

Estudio de factores asociados con la virulencia de aislamientos clínicos de la levadura emergente multiresistente *Candida auris* recuperados en Colombia: en búsqueda de predictores de la evolución clínica y marcadores de resistencia

Entidades participantes:

Instituto Nacional de Salud, Grupo de Microbiología; Pontificia Universidad Javeriana, Unidad de Proteómica y Miosis Humanas; Universidad del Rosario, Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud; Centro de Investigaciones Microbiológicas del Cesar; Grupo Cinbios, Universidad Popular del Cesar; Fundación UCI Doña Pilar-Centro de Investigación y docencia, Cartagena; Centers for Disease Control and Prevention, Mycotic Diseases Branch

Código del proyecto Colciencias: 2017360013243

107

Aislamientos de *C. auris* de origen invasivo y de colonización

1. Morfología celular de *C. auris*

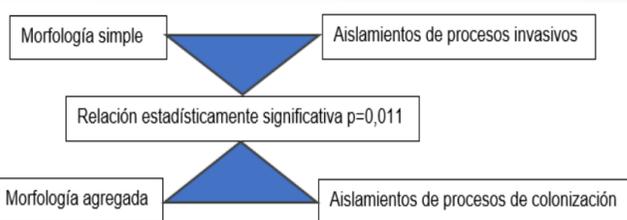


Figura 1. Relación del tipo de morfología con el origen de los aislamientos de *C. auris* (colonización o invasión) provenientes de Cartagena.

En Cartagena el tipo de morfología simple se relacionó con los aislamientos invasivos y la agregada, a los de colonización ($p=0,011$) (figura 1). En Valledupar 19 aislamientos de origen de colonización presentaron una morfología simple, sin embargo no se observó una asociación estadísticamente significativa ($p=0,266$).

2. Actividad enzimática

Actividad enzimática (figura 2):

Fosfolipasas: el 67,3% (72/107) presentaron algún tipo de actividad. No se encontró diferencias estadísticamente significativas o relación entre el origen invasivo y colonización con presentar algún tipo de actividad fosfolipasa $p=0,555$ para Valledupar, $p=0,062$ para Cartagena.

Proteasas: el 100% de los aislamientos presentaron algún tipo de actividad. No se encontró diferencias estadísticamente significativas o relación entre el origen invasivo y colonización con presentar algún tipo de actividad proteasa $p=0,875$ (Valledupar), $p=0,357$ (Cartagena).

Hemolisina: el 68,22% (73/107) presentaron algún tipo de actividad. Para los dos departamentos se encontró una relación entre el origen invasivo y colonización con presentar actividad hemolítica $p=0,000$.

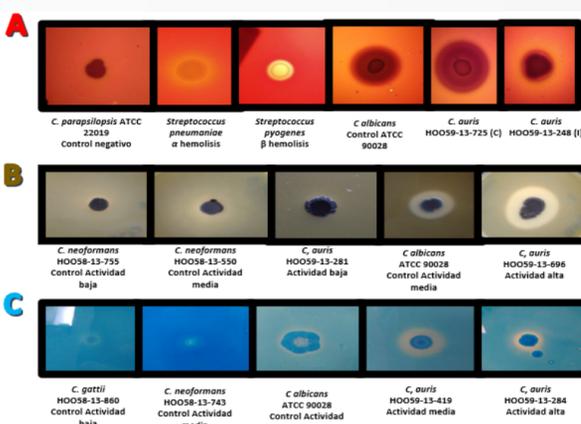


Figura 2. Evaluación de enzimas extracelulares en aislamientos de *C. auris*. (A) actividad enzimática hemolítica (B) actividad enzimática fosfolipasa (C) actividad enzimática proteasa.

En general, más del 70% de los aislamientos presentaron actividad fosfolipasa y/o hemolisina; y todos los aislamientos presentaron actividad proteolítica.

3. Formación de biopelículas

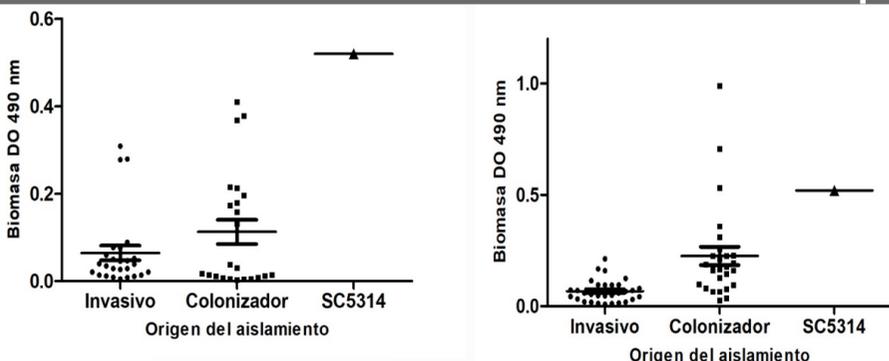


Figura 3. Gráfica de dispersión. Biomasa formada por los aislamientos de *C. auris* provenientes de Cartagena (izquierda) y Valledupar (derecha) y la cepa control *C. albicans*.

