



Encuentro  
de JÓVENES  
INVESTIGADORES

## Estudio de mecanismos de resistencia al fluconazol de *Candida parapsilosis* en América Latina

**Lovatto, Josefina**

Laboratorio de Micología y Diagnóstico Molecular (FBCB-UNL)

Director: Dr. Guillermo García-Effron

Co-directora: Dra. María Soledad Gamarra

Área: Ciencias Biológicas

Palabras claves: *Candida parapsilosis*, resistencia a azoles, mecanismos moleculares.

### INTRODUCCIÓN

Actualmente, *Candida* spp. es el cuarto agente más prevalente de sepsis a nivel mundial (Pristov & Ghannoum, 2019). Dentro del género *Candida*, *C. albicans* es el principal agente etiológico de estas infecciones. En América Latina, el sur de Europa y sur de Asia, *C. parapsilosis sensu lato* es la segunda especie más comúnmente aislada en muestras normalmente estériles (Tóth et al., 2019). *C. parapsilosis sensu lato* incluye 3 especies estrechamente relacionadas: *C. parapsilosis sensu stricto*, *Candida orthopsilosis* y *Candida metapsilosis* (García-Effron et al., 2008).

*C. parapsilosis* resulta de particular importancia, ya que es capaz de formar biopelículas en catéteres y otros dispositivos implantables (Tóth et al., 2019). También representa una amenaza para los prematuros con bajo peso y con nutrición parenteral total, ya que es responsable del 33 % de todas las candidiasis invasivas en estos pacientes (Pammi et al., 2013).

La primera opción para el tratamiento de las infecciones causadas por *Candida* spp. son las equinocandinas, seguidas por azoles y anfotericina B (AMB) (Pappas et al., 2016). Sin embargo, en las infecciones causadas por *C. parapsilosis* se opta por el tratamiento con fluconazol (FLC), dada la conocida sensibilidad disminuida natural a las equinocandinas que presenta esta especie (con valores de CIM 16 veces mayores que los de *C. albicans*) (García-Effron et al., 2008; Pappas et al., 2016). El FLC forma parte del grupo de antifúngicos con mayor número de familias o subgrupos: los azoles. Su mecanismo de acción es la inhibición de la enzima lanosterol 14- $\alpha$ -esterol desmetilasa (Tóth et al., 2019). Esta enzima, codificada por el gen *ERG11*, participa en la biosíntesis de ergosterol, que es un componente importante de la membrana celular fúngica. La inhibición competitiva de esta enzima por parte de los azoles conduce a la inhibición del crecimiento fúngico al alterar la estructura y la función de la membrana celular (García-Effron, 2021; Grossman et al., 2015).

Título del proyecto: CARACTERIZACIÓN DE LOS MECANISMOS MOLECULARES IMPLICADOS EN LOS FENOTIPOS DE RESISTENCIA INTRÍNSECAS Y SECUNDARIAS A LOS ANTIFÚNGICOS DE CANDIDA PARAPSILOSIS SENSU STRICTO, CANDIDA GUILLIERMONDII, CANDIDA AURIS y CANDIDA HAEMULONII.

Instrumento: PICT.

Año de convocatoria: 2019.

Organismo financiador: Agencia del MinCyT.

Director: Dr. Guillermo García-Effron.

A lo largo de los años la resistencia a los azoles ha aumentado en *Candida* spp, y, en particular, los mecanismos por los cuales *C. albicans* evade a estos antifúngicos están bien caracterizados. Pueden actuar de cuatro formas conocidas: (i) hiperexpresión de bombas de eflujo: principalmente bombas codificadas por los genes *CDR1*, *CDR2* y *MDR1* que transportan azoles fuera de la célula; (ii) cambios mutacionales en la enzima lanosterol 14- $\alpha$ -esterol desmetilasa, que reducen su afinidad por el FLC; (iii) hiperexpresión del gen *ERG11* que deja enzimas sin ser inhibidas por el FLC; y (iv) otras alteraciones en la ruta de los esteroides de la célula (Pristov & Ghannoum, 2019).

