

INFECTION BY *CANDIDA PARAPSILOSIS*
MULTIFACTORIAL ANALYSIS OF AN EMERGING MEDICAL PROBLEM

ANA PINTO E SILVA

2012

SUMÁRIO

As espécies do género *Candida* representam uma importante causa de infeções nosocomiais. A espécie *Candida parapsilosis* é atualmente o segundo isolado mais frequente de hemoculturas na Europa e tem sido descrita como sendo responsável por uma grande variedade de manifestações clínicas, que ocorrem geralmente em indivíduos imunocomprometidos.

A espécie *C. parapsilosis* representava anteriormente um complexo de três grupos geneticamente distintos (grupo I, II e III). Atualmente, estes grupos foram renomeados espécies distintas: *C. parapsilosis sensu stricto*, *C. orthopsilosis*, e *C. metapsilosis*.

Apesar de ser considerada um membro da população microbiana endógena em indivíduos saudáveis, *C. parapsilosis* é também isolada de diferentes fontes ambientais e das mãos do pessoal prestador de cuidados de saúde, sugerindo assim outras vias de transmissão nosocomial.

Esta espécie apresenta várias características biológicas, algumas relacionadas com a sua virulência. *C. parapsilosis* forma biofilmes em dispositivos médicos implantados, o que aumenta a sua adesão a tais equipamentos, produz enzimas extracelulares, expressa diferentes fenótipos e é capaz de proliferar na presença de concentrações elevadas de glucose e lipídios.

De um modo geral, as estirpes de *C. parapsilosis* têm sido descritas como sendo suscetíveis aos antifúngicos; contudo, estirpes resistentes têm sido descritas, em particular aos azoles e às equinocandinas. Poucos estudos de vigilância da atividade destes agentes sobre isolados de hemoculturas de *C. parapsilosis* têm sido conduzidos e os mecanismos de resistência aos antifúngicos são ainda desconhecidos. Acresce ainda que há pouca informação disponível acerca da eficácia de desinfetantes e antisépticos assim como de agentes físicos como radiação U.V. e micro-ondas, de uso corrente nos hospitais, sobre este patógeno.

Procedemos ao estudo de isolados de *C. parapsilosis* de doentes admitidos num hospital universitário Português e isolados ambientais do mesmo hospital. Descrevemos a incidência e a distribuição de *C. parapsilosis sensu stricto*, *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis* entre os 175 isolados clínicos e ambientais previamente identificados como *C. parapsilosis* por métodos convencionais. Adicionalmente, avaliamos a suscetibilidade *in vitro* dos isolados ao fluconazole, voriconazole, posaconazole, anfotericina B, caspofungina e anidulafungina. Dos 175 isolados estudados, 160 (91.4%) foram identificados como *C. parapsilosis sensu stricto*, 4 (2.3%) como *C. orthopsilosis*, e 5 (2.9%) como *C. metapsilosis*. Seis isolados correspondem a outras espécies de *Candida* que não pertencem ao grupo da *C. parapsilosis*. A avaliação do perfil de suscetibilidade demonstrou que apenas 9 (5.6%) isolados de *C. parapsilosis sensu stricto* eram resistentes ou suscetível-dose dependente ao fluconazole, e apenas um isolado apresentava um fenótipo multi-azolerresistente; 2 (1.3%) isolados de *C. parapsilosis sensu stricto* eram resistentes à anfotericina B. Todos os isolados de *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis* eram

suscetíveis aos azoles e à anfotericina B. Um número elevado de estirpes de *C. parapsilosis* sensu stricto era não-suscetível às equinocandinas.

Com o objetivo de explorar a diversidade genética entre os isolados de *C. parapsilosis* (um total de 160 isolados clínicos e ambientais) obtidos dos doentes e do ambiente hospitalar, duas técnicas moleculares distintas foram aplicadas: *random amplified polymorphic DNA analysis* e *mitochondrial DNA restriction endonuclease analysis*. Os resultados obtidos vão de encontro a outros estudos que referem que a diversidade genética para *C. parapsilosis* é mínima, tendo sido encontrado um perfil maioritário.

No sentido de caracterizar o desenvolvimento da resistência antifúngica em *C. parapsilosis*, 4 estirpes clínicas suscetíveis e uma estirpe da *American Type Culture Collection* foram cultivadas repetidamente na presença de fluconazole, voriconazole e posaconazole em diferentes concentrações. Os isolados desenvolveram diferentes graus de resistência aos azoles de acordo com o antifúngico utilizado. O fluconazole foi o indutor mais rápido e o posaconazole foi o mais lento. O fluconazole e o voriconazole induzem resistência a eles próprios e um ao outro, mas não ao posaconazole. O posaconazole induz resistência a todos os azoles. A resistência desenvolvida é estável; esse facto foi confirmado após cultivo em meio sem antifúngico. Os isolados resistentes aos azoles revelaram uma população homogênea. O efeito dos bloqueadores das bombas de efluxo (verapamil e ibuprofeno) é mínimo na resistência após avaliação por microdiluição e citometria de fluxo.