Formación de biopelículas:

Se observó que la formación de biopelículas de solo tres aislamientos de origen colonizador de Valledupar es comparable con la cepa control *C. albicans* que es considerada un formador de biopelícula por excelencia (figura 3).

4. Resultados consolidados: morfología, actividad enzimática y biopelículas

Proceso (n)	Morfología	ACTIVIDAD ENZIMÁTICA												Formación biopelícula			
		Simple	Agregado	Fosfolipasas (Pz)				Proteasas (Pz)			Hemolisina(Hz)				actividad metabólica (OD ₄₉₀ nm)	promedio	
				negativa	baja	media	alta	baja	media	alta	negativa	baja	media	alta			
Cartagena	Invasivo	26	23	3	16	10	0	0	10	14	2	15	10	1	0	0.005-0.309	0.064
	Colonización	23	13	10	8	15	0	0	6	17	0	0	13	10	0	0.003-0.410	0.112
Total	49	36	13	24	25	0	0	16	31	2	15	23	11	0	-	-	
Valledupar	Invasivo	31	17	14	5	26	0	0	12	18	1	19	10	2	0	0.009-0.213	0.068
	Colonización	27	19	8	6	18	2	1	11	13	3	0	7	15	5	0.026-0.990	0.226
Total	58	36	22	11	44	2	1	23	31	4	19	17	17	5	-	-	

Tabla 1. Tipo de proceso, morfología, actividad enzimática, actividad metabólica de la biopelícula y su relación de acuerdo al departamento de origen de los 107 aislamientos de *C. auris*.

5. Perfil de susceptibilidad



Figura 4. Descripción general de los perfiles de susceptibilidad antifúngica *in vitro* de *C. auris* provenientes de Cartagena (izquierda) y Valledupar (derecha).

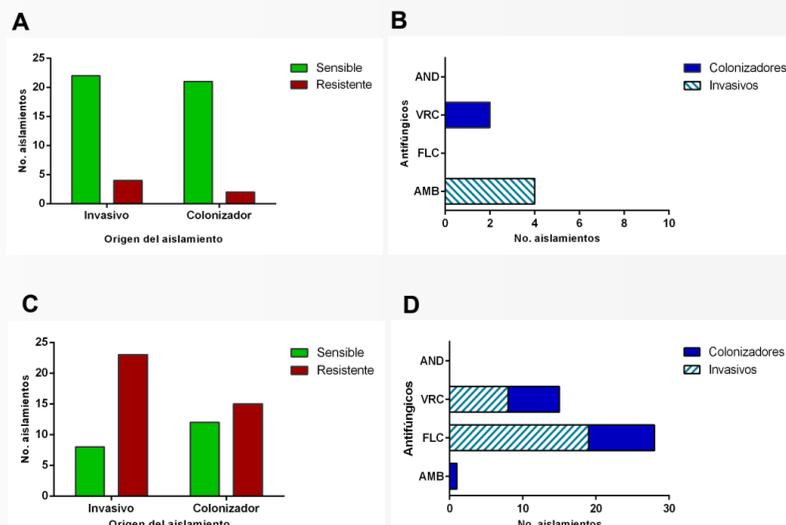
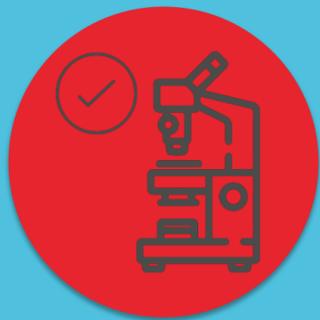


Figura 5. Sensible: a todos los antifúngicos. Resistente: a por lo menos un antifúngico. A. Perfil de susceptibilidad de los aislamientos *C. auris* provenientes de Cartagena y su relación con el origen invasivo y de colonización; B. Resistencia de aislamientos de *C. auris* de origen invasivo y colonizador provenientes de Cartagena; C. Perfil de susceptibilidad de los aislamientos *C. auris* provenientes de Valledupar y su relación con el origen invasivo y de colonización; D. Resistencia de aislamientos de *C. auris* de origen invasivo y colonizador provenientes de Valledupar. AND: anidulafungina; VRC: voriconazol; FLC: fluconazol; AMB: anfotericina B.

Sensibilidad antifúngica:

Cartagena: un 15,4% (4/26) de los aislamientos invasivos fueron resistentes a anfotericina B y un 8,7% (2/23) colonizadores resistentes a voriconazol. Los demás aislamientos fueron sensibles a los cuatro antifúngicos.

Valledupar: el mayor porcentaje de resistencia en los aislamientos de *C. auris* de origen invasivo y de colonización se observó en presencia de fluconazol, con un 61,3% (19/31) y 33,3% (9/27), respectivamente.