Las tasas de resistencia a FLC en aislados sanguíneos de *C. parapsilosis* llegan al 14 % en los EE. UU., al 7,5% en Argentina, al 6,3 % en Europa, al 5,4% en Asia y al 7% en otros países de Sudamérica. Si bien los mecanismos moleculares asociados a la resistencia en estas cepas no están totalmente dilucidados, se ha establecido que las cepas aisladas en EE.UU. y Europa son clonales y presentan una sustitución en el residuo Y132 de Erg11p (Grossman et al., 2015). Por otro lado, algunas cepas presentaron sustituciones en otros genes como lo son factores de transcripción que regulan la sobreexpresión de bombas de eflujo (Grossman et al., 2015) o del gen *ERG11* (Souza et al., 2015). Lo descrito, si bien no ha sido confirmado molecularmente, deja en claro que los mecanismos varían dependiendo de la región geográfica y que en Sudamérica y especialmente en Argentina, este fenómeno no ha sido estudiado en profundidad a pesar de la gran prevalencia de *C. parapsilosis* y de la alta tasa de resistencia a FLC que se ha reportado en nuestra región.

## OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo fue estudiar los mecanismos de resistencia al FLC en *C. parapsilosis*. En particular, las mutaciones puntuales sobre el gen *ERG11*, que producen sustituciones aminoacídicas sobre la proteína que codifica (enzima lanosterol 14- $\alpha$ -esterol desmetilasa). Se estudiaron cepas de *C. parapsilosis* resistentes a fluconazol aisladas en Argentina, Brasil, Colombia, México y Uruguay.

## METODOLOGÍAS

### Cepas

En la Tabla 1 se describen las cepas con las cuales se trabajó (utilizando el código del cepario de nuestro laboratorio para identificarlas). Para las cepas aisladas en nuestro país, se da cuenta de la provincia de la cual fueron aisladas. En el caso de las cepas extranjeras se nombra el país de origen.

Tabla 1. Cepas de trabajo. Se detalla el país o provincia donde fueron aisladas.										
<b>Cepa</b>	17*	1055	1294	1296	1297	1298	1299	1301	1305**	1307**
<b>Origen</b>	ATCC (22019)	Córdoba	Buenos Aires						Santa Fe	
<b>Cepa</b>	1437	1802	1803	1843	1886	1974	1976	1977	1978	
<b>Origen</b>	Chaco	Uruguay	Colombia	Bs. As.	México	Brasil				

\*cepa de referencia de control de calidad CLSI. \*\*cepas clínicas sensibles a FLC.

### Identificación genética de cepas para diferenciar *C. parapsilosis sensu stricto* de especies crípticas (*C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis*)

Las cepas descritas en la Tabla 1 fueron cultivadas en agar Sabouraud por 16-24 horas a 37 °C. Se realizó la extracción de ADN genómico mediante el método CTAB (Doyle, 1991). Se llevó a cabo una identificación de *C. parapsilosis sensu stricto*, *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis* mediante análisis de la presencia de sitios de corte de endonucleasas de restricción post amplificación por PCR (PCR-REA), de acuerdo a lo descrito en García-Effron et al., 2011 (Figura 1).

## Búsqueda de mutaciones puntuales en el gen *ERG11* mediante amplificación por PCR y posterior secuenciación

Una vez identificadas las cepas como *C. parapsilosis sensu stricto*, procedimos a realizar una PCR para amplificar una porción de 1096 pb. del gen *ERG11*, que como ya se ha descrito, codifica para la enzima 14- $\alpha$ -lanosterol-desmetilasa, con el objetivo de secuenciarlo en búsqueda de mutaciones puntuales. Se utilizaron los *primers* descritos en Grossman et al., 2015.

- CpErg11 F444: 5'-TAG TGG GAT CGG TGG ATC TT-3'
- CpErg11 R652: 5'-CTT TAT CTA AAT CAG CAT ACA ATT GAG-3'

## Pruebas de sensibilidad a los antifúngicos

Con el objetivo de evaluar la sensibilidad de las cepas objetivo a FLC, realizamos pruebas de sensibilidad por triplicado de acuerdo con el documento CLSI M27-cuarta edición (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2017). *C. parapsilosis* ATCC 22019 se utilizó como cepa de control de calidad.

