Candida glabrata: DETECÇÃO MOLECULAR DO PERFIL DE RESISTÊNCIA AOS AZÓLICOS

Laura Fernanda Ferri de Andrade (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Vitória Monteiro de Araújo Vilela (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Isis Regina Grenier Capoci (co-orientador), Erika Seki Kioshima (Orientador), e-mail: eskcotica@uem.br.

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

Área e sub-área do conhecimento: Farmácia / ANÁLISE TOXICOLÓGICA

Palavras-chave: Antifúngicos; Infecção nosocomial; Resistência

Resumo:

As infecções fúngicas por *Candida glabrata* tem uma grande relevância nas candidemias hospitalares, especialmente por se tratar de uma espécie menos sensível aos azólicos. Desta forma, conhecer o perfil de sensibilidade aos antifúngicos e as caracteristicas genéticas desses isolados é essencial para garantir o correto manejo desses dos pacientes acometido por esse tipo de infecção. Com o objetivo de encontrar isolados de *C. glabrata* resistentes aos antifúngicos convencionais, nosso estudo analisou 137 isolados de *C. glabrata* quanto ao seu perfil de sensibilidade ao antifúngicos e identificou oito isolados com resistentes ao fluconazol. Adicionalmente, uma análise da literatura identificou as principais mutações associadas ao perfil de resistência ao fluconazol e equinocandinas em *C. glabrata*, as quais foram utilizadas para desenhar oligonucleotideos iniciadores (*primers*) para *pdr1*, *erg11, fsk1* e *fsk2*. O gene *pdr1* apresentou 12 mutações relevantes, necessitando de 6 pares de *primers*, *erg11* onze mutações, contempladas em 2 pares de *primers*, *fsk1* e *fks2* necessitaram apenas de 1 par de *primers*. A extração do DNA genômico e amplicação dos produtos de PCR da cepa padrão de *C. glabrata* foi obtida com sucesso, abrindo novas perspectivas para implantação da técnica molecular de detecção de mutação em genes envolvidos na resistência aos antifúngicos.

Introdução

As doenças fúngicas tornaram-se uma das principais causas globais de morte, totalizando mais de 2 milhões de pessoas a cada ano, superando as vítimas da tuberculose e da malária [1]. Nos últimos anos, infecções fúngicas invasivas graves (IFIs) têm se tornado cada vez mais freqüentes em pacientes críticos em todo o mundo, especialmente infecções da corrente sanguínea (ICS) em pacientes de unidade de terapia intensiva (UTI) [2]. O gênero *Candida* spp. corresponde a 80% das etiologias de origem fúngica em hospitais, porém as espécies oscilam conforme a região geográfica e a complexidade dos serviços [3,4]. No entanto, as espécies de *Candida* não-*C. albicans* estão se tornando cada vez mais importantes,

especialmente *Candida glabrata*, que tem representado cerca de 10-35% do total de infeções por esse gênero na corrente sanguínea [5]. Este aumento tem sido associado principalmente ao amplo uso de antifúngicos [5], já que *C. glabrata* é intrinsecamente menos suscetível aos azólicos, especialmente ao fluconazol [6]. A facilidade de adquirir resistência ao fluconazol em resposta à exposição a drogas também tem sido relatada nos isolados clínicos desta espécie [7]. Adicionalmente, os isolados clínicos resistentes aos azólicos que também apresentam co-resistência as equinocandina, um fato que têm preocupado os clínicos e a comunidade científica [5]. Desta forma, identificar os mecanismo de resistência, bem como identificar as mutações envolvidas nesse processo contribuirá de maneira significativa na deteção precoce do perfil de resistência e consequentemente manejo e tratamento adequado dos pacientes acometidos por infecções por este patógeno.

Materiais e Métodos

Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores: Os genes envolvidos na resistência ao azólicos foram analisados por ferramentas *in silico* para construção de oligonucleotídeos iniciadores. Após a seleção do melhor par de *primers* estes foram avaliados pela ferramenta OligoAnalyzerTM Tool (https://bit.ly/3teXpEZ).

***Teste in vitro de suscetibilidade aos compostos selecionados*:** A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada para cada antifúngico pelo método de microdiluição em caldo, conforme as normas de padronização pelo *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2010), publicadas no documento M-27A4. O tempo de incubação foi de 48 horas a 37ºC, sendo realizada uma leitura visual em 24 horas e outra no tempo de 48 horas.