Estudio de factores asociados con la virulencia de aislamientos clínicos de la levadura emergente multiresistente *Candida auris* recuperados en Colombia: en búsqueda de predictores de la evolución clínica y marcadores de resistencia

107

Aislamientos de *C. auris* de origen invasivo y de colonización analizados

Susceptibilidad antifúngica en biopelículas

Figura 5. Formación de biopelículas en aislamientos de *C. auris* expuestos a diferentes concentraciones de fluconazol. (A) aislamientos de origen invasivo. (B) aislamientos de origen de colonización.

(A) De los 14 aislamientos (biopelículas) evaluados solo un aislamiento H0059-13-286 muestra alta sensibilidad (5 µg/ml) frente al fluconazol. 6 aislamientos mostraron mayor resistencia (>640 µg/ml) de las biopelículas formadas expuestas al fluconazol, sobrepasando la formación inicial de las biopelículas controles (sin antifúngico) como lo es para las cepas H0059-13-166, H0059-13-419, H0059-13-420, H0059-13-144, H0059-13-418 y H0059-13-461. (B) De los 18 aislamientos 14 mostraron resistencia (>640 µg/ml) de las biopelículas formadas expuestas al fluconazol, sobrepasando la formación inicial de las biopelículas controles (sin antifúngico), cabe resaltar que la mayoría de resistencia se observó a concentraciones mínimas (<10 µg/ml) del antifúngico, solo unos pocos aislamientos presentaron resistencia a concentraciones altas (40 µg/ml) del fluconazol como el H0059-13-581.

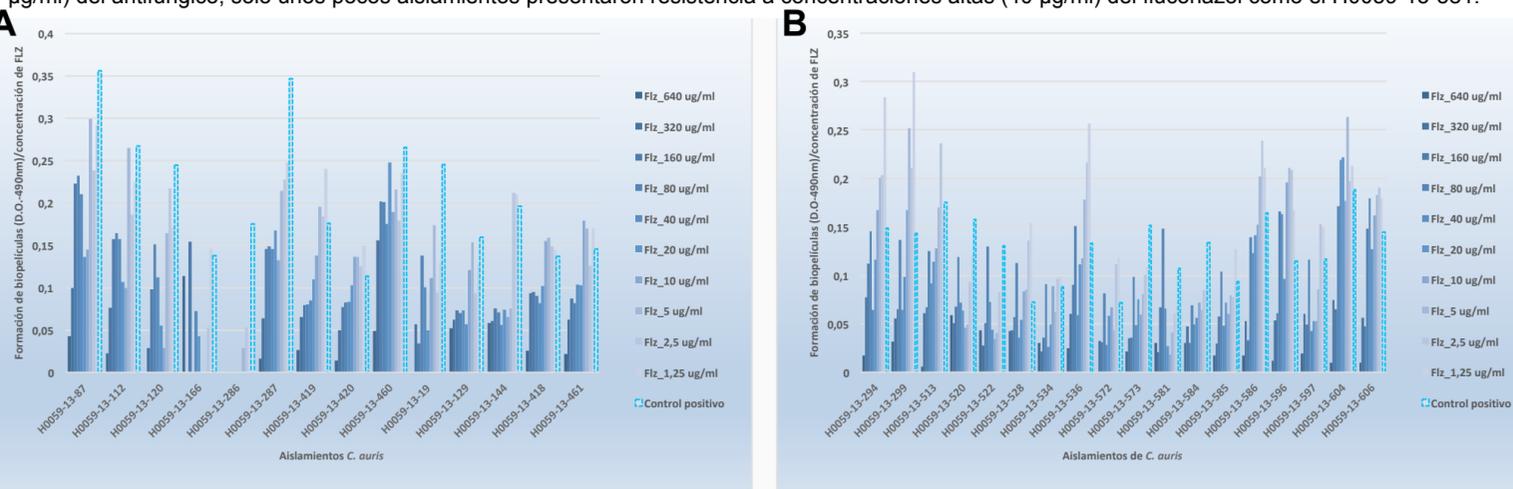


Figura 6. Formación de biopelículas en aislamientos de *C. auris* expuestos a diferentes concentraciones de anfotericina B, (A) aislamientos de origen invasivo. (B) aislamientos de origen de colonización.

Se encontró similar formación y actividad metabólica de biopelículas tanto en los aislamientos de origen invasivos como en los de colonización; sin embargo, para los aislamientos invasivos se puede resaltar 4 aislamientos que, aunque en la formación control de biopelícula su actividad fue mayor con respecto a la cepa de referencia ($DO_{490nm} = 0,6-1,0$ *C. albicans* SC5314 formadora de biopelícula) al exponerlas a las diferentes concentraciones de anfotericina B se observó total sensibilidad a este. Por otro lado, se observaron algunos aislamientos con una resistencia (>16 µg/ml) a la anfotericina B que lograron superar la formación de biopelícula control (sin antifúngico) como lo fue para las cepas H0059-13-101, H0059-13-107, H0059-13-112, H0059-13-120 y H0059-13-166. (B) todos los aislamientos provenientes de origen de colonización tuvieron menor formación y actividad metabólica que la cepa de referencia y al exponerlas a las diferentes concentraciones de anfotericina B mostraron ser sensibles.

