

ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS
RELACIONADOS CON LA
RESISTENCIA ANTIFÚNGICA DE
C. parapsilosis

AÍDA RAMÍREZ MARINERO
SERVEI MICROBIOLOGÍA I PARASITOLOGIA
LABORATORI CLINIC METROPOLITANA NORD /
INSTITUT CATALÀ DE LA SALUT

1. Características generales del género *Candida*.
2. Infecciones causadas por *Candida*.
3. Antifúngicos, según mecanismo de acción
4. Mecanismos de resistencia.
5. Principales métodos de identificación molecular.



CARACTERÍSTICAS GENERALES

Reino: *Fungi*.

Subreino: *Dikarya*.

Orden: *Sacharomycetales*.

Son MO eucariotas que se distinguen de los otros eucariotas porque tienen una **pared celular** rígida formada por quitina y glucano y una **membrana celular** en la que el ergosterol sustituye al colesterol como principal componente esterólico.

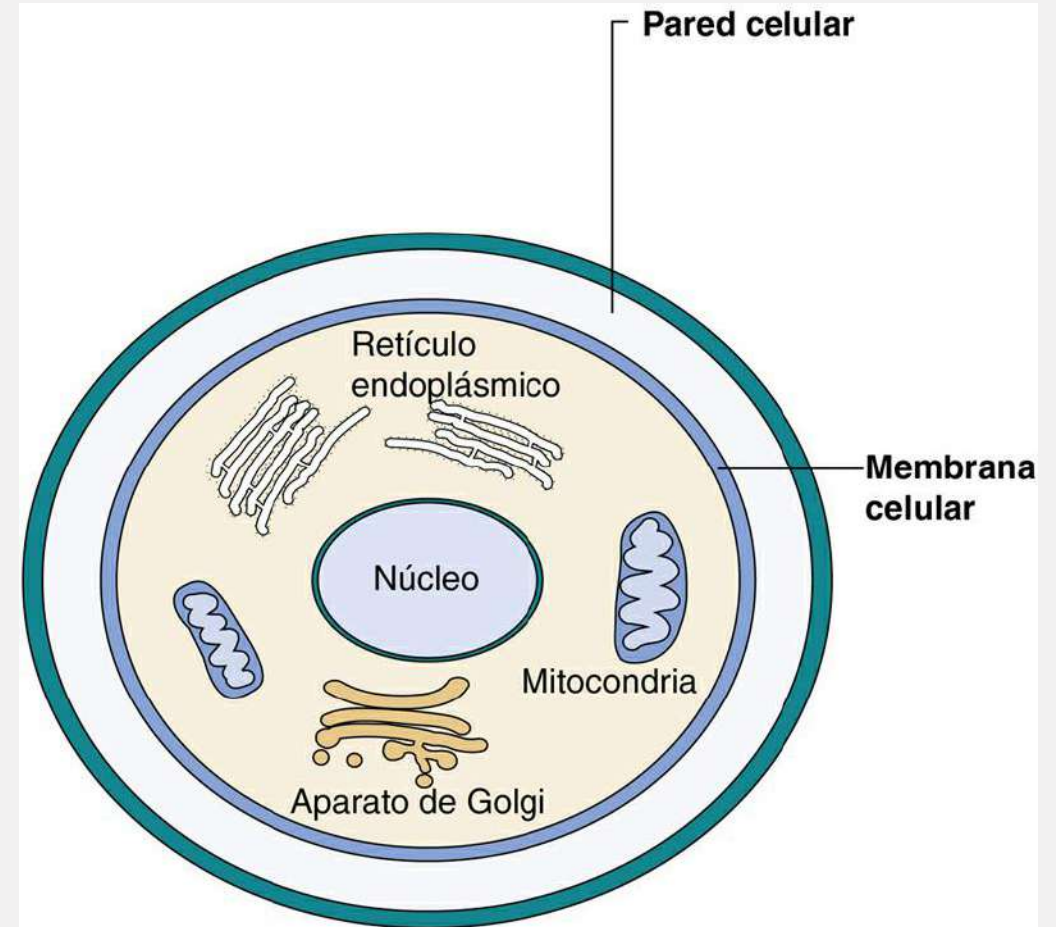
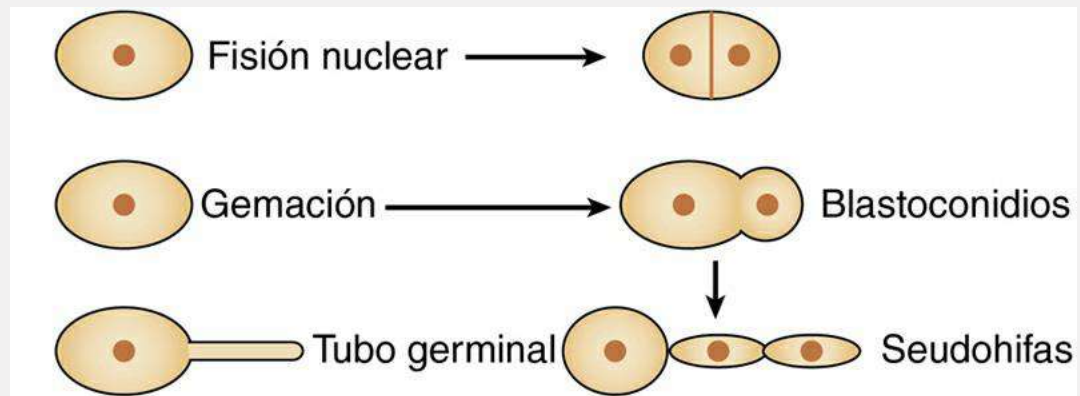


