphic microsatellite for identification of *Candida albicans* strains. **J Clin Microbiol** v. 41, n.2, p.552-557, 2003.
- SARIGUZEL, F. M. et al. Investigation of the relationship between virulence factors and genotype of *Candida* spp. isolated from blood cultures. **J Infect Dev Ctries**, v.9, n.8, p. 857-864, 2015.
- SENEVIRATNE, C. J. et al. Antifungal susceptibility in serum and virulence determinants of *candida* blood stream isolates from Hong Kong. **Front Microbiol**, v. 7 p. 216, 2016.
- SILVA, L. C. S. et al. Conhecimento e percepção dos trabalhadores de saúde sobre colonização por microrganismos multirresistentes. **Saúde & Ciência em ação**, v. 3, n. 1, p. 31-43, 2016.
- SILVA, M. G. C et al. *Candida* spp. distribution and fluconazole susceptibility of blood isolates at a regional hospital in Passo Fundo, RS, Brazil. **J Bras Patol Med Lab**, v. 51, n. 3, p. 158-161, 2015.
- SOLL, D. R. The ins and outs of DNA fingerprinting the infections fungi. **Clin Microbiol Rev**, v.13, n. 9, p. 332-370, 2000.
- SORIA, C. et al. Brote por *Serratia marcescens* en una Unidad de Cuidados Intensivos Neonatales. Guayaquil-Ecuador. **Rev Chilena Infectol**, v.33, n. 6, p. 703-705, 2016.

TZIALLA, C.; BORGHESI, A.; SERRA, G.; STRONATI, M.; CORSELLO, G. Antimicrobial therapy in neonatal intensive care unit. **Ital J Pediatr**, London, v. 41, n. 27, p. Abr 2015

URZEDO, J. E. et al. Nosocomial infections in a neonatal intensive care unit during 16 years: 1997-2012. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 47, n. 3, p. 321-326, 2014.

ZAMBRANO, L. J. M. et al. Clusters of patients with candidaemia due to genotypes of *Candida albicans* and *Candida parapsilosis*: differences in frequency between hospitals. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 21, n. 7, p. 677-683, 2015.

WARRIS, Adilia et al. Etiology and outcome of candidemia in neonates and children in Europe: an 11-year multinational retrospective study. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 39, n. 2, p. 114, 2020.

WILLIAMS, D. W.; WILSON, M. J.; LEWIS, M. A. O.; POTTS, A. J. C. Identification of *Candida* spp. by PCR and restriction fragment length polymorphism analysis of intergenic spacer regions of ribosomal DNA. **Journal of Clin Microb**, v. 33, n. 9, p. 2476-2479, 1995.

Anexo A – Parecer Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos – CEP-UFU



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Candidíase invasiva em neonatos críticos: etiologia, patogenia e perfil molecular

Pesquisador: Ralciane de Paula Menezes

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 40921314.4.0000.5152

Instituição Proponente: Faculdade de Medicina

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.949.419

Apresentação do Projeto:

Trata-se de pedido de adendo para modificar um dos objetivos da pesquisa, fazer outra análise que julgaram necessárias e alteram o cronograma. Conforme apresenta o protocolo: A hipótese apresentada pelos pesquisadores é a seguinte: "A hipótese do estudo é que os casos de infecção por *Candida* spp. podem ser desencadeados por microrganismos já presentes na microbiota do neonato, ou na microbiota da pele dos profissionais do setor, ou na microbiota da pele dos responsáveis pelos neonatos, ou ainda por microrganismos presentes no ambiente hospitalar."

Sendo assim, pedem a alteração do objetivo 10, conforme resta abaixo no item "objetivo da pesquisa" e ainda, solicitam o que se segue:

"Durante a análise dos resultados obtidos com a metodologia RAPD-PCR, observamos a necessidade de repetir o teste com alguns isolados, cujos resultados geraram dúvidas na sua interpretação. Por isso, foi preciso solicitar a compra de mais alguns reagentes necessários para execução da técnica, os quais chegaram recentemente. Desse modo, para que possamos conseguir repetir esses testes, bem como analisar os resultados cuidadosamente e escrever os relatórios e artigos com calma, solicitamos a prorrogação do prazo de entrega do relatório final do projeto para este Comitê por seis meses, passando a ser então em junho de 2019."

Além disso, solicitaram novo cronograma.

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica
 Bairro: Santa Mônica CEP: 38.408-144
 UF: MG Município: UBERLÂNDIA
 Telefone: (34)3239-4131 Fax: (34)3239-4335 E-mail: cep@propp.ufu.br



Continuação do Parecer: 2.949.419

Orçamento	ORCAMENTO_ADENDO.pdf	15:37:12	Menezes	Aceito
Outros	Termo de Compromisso Equipe Executora.doc	26/01/2015 14:07:55		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto doutorado - versão cep.docx	26/01/2015 14:06:02		Aceito
Folha de Rosto	RALCIANE.pdf	26/01/2015 14:05:22		Aceito
Outros	autorização instituição onde os experimentos serão realizados.jpg	14/11/2014 13:11:09		Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	autorização HC - coleta de dados.jpg	14/11/2014 13:10:13		Aceito
Outros	FICHA EPIDEMIOLÓGICA.doc	14/11/2014 13:08:07		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.doc	14/11/2014 13:06:58		Aceito
Outros	LINK PARA ACESSO AO CURRÍCULO LATTES DA EQUIPE	14/11/2014 13:06:27		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

UBERLANDIA, 08 de Outubro de 2018

Assinado por:
Karine Rezende de Oliveira
(Coordenador(a))

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica
Bairro: Santa Mônica CEP: 38.408-144
UF: MG Município: UBERLANDIA
Telefone: (34)3239-4131 Fax: (34)3239-4335 E-mail: cep@propp.ufu.br