Extração do DNA: O DNA genômico das leveduras (isolado clínico proveniente da micoteca do Laboratório de Micologia médica e cepa padrão de *C. glabrata*) foram extraídos como descrito por Bonfim et al., 2013. As amplificações foram realizadas em volume final de 25 µL, usando uma mistura da Invitrogen®, 100 ng de DNA genômico e 0,4 mM dos oligonucleotídeos iniciadores desenhados. O programa selecionado foi de 35 ciclos de 1 min a 95ºC, 1 min a 47ºC e 1 min a 72ºC, e uma etapa de extensão final de 10 min a 72 ºC. As amostras amplificadas foram avaliadas em gel de agarose 0,8% em TBE.

Resultados e Discussão

C. glabrata está filogenicamente mais próxima da levedura não patogênica *Saccharomyces cerevisiae* do que das espécies de *Candida* de relevância clinica [8]. A patogênese desta levedura tem sido atribuída à sua capacidade de escapar do sistema e adaptar-se às mudanças ambientais e ao estresse [8]. Entre os mecanismos de resistência ao azólico, as bombas de efluxo são particularmente importantes. Várias mutações de ganho de função (GOF) no gene *Cg*PDR1, também foram identificadas em isolados de *C. glabrata* resistentes a azólicos [9,10]. Em

contraste, a resistência às equinocandinas é predominantemente devida a mutações nas regiões de *hot spots* conservados nos genes FKS (FKS1 e FKS2) [8,10].

Assim, com base na revisão da literatura foram selecionadas as mutações mais relevantes segundo critérios fenotípicos de resistência ao fluconazol e micafungina, juntamente com um quadro de mau prognóstico ao paciente portador de isolados resistentes. Desta maneira, foram desenhados onigonucleotídeos iniciadores para as mutações no gene ERG11 (Tabela 1), referentes às mutações relacionadas à resistência aos azólicos, já para as mutações sobre resistência à micafungina, foram desenhados onigonucleotídeos iniciadores para alterações nos genes FKS1 e FKS2 (Tabela 2 e 3).

Tabela 1. Olinonucleotídeos iniciadores do gene ERG11

ERG11											
Primer			Tamanho primer (pb)	Tamanho amplicon (pb)	Temp. anelamento (°C)	Temp. melting (°C)	%CG	Self dimers (kcal/mol)	Hetero dimers (kcal/mol)	>temp. Hairpin (°C)	Mutação
1	F	AGTGTCTATTATGGTCGCCTTG	22	86	54,4	62	45,5	-3,61	-5,5	17,5	Y50C
	R	CAAGTGGTGGTCTGTCCTTT	20		54,9	62	50	-3,54	-5,5	35,6	
2	F	CCAGTGTTCGGTAAAGGTGTTA	22	240	54,7	62	45,5	-3,61	-3,52	12,4	Y141H, D196N
	R	GGATCTGGAAGCAGTGAAGATAG	23		54,8	62	47,8	-4,65	-3,52	38,4	
3	F	TCTTGAACAACGATACCAAGGA	22	381	53,8	62	40,9	-5,5	-3,61	34,3	N368T, L381M, N425I, H430P, M451I, K456R, G457C, V458F
	R	CACCGATACATCTGTGTCTACC	22		54,6	62	50	-3,61	-3,61	33,3	

Tabela 3. Olinonucleotídeos iniciadores do gene FKS1

FKS1											
Primer			Tamanho primer (pb)	Tamanho amplicon (pb)	Temp. anelamento (°C)	Temp. melting (°C)	%CG	Self dimers (kcal/mol)	Hetero dimers (kcal/mol)	>temp. Hairpin (°C)	Mutação
1	F	TGCTGCTAAGTACGCTGAATC	21	165	62	55	47,6	-3,65	-7,65	23,9	S629P
	R	TCGGTAGCAATCATCAAACCC	21		62	55,1	47,6	-4,41	-7,65	25,4	