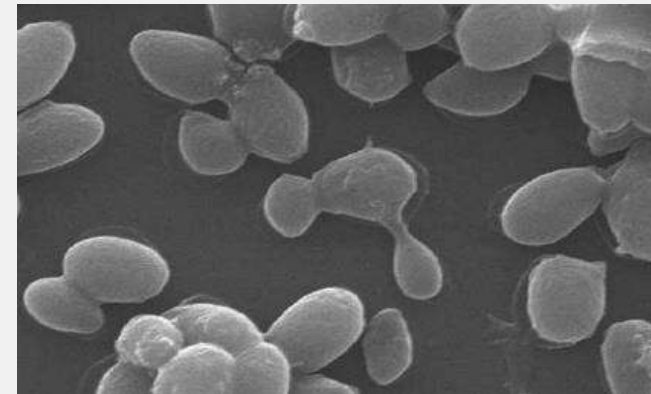
Diagrama de una célula micótica (Microbiología Médica Murray. 8ª Edición. Editorial Elsevier Mosby. 2017)

Las levaduras son células únicas de formas esféricas o elipsoidales y diámetro que varía de 3 a 15 μm .

Se reproducen asexualmente.



Esquema de la reproducción por fisión binaria y formación de blastoconidios



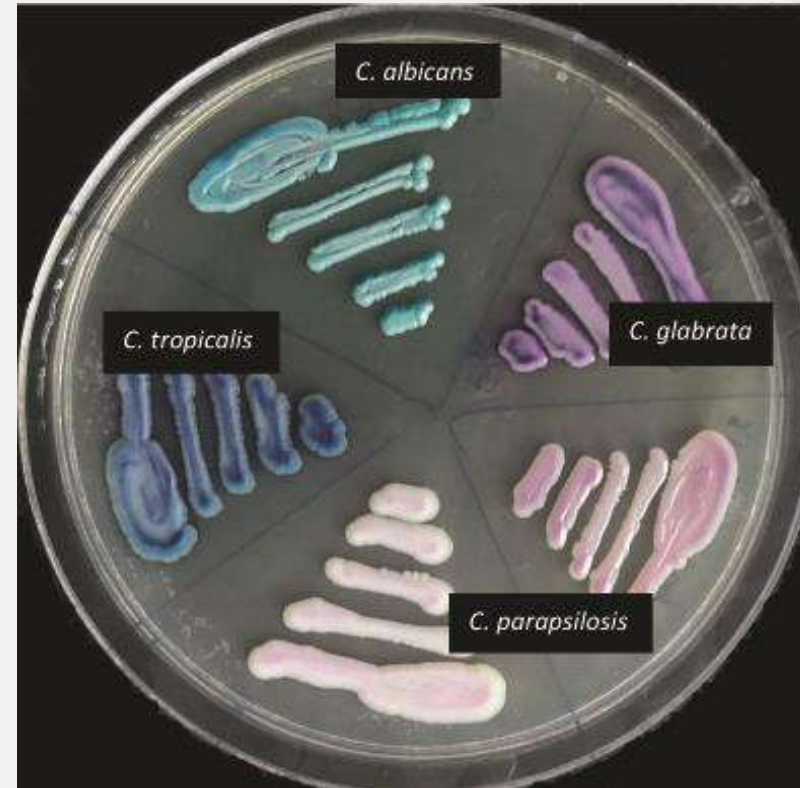
Micrografía electrónica del proceso de gemación de una levadura.