Relativamente à classe de antifúngicos equinocandinas, a indução da resistência foi igualmente realizada com uma estirpe clínica de *C. parapsilosis* com a anidulafungina. A resistência desenvolvida é estável e não está associada a mutações na região *HS1* do gene *FKS1*. A associação a níveis elevados de quitina na parede celular não está confirmada.

Para esclarecer os mecanismos moleculares de resistência aos azoles, hipotéticas alterações no perfil de expressão de genes da *C. parapsilosis* associadas à aquisição experimental de resistência aos azoles foram analisadas. As estirpes resistentes obtidas após exposição do fluconazole e do voriconazole demonstraram um aumento de expressão do fator de transcrição *MRR1*, do transportador *MDR1*, e de diversas redutases e oxidoredutases. Curiosamente, e semelhante ao que está descrito para *C. albicans*, a sobreexpressão de *MRR1* e de *MDR1* está relacionada com mutações pontuais no gene *MRR1* nas estirpes resistentes. A estirpe resistente obtida após exposição ao posaconazole tem a expressão de dois fatores de transcrição (*UPC2* e *NDT80*) e de 13 genes envolvidos na biossíntese do ergosterol aumentada. Este estudo é o primeiro que aborda a base molecular dos mecanismos de resistência aos azoles

em *C. parapsilosis*; os resultados sugerem que de modo semelhante a *C. albicans*, a tolerância aos azoles envolve a ativação de bombas de efluxo e/ou o aumento da síntese do ergosterol.

Na tentativa de estabelecer um paralelismo entre a indução de resistência *in vitro* e *in vivo*, três doentes com infecções sistêmicas por *C. parapsilosis* tratadas com fluconazole foram acompanhados; os isolados foram recolhidos antes, durante e/ou após tratamento. O teste de suscetibilidade aos antifúngicos demonstrou um aumento na concentração mínima inibitória de vários azoles para os isolados obtidos após tratamento com fluconazole. A tipagem molecular dos isolados demonstrou que os isolados pós-tratamento com reduzida suscetibilidade eram geneticamente idênticos aos isolados pré-tratamento suscetíveis, sugerindo a aquisição *in vivo* da resistência aos azoles. Os fenótipos de suscetibilidade apresentados pelos isolados eram estáveis *in vitro*. O papel do efluxo ativo dos antifúngicos na resistência foi avaliado por citometria de fluxo; a marcação nos isolados pós-tratamento e nos isolados pré-tratamento é semelhante. Uma análise mais profunda nas alterações a nível de expressão de genes foi realizada recorrendo a tecnologia de *microarrays*. Verificou-se que a expressão de genes envolvidos no metabolismo lipídico estava aumentada.

O potencial de diferentes agentes físicos (aquecimento a 60°C, micro-ondas e radiação UV) e agentes químicos (clorhexidina, etanol, hipoclorito de sódio, peróxido de hidrogénio, permanganato de potássio e ácido bórico) de uso corrente para inativar *C. parapsilosis* foi avaliado. Para os agentes químicos, a atividade antifúngica foi determinada recorrendo ao método da microdiluição e a ensaios do *time-kill*. Relativamente aos agentes físicos, a cinética de sobrevivência das células durante o tratamento foi determinada. Adicionalmente, a ocorrência de lesão de membrana provocada por cada tratamento foi avaliada por citometria de fluxo com iodeto de propídeo. As concentrações 0.06% de clorhexidina, 10% de etanol, 2.5% de hipoclorito de sódio, 0.06% de peróxido de hidrogénio, 0.1% de permanganato de potássio e 1% de ácido bórico são capazes de matar todas as células das estirpes de *C. parapsilosis* estudadas. Relativamente aos agentes físicos, após aquecimento a 60°C durante 5 min, radiação micro-ondas durante 60 s e radiação UV durante 10 min, foi confirmada uma redução de pelo menos 3 *log* no crescimento de *C. parapsilosis*. A marcação com iodeto de propídeo demonstrou que o aquecimento a 60°C e a radiação micro-ondas, assim como o peróxido de hidrogénio provocam lesões primárias graves na membrana. Adicionalmente, estudamos a atividade antimicrobiana de um novo sistema de desinfecção hospitalar; envolvendo a produção de um aerossol de peróxido de hidrogénio com catiões de prata. A atividade *in vitro* sobre suspensões de bactérias, leveduras e fungos filamentosos foi avaliada. A citometria de fluxo foi utilizada para confirmar a lesão de membrana das células microbianas após exposição ao desinfetante. Uma redução no

crescimento de pelo menos 5 *log* foi observada *in vitro* com todos os micro-organismos testados, sendo a solução desinfetante bastante ativa mesmo em baixa concentração. A citometria de fluxo evidenciou a ocorrência de lesão primária de membrana.