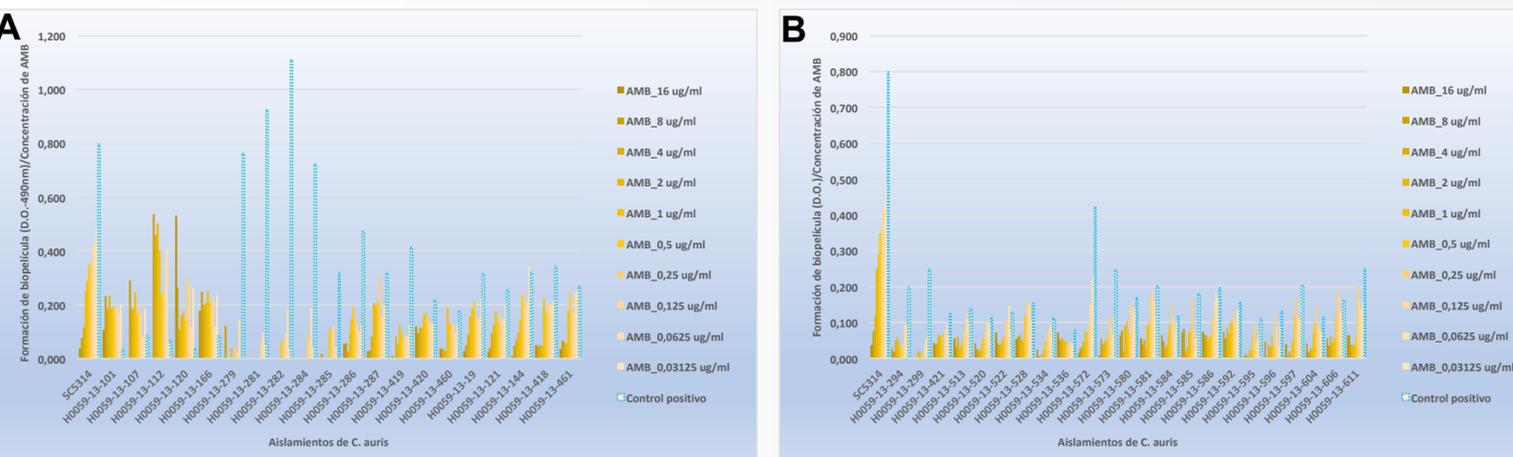


Figura 7. Formación de biopelículas en aislamientos de *C. auris* expuestos a diferentes concentraciones de voriconazol, (A) aislamientos de origen invasivo. (B) aislamientos de origen de colonización.

Se encontró mayor resistencia de las biopelículas en los aislamientos de origen invasivos resaltando 2 aislamientos que fueron casi totalmente sensibles a las diferentes concentraciones de voriconazol el H0059-13-129 y H0059-13-135, solo un aislamiento el H0059-13-285 se mostró menos sensible sobrepasando la formación de biopelícula control (sin antifúngico) a concentraciones mas bajas (0,313 µg/ml) del voriconazol. Se observó algo muy particular con relación a los aislamientos de origen de colonización donde todos los aislamientos tuvieron una sensibilidad constante o igual con las diferentes concentraciones de voriconazol, como se observa en el H0059-13-299, H0059-13-522, H0059-13-534, H0059-13-536, H0059-13-573, H0059-13-585 con respecto a su formación de biopelícula control (sin antifúngico).