## RESULTADOS/CONCLUSIONES

### Identificación de *C. parapsilosis sensu stricto*, *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis* basada en PCR-REA con EcoRI de un fragmento del gen *FKS1*.

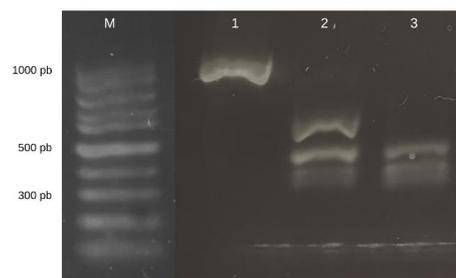
De las cepas de trabajo, todas mostraron un patrón de digestión concordante con *C. parapsilosis sensu stricto*, con excepción de la cepa 1802, que no se continuó analizando.

### Correlación entre CIMs y mutaciones en el gen *ERG11*.

Se amplificaron y secuenciaron los genes *ERG11* de las cepas de trabajo. En comparación con la secuencia de *C. parapsilosis* ATCC 22019 (WT), se identificaron 4 polimorfismos de nucleótido único (SNP) diferentes: 1- A395T (denominado SNP 1; sustitución de aminoácido, Y132F), presente en 6 de 14 aislados resistentes (R), pero en ninguno de los aislados sensibles (S). 2- A428G (SNP 2; sustitución de aminoácido, K143R), se encontró en 6 aislados R, distintos a los que poseían el SNP1. Solo 2 aislados R no presentaron ninguno de los SNPs mencionados hasta el momento. 3- C-111T (SNP 3), en la región 5' UTR de 5 aislados R y 1 S. 4- T591C, en los 14 aislados R y en uno de los aislados S (SNP 4; silente: I197I).

En la Tabla 2 se resumen los resultados de secuenciación y de CIMs. Los resultados dentro como fuera de la escala se incluyeron en el análisis (se convirtieron a la siguiente concentración hacia arriba o abajo).

De acuerdo a lo reportado por Grossman et al., 2015 y Singh et al., 2019 los SNP 1 y 2, respectivamente, resultan suficientes para atribuir resistencia a FLC. Con respecto a las cepas 1803 y 1843, podríamos atribuir la resistencia a FLC a modificaciones ajenas a *ERG11*, como sobreexpresión de bombas de salida del fármaco, por ejemplo, *CDR1*, *CDR2* y *MDR1*.



**Figura 1. Electroforesis del gen *FKS1* de 1032 pb.** Los fragmentos de PCR se digirieron con EcoRI y se resolvieron con un gel de agarosa al 0,8 %. Calle M: marcador de peso molecular de 100 pb; Calle 1: *C. parapsilosis sensu stricto* ATCC 22019; calle 2: *C. metapsilosis* ATCC 96144; calle 3: *C. orthopsilosis* ATCC 96139.

<b>Cepas</b>	17	1055	1294	1296	1297	1298	1299	1301	1305
<b>CIM (µg/mL)</b>	2,00 (S)	0,35 (S)	16,00 (R)	22,63 (R)	8,00 (R)	11,31 (R)	22,63 (R)	16,00 (R)	2,83 (S)
<b>SNP</b>	3	2 y 4	2 y 4	2 y 4	2 y 4	2 y 4	2 y 4	2 y 4	4
<b>Cepas</b>	1307	1437	1803	1843	1886	1974	1976	1977	1978
<b>CIM (µg/mL)</b>	2,83 (S)	32,00 (R)	11,31 (R)	45,25 (R)	32,00 (R)	128,00 (R)	128,00 (R)	128,00 (R)	128,00 (R)
<b>SNP</b>	-	1 y 4	4	3 y 4	1 y 4	1, 3 y 4	1, 3 y 4	1, 3 y 4	1, 3 y 4

\* media geométrica  $\geq 3$  repeticiones. CIM: Concentración inhibitoria mínima. S: sensible. R: resistente. FLC: Fluconazol. SNP: single nucleotide polymorphism. SNP 1: Y132F; SNP 2: K143R; SNP 3: C-111T; SNP 4: I197L.