CULTIVO MICROBIOLÓGICO

Las colonias de levaduras por lo general son blandas, opacas, con tamaño de 1 a 3 mm y de color crema.



A. Crecimiento en agar Sabouraud.



B. Crecimiento en medio CHROMagar Candida.

INFECCIONES POR CÁNDIDA

- Candida es un microorganismo comensal, capaz de causar infecciones oportunistas en huéspedes susceptibles.
- Coloniza el aparato digestivo, vagina, uretra, piel y uñas.
- La gran mayoría de infecciones por Candida son de origen endógeno, aunque existen otros mecanismos: exógenos (transmisión interpersonal, inóculos a través de jeringas no estériles, catéteres y manos del personal sanitario) (Cantón et al., 2011; Bonifaz, 2012).

FACTORES DE RIESGO GENERALES	Gravedad de la enfermedad aguda
	Edad: < 1 año o > 65 años
	Comorbilidades: DM, cirrosis, malnutrición, etc.
	Cirugía (gastrointestinal) previa
	Estancia prolongada en la UCI
	Dispositivos invasivos
	Transfusiones múltiples
	Nutrición parenteral
	Catéter/Sonda vesical
	Ventilación mecánica
CONDICIONANTES INDIVIDUALES O POBLACIONES DE MAYOR RIESGO	Uso prolongado de catéter venoso central
	Presión antibiótica (amplio espectro)
	Colonización previa por <i>Candida spp</i>
	Insuficiencia renal y/o hemólisis
	Neutropenia
	Quimioterapia, inmunosupresores, corticoides
	Pancreatitis, perforación visceral, etc.
	Politraumatismo, gran quemado
	Neonato con corta edad gestacional, malformaciones congénitas, enfermedad gastrointestinal o shock

Muchos factores de virulencia han evolucionado para facultar a los hongos causantes de enfermedad de contrarrestar o engañar las defensas y vulnerar el ambiente del hospedador. Algunos de tales determinantes de virulencia incluyen:

- Transformaciones morfológicas (variación de morfología entre blastoconidias y pseudohifas),
- Activación genética de procesos metabólicos en respuesta al ambiente del hospedador,
- La producción de adhesinas de superficie que se unen a las membranas de las células hospedadoras,
- La secreción de enzimas que atacan los sustratos del hospedador (catalasa, aspartilproteinasas, fosfolipasas, queratinasas, hemolisinas, hialuronidasas, proteasas y peptidasas),
- Componentes de la pared celular que resisten la fagocitosis (p. ej., glucano α -(1,3), melanina, la cápsula de *Cryptococcus*) y
- La formación de biopelículas.