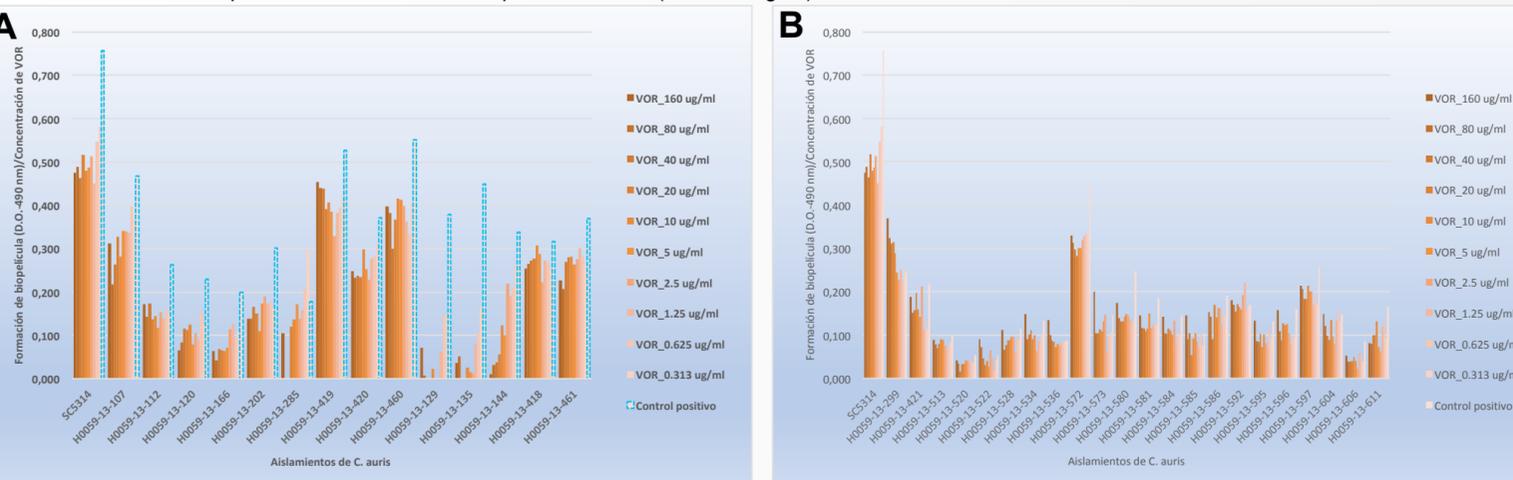
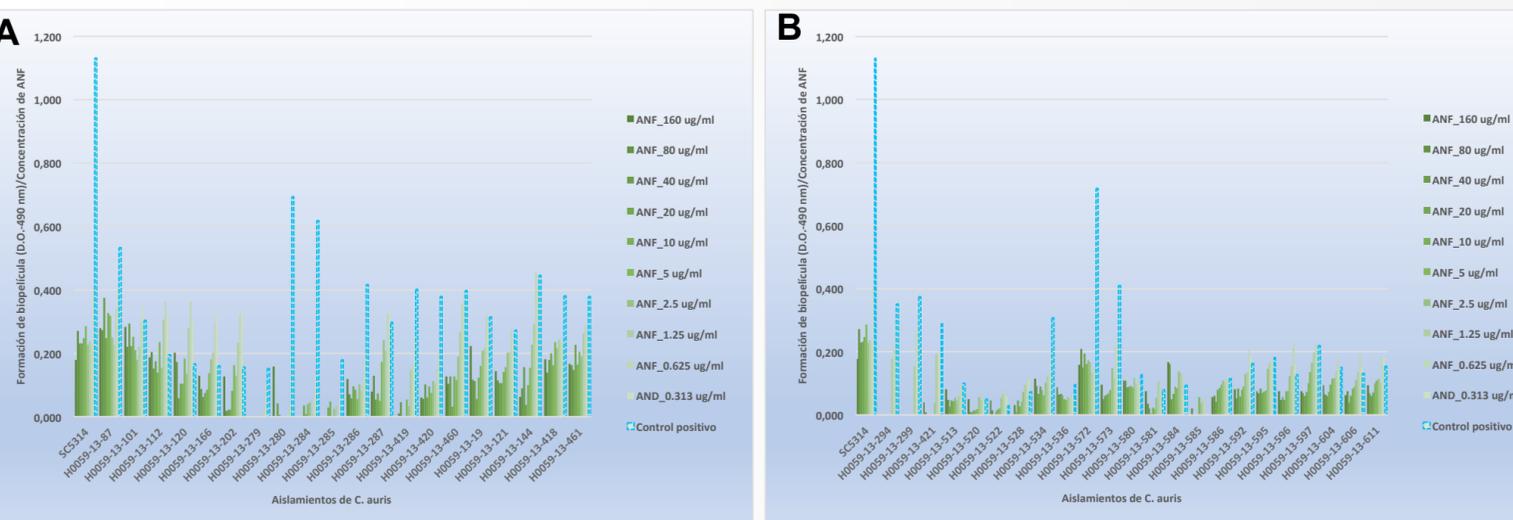
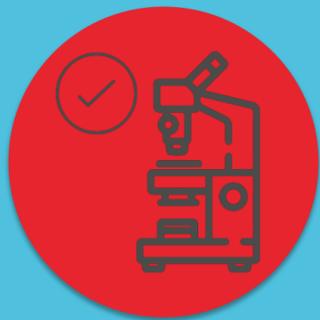


Figura 8. Formación de biopelículas en aislamientos de *C. auris* expuestos a diferentes concentraciones de anidulafungina, (A) aislamientos provenientes de origen invasivos y (B) aislamientos provenientes de origen de colonización.