Tabela 4. Olinonucleotídeos iniciadores do gene FKS2

FKS2											
Primer			Tamanho primer (pb)	Tamanho amplicon (pb)	Temp. anelamento (°C)	Temp. melting (°C)	%CG	Self dimers (kcal/mol)	Hetero dimers (kcal/mol)	>temp. Hairpin (°C)	Mutação
1	F	TGTTGCTTCTCAGACTTTCACC	22	220	62	55,2	45,5	-3,17	-6,83	19,8	E655K, F659, S663P
	R	GGTTCAAAGTTATGTAGACATCAATCG	27		62	54,2	37	-4,77	-6,83	32,8	

O perfil de susceptibilidade dos isolados de *C. glabrata* aos azolicos, especialmente fluconazol, foi avaliado através da determinação dos valores MIC e dos 137 isolados de *C. glabrata*, oito apresentaram valores de MIC > 32, sendo considerado resistentes ao fluconazol. Desta forma, estes isolados resistentes foram selecionados para extração do DNA e a amplificação dos genes de resistência *erg11, fsk1 e fks2* foram realizadas com sucesso a partir dos oligonucleotídeos iniciadores desenhados neste

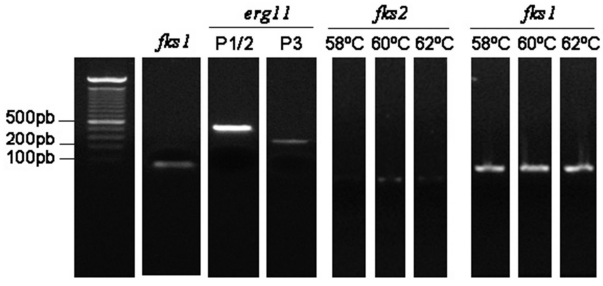

Figura 1 – Análise dos produtos de PCR gerados a partir dos oligonucleotídeos desenhados para os genes *fks1, fks2* e *erg11*. P1/2 – amplificação a partir dos oligonucleotídeos *Foward* 1 e *Reverse* 2 do gene *erg11. P3* – amplificação obtida com os oligonucleotídeos Forward e Reverse 3 do gene erg11 de *Candida glabrata*

O conhecimento do perfil de resistência aos antimicrobianos podem contribuir não apenas como guia para o médico na escolha da terapia apropriada, mas também assumem papel fundamental em termos epidemiológicos. No entanto, existem um grande descompasso entre antibacterianos e antifúngicos especialmente, quanto as classes disponíveis, bem como a correlação dos resultados dos testes de suscetibilidade com a prática clínica. Desta forma, a Micologia Médica vem se desenvolvendo como um campo do saber que exige a atenção de todos, é preciso aprimorar estratégias de manejo, uma vez que é crescente o número de pacientes imunocomprometidos vulneráveis as infecções fúngicas oportunistas.

Conclusões

Destacamos a importância clínica da *C. glabrata* e a necessidade de estratégias inovadoras para o manejo da infecção causada por esse patógeno. Assim neste trabalho, isolados com perfil de resistência foram identificados e genes envolvidos na resistência aos antifúngicos foram selecionados para o desenho de *primers* que poderão contribuir na padronização de ferramentas moleculares para detecção precoce da resistência aos antifúngicos, que poderá contribuir com o rápido manejo dos paciente e impactar as taxas de mortalidade das IFIs.

Agradecimentos

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

Referências

ARENDRUP, Maiken C *et al*. **Epidemiology of invasive candidiasis; Current Opinion in Critical Care**. 2020. v. 16, p. 445-452.

MASTRANGELO, Andrea *et al*. **Candidemia in Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Patients: Incidence and Characteristics in a Prospective Cohort Compared With Historical Non-COVID-19 Controls**; Pubmed, [*s. l.*], 2 nov. 2021.

NUCCI, Marcio *et al*. **Increased incidence of candidemia in a tertiary care hospital with the COVID-19 pandemic**; Pubmed, [*s. l.*], 10 dez. 2020.

OSTROSKY-ZEICHNER, Luis *et al*. **Invasive Fungal Infections in the Intensive Care Unit**; Pubmed, 1 out. 2017.

S PERLIN, David. **The global problem of antifungal resistance: prevalence, mechanisms, and management**; Pubmed, [*s. l.*], 17 dez. 2017.

PRESTEL, Christopher *et al***. Candida auris Outbreak in a COVID-19 Specialty Care Unit;** Florida,15 janeiro. 2021.

TODA, Mitsuru *et al*. **Population-Based Active Surveillance for Culture-Confirmed Candidemia**; Four Sites, 27 de setembro de 2019.