Rev Iberoam Micol. 2017;xxx(xx):xxx–xxx

Revista Iberoamericana de Micología

www.elsevier.es/reviberoammicol

Original

Identificación molecular y sensibilidad a los antifúngicos de aislamientos de sangre del complejo *Candida parapsilosis* en Venezuela

Xiomara Moreno[a,*], Vera Reviakina[b], María M. Panizo[b], Giusseppe Ferrara[b], Nataly García[b], Víctor Alarcón[b], María F. Garcés[c] y Maribel Dolande[b]

[a] *Departamento de Microbiología, Instituto Médico La Floresta, Caracas, Venezuela*
[b] *Departamento de Micología, Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel, Caracas, Venezuela*
[c] *Laboratorio de Investigaciones Básicas y Aplicadas, Escuela de Bioanálisis, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela*

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:
Recibido el 6 de febrero de 2016
Aceptado el 17 de noviembre de 2016
On-line el xxx

Palabras clave:
Candidemia
Complejo *Candida parapsilosis*
Candida parapsilosis sensu stricto
Candida orthopsilosis
Candida metapsilosis
Sensibilidad
Antifúngicos

RESUMEN

Antecedentes: *Candida parapsilosis* constituye un complejo de especies formado por *Candida parapsilosis sensu stricto*, *Candida orthopsilosis* y *Candida metapsilosis*. Estudios a nivel mundial han descrito su epidemiología y sensibilidad a los antifúngicos.
Objetivos: Los objetivos de este trabajo fueron identificar molecularmente aislamientos de sangre del complejo *Candida parapsilosis* y determinar su sensibilidad *in vitro* a los antifúngicos de uso sistémico.
Métodos: Se estudiaron 86 aislamientos del complejo *C. parapsilosis*, provenientes de la Red de Vigilancia de Candidemia del Departamento de Micología del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel, recogidos en el periodo 2008-2011. Se realizó la amplificación del gen de la deshidrogenasa alcohólica secundaria por reacción en cadena de la polimerasa y los productos fueron analizados mediante los polimorfismos de la longitud de sus fragmentos de restricción, mediante el uso de la enzima *BanI*. Las pruebas de sensibilidad se realizaron mediante Etest® según las instrucciones del fabricante, con modificaciones.
Resultados: De los 86 aislamientos estudiados, 81 (94,2%) fueron *C. parapsilosis sensu stricto*, 4 (4,6%) *C. orthopsilosis* y uno (1,2%) *C. metapsilosis*. *C. parapsilosis* fue sensible a la anfotericina B y la caspofungina, y su porcentaje de resistencia al fluconazol y el voriconazol fue bajo. *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis* fueron sensibles a todos los antifúngicos probados.
Conclusiones: Los resultados aportaron por primera vez en Venezuela información importante sobre la distribución del complejo *C. parapsilosis* en casos de candidemia, y apoyan la necesidad de continuar con los programas de vigilancia, incluyendo la discriminación molecular de las especies y las pruebas de sensibilidad a los antifúngicos, que permitirán orientar la terapia específica.

© 2017 Asociación Española de Micología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

Molecular identification and *in vitro* antifungal susceptibility of blood isolates of the *Candida parapsilosis* species complex in Venezuela

Keywords:
Candidaemia
Candida parapsilosis species complex
Candida parapsilosis sensu stricto
Candida orthopsilosis
Candida metapsilosis
Susceptibility
Antifungal agents

ABSTRACT

Background: *Candida parapsilosis* is a species complex consisting of *Candida parapsilosis sensu stricto*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis*. Studies worldwide have described its epidemiology and susceptibility to antifungal agents.
Aims: The aims of this study were to carry out the molecular identification of blood isolates belonging to the *Candida parapsilosis* species complex, and to determine their *in vitro* susceptibility to antifungals of systemic use.
Methods: A study of 86 strains of *C. parapsilosis* species complex collected in 2008-2011 and obtained from the Candidaemia Surveillance Network of Mycology Department of the Rafael

* Autor para correspondencia.
Correo electrónico: x.morenoc@hotmail.com (X. Moreno).

http://dx.doi.org/10.1016/j.riam.2016.11.005
1130-1406/© 2017 Asociación Española de Micología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

Cómo citar este artículo: Moreno X, et al. Identificación molecular y sensibilidad a los antifúngicos de aislamientos de sangre del complejo *Candida parapsilosis* en Venezuela. Rev Iberoam Micol. 2017. http://dx.doi.org/10.1016/j.riam.2016.11.005

Rangel National Institute of Hygiene, was made. Secondary alcohol-dehydrogenase gene amplification was performed using polymerase chain reaction, and the products were analysed by restriction fragments length polymorphisms using the enzyme *BanI*. Susceptibility tests were performed using Etest®, following the manufacturer's instructions with modifications.

Results: Of the 86 isolates studied, 81 (94.2%) were *C. parapsilosis sensu stricto*, 4 (4.6%) *C. orthopsilosis*, and one (1.2%) *C. metapsilosis*. *C. parapsilosis* isolates were susceptible to amphotericin B and caspofungin, showing low rates of resistance to fluconazole and voriconazole. *C. orthopsilosis* and *C. metapsilosis* were susceptible to all the antifungals tested.

Conclusions: The results obtained in Venezuela provide for the first time important information about the distribution of *C. parapsilosis* species complex in cases of candidaemia, and support the need for continuing surveillance programs, including molecular discrimination of species and antifungal susceptibility tests, which may guide specific therapy.

© 2017 Asociación Española de Micología. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

Durante la última década la incidencia de *Candida parapsilosis* se ha incrementado drásticamente, llegando a situarse como la segunda levadura más frecuentemente aislada en hemocultivos, después de *Candida albicans*[28].