Se encontró mayor formación y actividad metabólica de biopelículas en los aislamientos de origen invasivos resaltando 4 aislamientos H0059-13-279, H0059-13-280, H0059-13-284 y H0059-13-285 que fueron sensibles a todas las concentraciones de anidulafungina; sin embargo, se encontró 4 aislamientos H0059-13-112, H0059-13-120, H0059-13-166 y H0059-13-202 que fueron resistentes (<1,25 µg/ml) a medida que disminuyeron las concentraciones del antifúngico sobrepasando así la formación de biopelícula control (sin antifúngico). Por otro lado, aunque se vio menor formación y actividad metabólica de las biopelículas de los diferentes aislamientos provenientes de procesos de colonización, se observó que algunos aislamientos adquirieron resistencia a las diferentes concentraciones de la anidulafungina como el H0059-13-522, H0059-13-528, H0059-13-584, H0059-13-592, H0059-13-596, H0059-13-604, H0059-13-606 y H0059-13-611 con respecto a la formación de biopelícula del control (sin antifúngico).





107

Aislamientos de *C. auris* de origen invasivo y de colonización analizados

Patogenicidad de *C. auris* en modelo invertebrado *G. mellonella*

Cartagena.
Las larvas fueron inyectadas con 10µl de un inóculo a una concentración de 1x10⁸ células/ml. La mortalidad en la cepa referencia SC5314 de *C. albicans* fue al día 6 pos-infección, con una DL50 al segundo día; mediante la comparación de las curvas de supervivencia y tiempos medios, se determinó que 21/49 (42,9%) aislamientos presentaron una alta patogenicidad comparados con la cepa control; de éstos, 10/21 (47,6%) aislamientos pertenecían a origen invasivos y 11/21 (52,4%) a colonizados. La morfología más frecuente en los aislamientos de alta patogenicidad fue simple (12/21, 57,1%), con diferencias estadísticamente significativa, demostrando una relación entre presentar una morfología simple con origen invasivo y morfología agregada con origen de colonización p=0,044. De los aislamientos relacionados con baja patogenicidad, 16/28 (57,1%) provenían de origen invasivos y 12/28 (42,9%) de colonizados. No se observó una diferencia estadísticamente significativa entre el tipo de origen (invasivo/colonizado) y la patogenicidad de *C. auris* en *G. mellonella* (baja/alta) p=0,509.

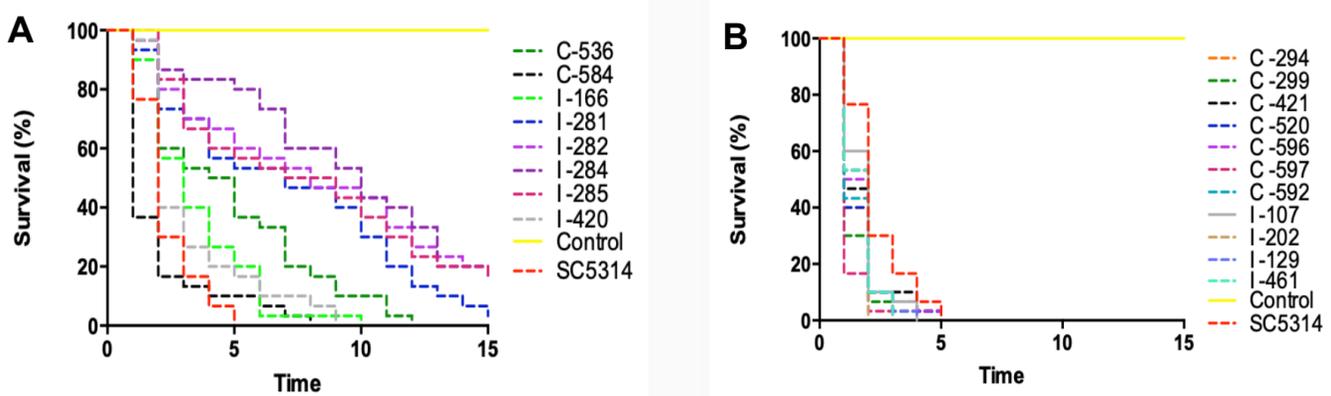


Figura 9. A) aislamientos de *C. auris* que mostraron baja virulencia en *G. mellonella* de origen invasivo y de colonizado; B) aislamientos de *C. auris* que mostraron alta patogenicidad en *G. mellonella* provenientes de origen invasivo (I) y de colonizados (C).

		Origen Invasivo- Cartagena																									
Aislamientos		19	87	101	103	107	112	120	121	129	135	144	166	202	279	280	281	282	284	285	286	287	418	419	420	460	461
Log-rank (Mantel-Cox)	p-value	0,0946	0,8653	0,58	0,1742	0,044	0,2583	0,717	0,2508	0,0132	0,267	0,965	0,005	0	0,707	0,63	P<0,001	P<0,001	P<0,001	P<0,001	0,216	0,962	1	0,08	0,023	0,617	0,007

		Origen colonización- Cartagena																						
Aislamientos		294	299	421	513	520	522	528	534	536	572	573	580	581	584	585	586	592	595	596	597	604	606	611
Log-rank (Mantel-Cox)	p-value	0,0032	0,0035	0,04	0,3984	0,015	0,2644	0,398	0,1186	P<0,001	0,094	0,651	0,594	0,05	0,039	0,45	0,22	0,005	0,1792	0,04	P<0,001	0,308	0,918	0,906

Tabla 2. Patogenicidad de aislamientos de *C. auris* de origen invasivo y colonizado en el modelo invertebrado *G. mellonella*. Prueba Log-rank (Mantel-Cox).