TABLE 1 Update on candidemia episodes caused by *C. parapsilosis*^a

Region	% <i>C. parapsilosis</i> incidence (ranking)	% <i>C. albicans</i> incidence (ranking)	Yr(s)	No. of hospitals included
Europe				
Southern region				
Spain	24.9 (2nd)	45.3 (1st)	2010–2011	29 hospitals, nationwide
Italy	22 (4th)	73.4 (1st)	Undefined	3 hospitals in southern Italy
	14.8 (3rd, Lombardy)	52.1 (1st, Lombardy)	2009	34 centers, nationwide
	23.5 (2nd, other areas)	45.2 (1st, other areas)		
	20 (2nd)	59 (1st)	2012–2013	39 hospitals, northern Italy
Portugal	23 (2nd)	40.4 (1st)	2011–2012	10 hospitals, nationwide
Greece	22.7 (2nd)	45.4 (1st)	2005–2009	PICU only, nationwide
Serbia	46	46	2014–2015	5 adult ICUs, nationwide
Middle/northern regions				
Finland	5 (3rd)	67	2004–2007	5 regions, nationwide
Austria	8.7 (3rd)	52.2 (1st)	2007–2008	9 centers
France	7.5 (3rd)	57 (1st)	2005–2006	180 ICUs, nationwide
United Kingdom	10.3 (3rd)	52 (1st)	2008	3 centers in Scotland, 2 centers in Wales
Switzerland	5.4 (4th)	61.9 (1st)	2004–2009	17 hospitals
Denmark	3.7 (3rd in females, 5th in males)	57.1 (1st)	2004–2009	6 hospitals
Norway	4.3 (4th)	67.7 (1st)	2004–2012	National surveillance study
Sweden	9 (3rd)	61 (1st)	2005–2006	Undefined, nationwide
Iceland	5 (5th)	56 (1st)	2000–2011	14 hospitals

Un metaanálisis reciente (1990-2012) de casos de candidiasis neonatal realizado por Pammi et al. reveló que *C. parapsilosis* es responsable del 33 % de todas las enfermedades invasivas por *Candida* en recién nacidos y representa aproximadamente el 80 % de las infecciones invasivas provocadas por NAC.

***Candida parapsilosis* Is a Significant Neonatal Pathogen**

A Systematic Review and Meta-analysis

Pammi, Mohan MD⁴; Holland, Linda PhD[†]; Butler, Geraldine PhD[†]; Gacser, Attila PhD[†]; Bliss, Joseph M. MD, PhD⁵

[Author Information](#) 

The Pediatric Infectious Disease Journal: May 2013 - Volume 32 - Issue 5 - p e206-e216
doi: 10.1097/INF.0b013e3182863a1c

ANTIFÚNGICOS

MECANISMO DE ACCIÓN	FAMILIAS	ACCIÓN
Inhibidores de la síntesis de glucanos.	Candinas (Equinocandina B, aculeacina A, cilofungina, anidulafungina, caspofungina y micafungina)	Inhiben la β -1,3-glucano-sintasa e impiden la formación de β -1,3-glucano.
Inhibidores de la síntesis de ergosterol.	Alilaminas (Terbinafina)	Inhibien la enzima escualeno epoxidasa interfiriendo en la síntesis de ergosterol.
	Morfolinas (Amorolfina)	Interfieren en la síntesis de ergosterol inhibiendo los enzimas D14 reductasa y D8 -D7 isomerasa.
	Azoles (Fluconazol, isavuconazol, itraconazol, posaconazol, voriconazol)	Inhiben la 14- α -demetilasa impidiendo la formación de ergosterol.
Antifúngicos que provocan daño directo en la membrana.	Polienos (Anfotericina B y nistatina)	Se unen al ergosterol afectando directamente a la membrana celular.
Inhibidores de la síntesis de ácidos nucleicos.	Flucitosina	Inhibe la síntesis de ácidos nucleicos actuando sobre la timidilato sintasa.

MECANISMOS DE RESISTENCIA

La resistencia a los antifúngicos se define como "la falta de sensibilidad relativa in vitro de un hongo a un fármaco antifúngico concreto" (Quindós, G., Micología clínica 2015).