La variabilidad genética de *C. parapsilosis*, descrita por el análisis del polimorfismo de los fragmentos de restricción del gen de la deshidrogenasa alcohólica secundaria *(SADH)*, llevó a su separación en tres grupos, con la consiguiente conformación de un complejo de especies: *C. parapsilosis sensu stricto* (grupo I), *C. orthopsilosis* (grupo II) y *C. metapsilosis* (grupo III)[6,24,25]. Curiosamente, una serie de alelos de *C. parapsilosis sensu stricto* están presentes en cepas de *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis*, pero alelos de *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis* no se han detectado en *C. parapsilosis sensu stricto*. Esto evidencia que esta última podría haber surgido hace poco tiempo, por divergencia de una subpoblación genéticamente homogénea; su elevada distribución global y alta tasa de aislamiento en muestras clínicas avala su naturaleza clonal e indican una veloz propagación geográfica, debido a su rápida transmisión horizontal de persona a persona y excelente adaptación como comensal al ser humano, en contraposición a lo observado en sus dos especies hermanas[13,25].

Estudios sobre la sensibilidad a los antifúngicos de aislamientos del complejo *C. parapsilosis* (CCP) han reportado valores de concentración mínima inhibitoria (CMI) elevados para la anfotericina B (AB), las equinocandinas y los azoles, específicamente el fluconazol (FZ) para *C. parapsilosis sensu stricto*, mientras que *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis* suelen presentar valores CMI más bajos[11,27]; en otro estudio, sin embargo, se encontraron valores CMI similares entre todas las especies[12]. Esto evidencia la necesidad de realizar la identificación molecular de los aislamientos pertenecientes a este complejo, ya que pueden existir diferencias en el patrón de sensibilidad a los antifúngicos, particularmente para los azoles y las equinocandinas[14].

Materiales y métodos

Procedencia de los aislamientos

Se estudiaron 86 aislamientos del CCP provenientes de la Red de Vigilancia de Candidemias del Departamento de Micología del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel, escogidos al azar y aislados en el periodo 2008-2011. Los aislamientos se mantuvieron preservados por el método de agua de Castellani[18] hasta el momento de su procesamiento.

Preparación de los aislamientos

La recuperación de los aislamientos se realizó mediante pases sucesivos en agar Sabouraud dextrosa y su incubación durante 24-48 h a 35 °C. Se constató así su viabilidad y pureza. La identificación taxonómica de las cepas se realizó mediante pruebas fenotípicas: resistencia a la cicloheximida (agar Mycosel®, Oxoid), producción de pigmentos en agar cromógeno (Oxoid), visualización de la morfología microscópica en agar harina de maíz y el uso de Vitek® 2 Compact (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, Francia).

Extracción del ADN genómico

Se preparó en solución salina estéril al 0,85% una suspensión de los aislamientos a una concentración 0,5 McFarland en un densitómetro (Densimat™, bioMérieux) a 530 nm; el ADN genómico fue extraído mediante la utilización del QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN) y siguiendo las instrucciones del fabricante.

Amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del gen SADH

Se siguió el protocolo descrito por Tavanti et al.[25] y se estandarizó a las condiciones del laboratorio de micología molecular del Departamento de Micología del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel. Para la preparación de la mezcla de reacción se utilizaron los siguientes reactivos: 5 μl de ADN genómico; 0,5 μl de Taq polimerasa 5 U/μl (KAPATaq™, HotStart-Kapa Biosystems); 5 μl de *buffer* libre de magnesio 10X (Invitrogen); 1,5 μl de $MgCl_2$ 50 mM (Invitrogen); 2,4 μl de ditiotreitol 0,1 mM (Invitrogen); 0,1 μl de inhibidor recombinante de ribonucleasas 40 U (Invitrogen); 1 μl de DNTP 10 mM; 1 μl de cada uno de los cebadores 5′-GTT GAT GCT GTT GGA TTG T-3′ y 3′-CAA TGC CAA ATC TCC CAA-5′ (Bioneer, Inc.) y 32,5 μl de agua libre de nucleasas, para completar un volumen de 50 μl. La amplificación fue llevada a cabo en un termociclador modelo iCycler® (SensoQuest) bajo las siguientes condiciones: un primer ciclo de desnaturalización de 7 min a 94 °C; 35 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 30 s, alineamiento a 55 °C durante 60 s y elongación a 72 °C durante 90 s; se terminó con un ciclo de elongación final a 72 °C durante 5 min.

El producto obtenido fue sometido a electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio, para observar así la presencia de un producto de 716 pb que distingue a los aislamientos dentro del CCP. Se utilizó un marcador de 100 pb de peso molecular (Amersham GE Healthcare) y la visualización se realizó en el sistema de documentación de imágenes Gel Doc XR® con el *software* de análisis 1D Quantity One® (Laboratorios Bio-Rad).

Análisis del fragmento SADH mediante enzimas de restricción[25]

Los amplicones obtenidos por PCR fueron digeridos con la enzima de restricción *BanI* (New England Biolabs, Ipswich, MA), con la siguiente mezcla de reacción: 0,14 μl de enzima *BanI* (Invitrogen); 1,4 μl de *buffer* 10X (Invitrogen); 0,14 μl de BSA 100X (Invitrogen); 7 μl del producto de PCR y 5,32 μl de agua grado

Cómo citar este artículo: Moreno X, et al. Identificación molecular y sensibilidad a los antifúngicos de aislamientos de sangre del complejo *Candida parapsilosis* en Venezuela. Rev Iberoam Micol. 2017. http://dx.doi.org/10.1016/j.riam.2016.11.005

Download English Version:

https://daneshyari.com/en/article/5674354

Download Persian Version:

https://daneshyari.com/article/5674354

Daneshyari.com