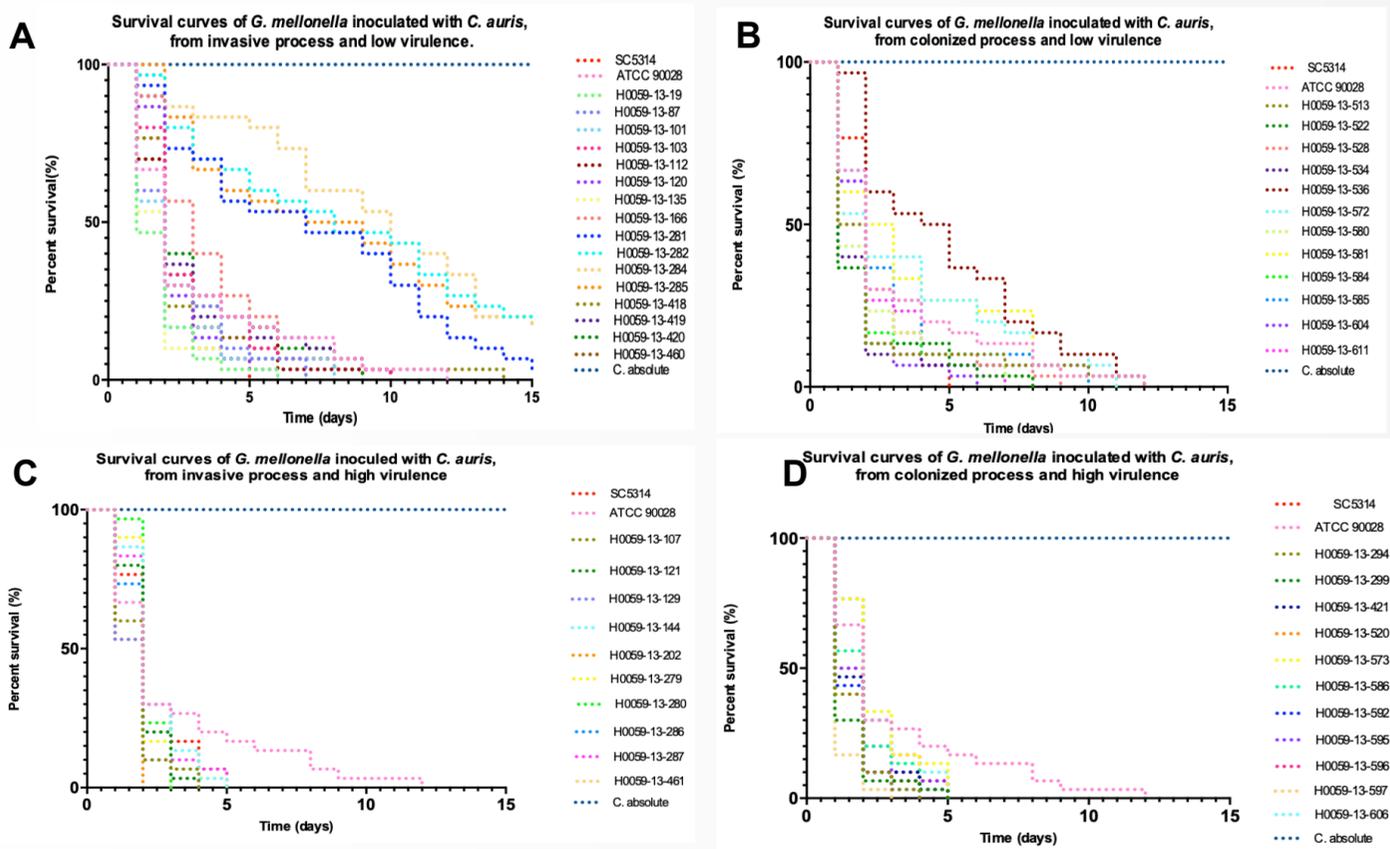
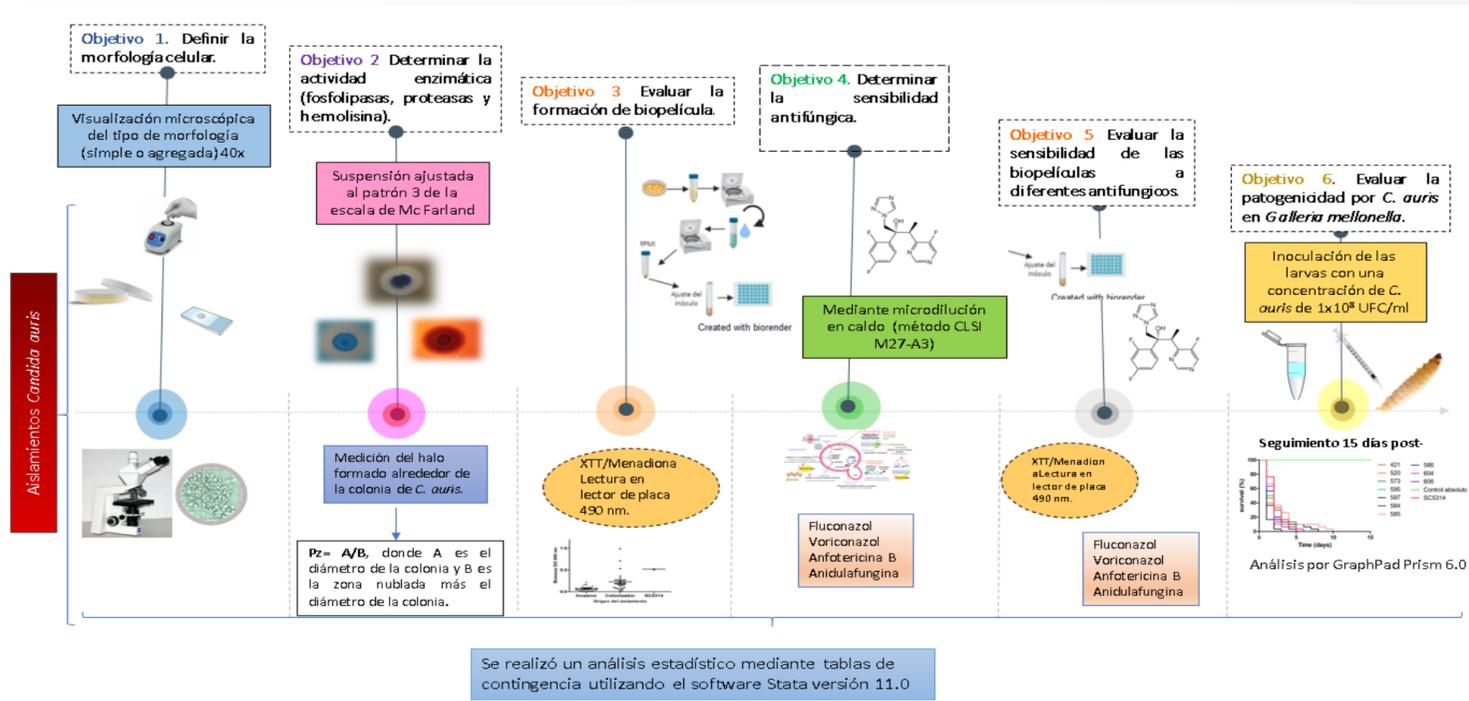


