
Investigação de leveduras no âmbito hospitalar por diferentes técnicas moleculares

Oliveira e Silva, R. B. de. **Investigation of the yeasts from biotic source, in colonization state and infection, and non-biotic sources in the hospitals for different molecular techniques.** Araraquara, SP, 2005. [Tese de Doutorado —Área: Biotecnologia. Instituto de Química —UNESP]. Orientadora: Profa. Dra. Maria José Soares Mendes-Giannini

As leveduras são importantes constituintes da microbiota humana, dentre estas, o gênero *Candida* é predominante. *Candida albicans* é a espécie de levedura mais incriminada em quadros de infecção hospitalar e muita atenção têm sido dada, atualmente, as espécies não-*albicans* e outros gêneros, como *Trichosporon*. O objetivo deste trabalho foi monitorar a distribuição das espécies de leveduras de fontes bióticas (orofaringe, fezes e urina) e abióticas (leito), em estado de colonização dentro de hospitais; otimizar métodos baseados na análise do DNA obtidos por simulação de fontes bióticas (sangue de voluntário saudável contaminado) e abióticas (solução fisiológica contaminada); caracterizar fenotípica e genotipicamente leveduras emergentes e indicar possíveis fontes transmissoras de agentes causadores de Infecção Hospitalar. De um total de 199 pacientes, 85,4% apresentaram colonização e leveduras foram isoladas em 57,9% dos sítios analisados. Em 67 pacientes (39,4%) mais de uma espécie foi encontrada nos sítios/espécimes analisados e em 42 (24,7%) uma única espécie de levedura (maioria representada por *C. albicans*) em dois ou três sítios. Houve predomínio de *Candida* não-*albicans* na colonização dos pacientes (53,43%), seguido de *C. albicans* (39,7%). Os gêneros *Trichosporon* spp e *Picchia* spp representaram 5,1 e 1,8% dos isolados, respectivamente. Entre as não-*albicans* foi prevalente *C. tropicalis* (30,8%), seguido de *C. glabrata* (14,7%), *C. parapsilosis* (7,7%), *C. krusei* (1,9%), *C. guilliermondii* (1,6%) e *C. lusitaniae* (0,7%). A frequência de colonização entre os sítios analisados foi de 37% para orofaringe e 32% e 31% para reto e urina, respectivamente. Nas amostras de urina foi relevante a presença de espécies não-*albicans* (64,1%) e de *Trichosporon asahii* (14%). Não foi observada colonização por *C. dubliniensis* entre os pacientes estudados. Em amostras de leito —fontes abióticas, *C. parapsilosis* foi isolada somente em duas ocasiões. Os métodos moleculares (PCR ITS, CA25SV3 e CA-INT; RFLP e RAPD) foram empregados com sucesso a partir de 70 isolados de *C. albicans* escolhidos. Genótipo A foi representado em 64,2% dos isolados de *C. albicans* e 14,3% e 21,4% classificados como genótipo B e C, respectivamente. Não houve associação entre genótipo e linhagens invasivas nem genótipo e material biológico. Os 13 isolados do Hospital B apresentaram perfil idêntico (genótipo A). A seqüência iniciadora 6 empregada na tipagem de *C. albicans* pelo método de RAPD foi adequada para determinar grupos genéticos relacionados e idênticos entre os isolados dos dois hospitais. Os isolados seqüenciais de *C. albicans* de diferentes sítios e períodos alternados de coleta dos mesmos pacientes apresentaram-se altamente relacionados pertencendo, na grande maioria, ao mesmo clone e/ou grupo. A PCR e a análise pelo método de RAPD permitiram, portanto, a concomitante identificação das espécies e análise da diversidade entre as linhagens. Não foram encontradas diferenças significativas nos padrões de similaridade genética entre as linhagens de *C. tropicalis* a partir dos três sítios analisados por RAPD com duas seqüências iniciadoras. A presença de cepas de *Trichosporon asahii*, resistentes às drogas fluconazol, itraconazol, 5-fluorocitosina e anfotericina B, foi observada e a análise por RAPD sugeriu que estes isolados foram similares nos diferentes sítios colonizados, sugerindo possível fonte cruzada de colonização. O estudo da microbiota dos pacientes mostrou que um único hospedeiro pode ser colonizado com múltiplas espécies ou múltiplos genótipos da mesma espécie no mesmo ou em diferentes sítios do corpo em amostras seqüenciais. Por outro lado, o DNA genômico de leveduras extraído em diferentes concentrações 10^6 , 10^4 e 10^2 , a partir de amostras bióticas e abióticas contaminadas com *C. parapsilosis*, por diferentes metodologias, não apresentaram diferenças quanto à sensibilidade, adotando-se, portanto a técnica mais simples com N-lauryl sarcosina 2%. Assim, neste trabalho foram apresentados resultados inéditos de diferentes métodos de identificação e tipagem em leveduras de colonização e infecção de pacientes de Unidade de Tratamento Intensivo, bem como de padronização de metodologias de extração de DNA para uso em pesquisas de fontes bióticas e abióticas.