La resistencia microbiológica frente a los antifúngicos se puede dividir en tres grupos:

- **Resistencia intrínseca o innata:** es la resistencia natural que presentan todas las cepas de una misma especie. No tiene relación con la exposición al antifúngico.
- **Resistencia primaria:** ocurre de manera espontánea en una especie de cepas normalmente sensibles a un antifúngico. No tiene relación con la exposición al antifúngico.
- **Resistencia secundaria o adquirida:** se desarrolla tras la exposición a los antifúngicos. Se manifiesta de forma estable o transitoria y cursa con alteraciones fenotípicas o genotípicas.

RESISTENCIA SECUNDARIA O ADQUIRIDA

Mecanismos:

1. Modificación de la diana (sobreexpresión, modificación de la estructura o supresión de la misma)
2. Alteración de la ruta metabólica que forma parte del mecanismo de acción del antifúngico.
3. Alteración de la concentración del antifúngico (bloqueando su entrada o expulsión activa al exterior)

MECANISMO DE RESISTENCIA A LOS AZOLES

- ♦ **Sobreexpresión** de sistemas de bombeo como las **bombas de eyección** de tipo facilitador principal o MF (major facilitator) que son codificadas por los **genes MDR** (Multi Drug Resistance) y los transportadores con casete de unión a trifosfato de adenosina o ABC (ATP-binding cassette), codificados por **genes CDR** (Candida Drug resistance).
- ♦ **Sobreexpresión** de **genes ERG11** que provoca la superproducción del **enzima 14 ademetilasa**. Consecuentemente, al aumentar la cantidad del enzima aumenta la producción de su sustrato (el **ergosterol**) y de esta manera se requerirán mayores concentraciones de antifúngico.
- ♦ **Mutaciones en genes ERG11** (sustitución Y132F), que provocan la **disminución de afinidad de la 14 ademetilasa con los azoles**, y **ERG3**. Las mutaciones en este gen que codifica para C-5 esteroles desaturasa, **elimina los efectos tóxicos** producidos por la acumulación de 14a-metil esteroides (sustancias acumuladas en las células tratadas con azoles que detienen el crecimiento del microorganismo).

MECANISMO DE RESISTENCIA A LAS CANDINAS

Mutaciones en los genes **FKS1** y **FKS2** que provocan **alteraciones** en el complejo enzimático encargado **de la síntesis de 1,3-b-glucano** que presenta una sensibilidad menor a la actividad de las candidinas.

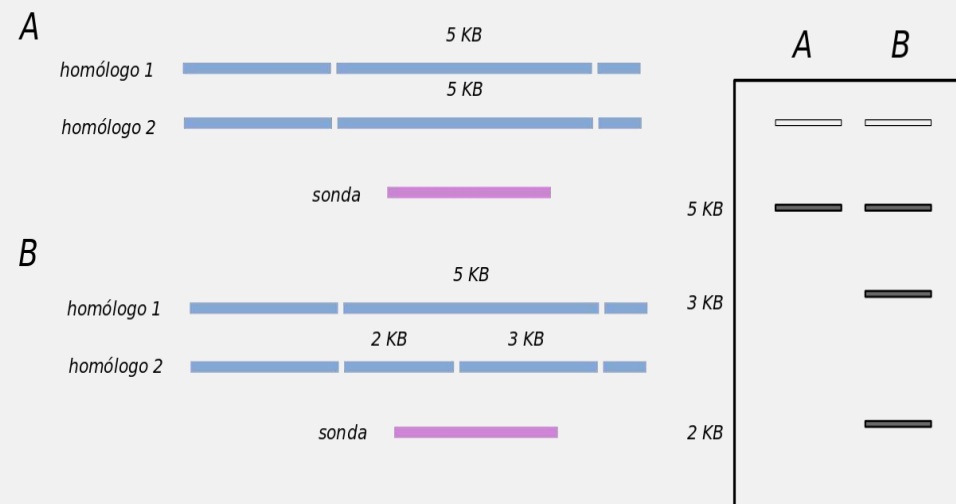


METODOS DE IDENTIFICACIÓN MOLECULAR

- ♦ RFLP.
- ♦ Utilización de marcadores micro-satelitales.
- ♦ Secuenciación del genoma completo.



RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*; Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción): es una técnica de biología molecular que nos permite detectar fragmentos de ADN de diferentes longitudes. Se basa en la acción de las **enzimas de restricción**, las cuales reconocen secuencias específicas de nucleótidos del ADN y hacen un corte en la cadena.



Microsatélites o short tandem repeats:

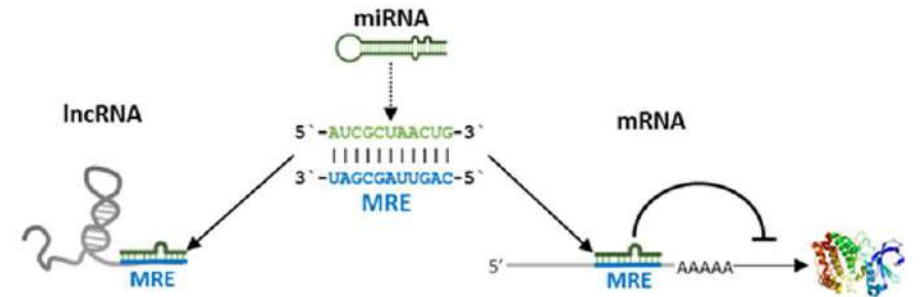
Son **marcadores constituidos por secuencias cortas** de mononucleótidos a hexanucleótidos que se repiten en tándem varias veces en el genoma.

Son codominantes (permiten diferenciar alelos heterocigotos) y altamente polimórficos. Permite distinguir entre microorganismos con poca variación en su secuencia. Permite evaluar eventos microevolutivos. Son reproducibles. Tienen alto poder de discriminación.

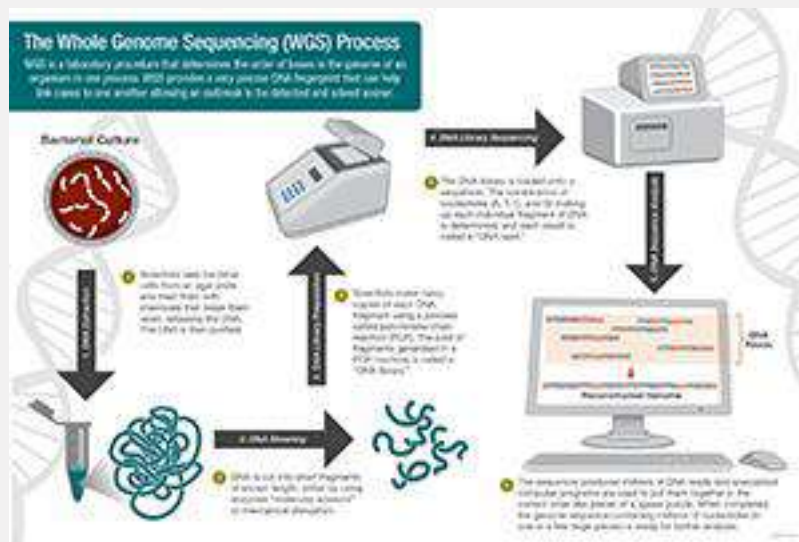
Presentan homoplasia. La homología de los alelos puede no ser resultado de la herencia, sino de mutaciones, ya que las secuencias estudiadas son altamente mutantes, resultando en homoplasia.

C. parapsilosis: Los cromosomas terminan en ambos extremos con matrices en tándem de repeticiones teloméricas de un motivo de 23 nucleótidos de longitud (5=GGTCCGGA GTT GATTATACTGA 3=)

Fig1. Ramon y Cajal, S. & Hümmer, S.



SECUENCIACIÓN DEL GENOMA COMPLETO



- Desde 2009, está disponible la secuencia completa del genoma de la cepa CDC317 de *C. parapsilosis*
- Tamaño del genoma 13 Mbp
- Diploide con con ocho pares de cromosomas
- Importantes hallazgos: locus de tipo de apareamiento MTL2 es un pseudogén y bajo bajo de heterocigosidad (bajo de heterocigosidad: 1 polimorfismo de nucleótido simple (SNP) heterocigoto por 15 553 bases. 25 -70 veces menor que otras especies)