

Nuevo mecanismo de resistencia a fluconazol en *Cryptococcus neoformans*.

Gamarra S¹, Theill L¹, Guelfand L², Frola C², Benitez C¹, Cabeza M¹, Garcia-Effron G^{1,3}

1- Laboratorio de Micología y Diagnóstico Molecular – Cátedra de Parasitología y Micología - Universidad Nacional del Litoral. Santa Fe (Santa Fe). 2- Hospital Fernández. Buenos Aires. 3- CONICET

Introducción

La criptococosis es una importante causa de mortalidad asociada al SIDA. El principal agente etiológico es *Cryptococcus neoformans*. El tratamiento de estas micosis incluye anfotericina B (AMB), 5-fluoricitocina y fluconazol (FLC). La prevalencia de resistencia a FLC es elevada. Sin embargo, los mecanismos moleculares subyacentes no han sido suficientemente estudiados. Solo se han descrito cuatro mecanismos de resistencia a azoles que incluyen dos mutaciones (Y145F y G484S) que alteran la afinidad de las drogas por la 14 alfa esterol demetilasa o ERG11 (blanco de los azoles), alteraciones en otros genes de la vía de síntesis del ergosterol y heteroresistencia por duplicaciones genómicas reversibles.

Objetivo

Estudiar el mecanismo de resistencia a FLC en un grupo de cepas de *Cryptococcus neoformans* aisladas de un paciente que no respondió al tratamiento con este azol.

Materiales y métodos

- Cepas:** Aislamientos durante el primer (cepas LMDM-908A y LMDM-908B) y segundo episodio (LMDM-909) de meningitis sucedidos con 11 meses de diferencia y donde el paciente recibió FLC como tratamiento de manera continua.
- Identificación fenotípica:** Método automatizado Bd Phoenix automated identification system
Método clásico (Agar Semilla Girasol, urea, asimilación, etc).
- Identificación genotípica:**
 - Extracción de ADN por el método de fenol-cloroformo.
 - Identificación a nivel especie por amplificación del gen *STR1* (del inglés. putative sugar transporter) (1).
- Estudio de clonalidad:** utilizando Multilocus Sequencing Typing (MLST) siguiendo el protocolo de Fungal MLST Database.
- Mecanismos de resistencia:** Amplificación y secuenciación de los genes *ERG11* de las cepas incluyendo promotores, marcos abiertos de lectura y terminadores (3000 nt).
- Estudio de sensibilidad a los antifúngicos** (FLC, AMB, voriconazol - VRC, posaconazol - PSC e itraconazol - ITC) siguiendo el protocolo de CLSI documentos M27A3 y M27S4 (2,3). Se utilizaron los puntos de corte epidemiológicos (ECV) para *C. neoformans* para considerar wild-type o no-wild type (4).
- Bioinformática:** Las secuencias de los genes incluidos en el protocolo de MLST y de *ERG11* fueron analizadas utilizando el programa BioEdit Sequence Alignment Editor v7.1.3.0.

Resultados

Las cepas LMDM-908A, LMDM-908B y LMDM-909 fueron:

- Identificadas como *C. neoformans sensu lato* por métodos fenotípicos (fig. 1) y como *C. neoformans sensu stricto* (antes denominado *C. neoformans* var. *grubii*) por métodos genotípicos (gen *STR1*) (1).

- Consideradas clonales (igual patrón de MLST): SOD1: alelo 1, CAP59: alelo 7, LAC1: alelo 3, IGS1: alelo 1, PLB1: alelo 3, GPD1: alelo 1.

Sensibilidad a antifúngicos (en µg/ml):

ATF	908A/908B	909
FLC	1,00	8,00
VRC	0,12	0,12
PSC	0,12	0,12
ITC	0,12	0,12
AMB	0,50	0,50

Fig. 1: Pruebas Fenotípicas



La secuenciación del gen *ERG11*: la cepa LMDM-909 presentó la mutación C960T (en heterocigosis) que produce un cambio de aminoácido P253L/P (en heterocigosis) (Fig. 2).

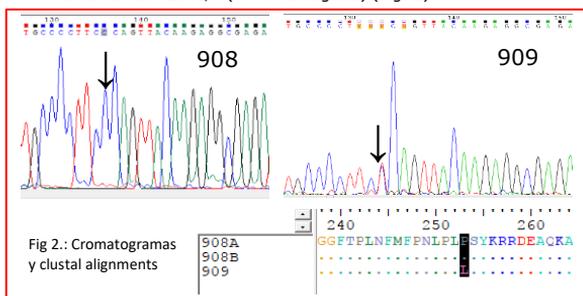


Fig 2.: Cromatogramas y clustal alignments

Conclusiones

La clonalidad de las cepas indica que la mutación C960T en heterocigosis en el gen *ERG11* (cambio de aa. P253P/L) es la responsable del fenotipo de resistencia a FLC en la cepa LMDM-909. El cambio de aminoácido se produjo en una región conservada en las 14 alfa esterol demetilasa fúngicas sindicada como una región que contacta con los azoles. En esta región se han descrito mutaciones en *Aspergillus fumigatus* y *Candida albicans* relacionadas con resistencia a azoles pero nunca antes se la había descrito en *C. neoformans*.

Bibliografía

- Feng et al. Development of a Singleplex PCR Assay for Rapid Identification and Differentiation of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*, *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans*, *Cryptococcus gattii*, and Hybrids. JCM 2013, 51(6): 1920-1923.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. Third Edition. Document M27-A3. 2008.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeast - Fourth Informational Supplement - CLSI document M27-S4 - Wayne, PA. 2012.
- Espinel-Ingroff et al. *Cryptococcus neoformans*-*Cryptococcus gattii* species complex: an international study of wild-type susceptibility endpoint distributions and epidemiological cutoff values for fluconazole, itraconazole, posaconazole, and voriconazole. AAC 2012. 56(11):5898-906.

Agradecimientos

Este proyecto fue financiado en parte por Laboratorios Gador SA y Fundación Bunge y Born.