Figura 10. Patogenicidad de aislamientos de *C. Auris* provenientes de origen tanto invasivo como colonizado en el modelo invertebrado *G. mellonella*. Figura A y B aislamientos de *C. auris* que mostraron baja virulencia en *G. mellonella* clasificados por (A) origen invasivo, (B) origen colonizado. Figura C y D aislamientos de *C. auris* que mostraron alta virulencia en *G. mellonella* clasificados por (A) origen invasivo; (B) origen colonizado.

Metodología desarrollada



Conclusiones

- ❖ La asociación entre agregación con colonización de los aislamientos provenientes de Cartagena podría explicar que las células en grupos grandes permiten persistir en diferentes superficies.
- ❖ Todos los aislamientos tanto de Cartagena como de Valledupar expresaron actividad proteolítica, principal factor que facilita la colonización e invasión de tejidos en el hospedero.
- ❖ Se observó que los aislamientos de este estudio no son muy buenos formadores de biopelículas y solo el 3,21% (3/107) presentó biomasa comparable con *C. albicans*, levadura formadora de biopelículas; este porcentaje correspondió a aislamientos de origen colonizador y de procedencia Valledupar. Sin embargo, se observó que estas biopelículas pequeñas pueden ser resistentes a algunos antifúngicos, lo que podría permitirles sobrevivir en diferentes ambientes.
- ❖ Aunque *C. auris* es comúnmente conocida por su resistencia a múltiples fármacos, la mayoría de nuestros aislamientos provenientes de Cartagena presentaron sensibilidad a los cuatro antifúngicos. No obstante, los aislamientos provenientes de Valledupar y de origen invasivo presentaron mayores perfiles de resistencia principalmente asociados a fluconazol con un 61,3% (19/31).
- ❖ La infección por *C. auris* en *G. mellonella* muestra alta patogenicidad, similar a la cepa referencia *C. albicans*, lo que indica que *C. auris* puede llevar a ser igual de virulenta a *C. albicans*.