## BIBLIOGRAFÍA

**Clinical and Laboratory Standards Institute.** (2017). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved Standard M27, 4th Ed.

**Doyle, J.** (1991). DNA Protocols for Plants. Molecular Techniques in Taxonomy, 283–293. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-83962-7\\_18](https://doi.org/10.1007/978-3-642-83962-7_18)

**Garcia-Effron, G.** (2021). Molecular Markers of Antifungal Resistance: Potential Uses in Routine Practice and Future Perspectives. Journal of Fungi (Basel, Switzerland), 7(3). <https://doi.org/10.3390/JOF7030197>

**Garcia-Effron, G., Canton, E., Pemán, J., Dilger, A., Romá, E., & Perlin, D. S.** (2011). Assessment of two new molecular methods for identification of *Candida parapsilosis* sensu lato species. Journal of Clinical Microbiology, 49(9), 3257–3261. <https://doi.org/10.1128/JCM.00508-11>

**Garcia-Effron, G., Katiyar, S. K., Park, S., Edlind, T. D., & Perlin, D. S.** (2008). A naturally occurring proline-to-alanine amino acid change in Fks1p in *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* accounts for reduced echinocandin susceptibility. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 52(7), 2305–2312. <https://doi.org/10.1128/AAC.00262-08>

**Grossman, N. T., Pham, C. D., Cleveland, A. A., & Lockhart, S. R.** (2015). Molecular mechanisms of fluconazole resistance in *Candida parapsilosis* isolates from a U.S. surveillance system. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 59(2), 1030–1037. <https://doi.org/10.1128/AAC.04613-14>

**Pammi, M., Holland, L., Butler, G., Gacser, A., & Bliss, J. M.** (2013). *Candida parapsilosis* is a significant neonatal pathogen: a systematic review and meta-analysis. Pediatric Infectious Disease Journal, 32(5), e206–e216. <https://doi.org/10.1097/INF.0B013E3182863A1C>

**Pappas, P. G., Kauffman, C. A., Andes, D. R., Clancy, C. J., Marr, K. A., Ostrosky-Zeichner, L., Reboli, A. C., Schuster, M. G., Vazquez, J. A., Walsh, T. J., Zaoutis, T. E., & Sobel, J. D.** (2016). Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America, 62(4), e1. <https://doi.org/10.1093/CID/CIV933>

**Pristov, K. E., & Ghannoum, M. A.** (2019). Resistance of *Candida* to azoles and echinocandins worldwide. Clinical Microbiology and Infection, 25(7), 792–798. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2019.03.028>

**Singh A, Singh PK, de Groot T, Kumar A, Mathur P, Tarai B, Sachdeva N, Upadhyaya G, Sarma S, Meis JF, Chowdhary A.** Emergence of clonal fluconazole-resistant *Candida parapsilosis* clinical isolates in a multicentre laboratory-based surveillance study in India. J Antimicrob Chemother. 2019 May 1;74(5):1260-1268. [doi: 10.1093/jac/dkz029](https://doi.org/10.1093/jac/dkz029).

**Souza, A. C. R., Fuchs, B. B., Pinhati, H. M. S., Siqueira, R. A., Hagen, F., Meis, J. F., Mylonakis, E., & Colombo, A. L.** (2015). *Candida parapsilosis* Resistance to Fluconazole: Molecular Mechanisms and In Vivo Impact in Infected *Galleria mellonella* Larvae. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 59(10), 6581–6587. <https://doi.org/10.1128/AAC.01177-15>

**Tóth, R., Nosek, J., Mora-Montes, H. M., Gabaldon, T., Bliss, J. M., Nosanchuk, J. D., Turner, S. A., Butler, G., Vágvolgyi, C., & Gácser, A.** (2019). *Candida parapsilosis*: from Genes to the Bedside. American Society for Microbiology, 32(2). <https://doi.org/10.1128/cmr.00111-18>