Com o objetivo de estudar a relação entre a resistência aos antifúngicos e os atributos de virulência, comparamos, pela primeira vez, o perfil de expressão de genes da estirpe resistente com a estirpe suscetível de *C. parapsilosis* através da análise de *microarrays*. Alguns grupos especiais de genes relacionados com patogenicidade estavam sobreexpressos na estirpe resistente: filamentação, metabolismo de lípidos, formação de hifas, patogênese, resposta ao *stress*, interação com o hospedeiro, gemulação, adesão celular, formação de biofilme e catabolismo de proteínas. Diversos estudos fenotípicos foram realizados, nomeadamente avaliação da capacidade de adesão, diversidade fenotípica, capacidade de crescimento, desenvolvimento de pseudohifas e expressão da catalase, cujos resultados corroboram os achados anteriores.

O conteúdo em quitina da parede celular (considerado atributo de virulência) dos isolados clínicos de *C. parapsilosis* com diferentes perfis de suscetibilidade às equinocandinas foi avaliado por microscopia de epifluorescência e por citometria de fluxo. Apesar do papel conhecido da quitina na tolerância aos antifúngicos, nenhuma relação entre o conteúdo em quitina e a resistência aos antifúngicos foi estabelecida; todavia parece existir uma possível relação com o efeito de crescimento paradoxal na presença de caspofungina. A citometria de fluxo representou uma eficiente e rápida abordagem para quantificar o conteúdo em quitina das células leveduriformes; através da marcação com *calcofluor white* desenvolvemos um protocolo citométrico que avalia o conteúdo em quitina das leveduras.

Esforços consideráveis são ainda necessários para elucidar acerca das fontes de *C. parapsilosis* no ambiente hospitalar, a relação entre isolados clínicos e ambientais, seus atributos de virulência e perfil de suscetibilidade, no sentido de reduzir a morbidade e mortalidade e os custos inerentes.

Em suma, realizamos um estudo compreensivo acerca da gênese da infeção sistémica por *C. parapsilosis*, uma espécie frequentemente isolada entre isolados clínicos hospitalares, nomeadamente no Hospital de S. João, um grande hospital universitário do Norte do país.

ABSTRACT

ABSTRACT

Candida species play a relevant role as agents of nosocomial infections. *Candida parapsilosis* is nowadays the second most common isolate from blood cultures in Europe and has been reported to be responsible for a broad variety of clinical manifestations that generally occur in individuals with impaired immunity.

C. parapsilosis was previously made up of a complex of three genetically distinct groups (groups I, II, and III). Recently, the *C. parapsilosis* groups have been renamed as distinct species: *C. parapsilosis sensu stricto*, *C. orthopsilosis*, and *C. metapsilosis*.

Although being sometimes considered a member of the indigenous flora in healthy individuals, *C. parapsilosis* has also been isolated from different environmental sources and from the hands of health care workers, thus suggesting potential routes for nosocomial transmission.

This species displays many interesting biological characteristics, some of them presumed to be related to its virulence. *C. parapsilosis* tends to form biofilms on implanted medical devices, is capable of slime production and adhesion to indwelling devices, production of extracellular enzymes, expression of phenotype switching; it is also able to proliferate in the presence of high glucose and lipids concentration.

Overall *C. parapsilosis* has been described to be susceptible to antifungal drugs, however resistant strains have been reported, in particular to azoles and echinocandins. Few prospective surveillance studies regarding the activity of these agents against *C. parapsilosis* bloodstream isolates are available and the antifungal resistance mechanisms expressed by *C. parapsilosis* are not yet described. Additionally, there is very limited information about the effectiveness of disinfectants and antiseptics as well as physical agents, e.g. U.V. and microwave radiation, current used in hospital, against this pathogen.

We studied *C. parapsilosis* isolates from patients admitted at a Portuguese university hospital and environmental isolates isolated from the same hospital. The incidence and distribution of *C. parapsilosis sensu stricto*, *C. orthopsilosis*, and *C. metapsilosis* among 175 clinical and environmental isolates previously identified by conventional methods as *C. parapsilosis* were established. Furthermore, the *in vitro* susceptibility patterns to fluconazole, voriconazole, posaconazole, amphotericin B, caspofungin and anidulafungin were assessed. Of the 175 isolates tested, 160 (91.4%) were identified as *C. parapsilosis sensu stricto*, 4 (2.3%) as *C. orthopsilosis*, and 5 (2.9%) as *C. metapsilosis*. Six isolates corresponded to *Candida* species other than the *C. parapsilosis* group. The susceptibility profile showed that only nine (5.6%) *C. parapsilosis sensu stricto* strains were resistant or susceptible-dose dependent to fluconazole, while a single strain displayed a multi-azole-resistant phenotype; two (1.3%) *C. parapsilosis sensu stricto* strains were amphotericin B resistant. All *C.*

orthopsilosis and *C. metapsilosis* isolates were susceptible to azoles and amphotericin B. A high number of *C. parapsilosis* sensu stricto strains were nonsusceptible to the echinocandins.

In order to assess about genetic diversity among *C. parapsilosis* isolates recovered from patients and hospital environment (a total of 160 isolates) two different molecular techniques were applied: random amplified polymorphic DNA and mitochondrial DNA restriction endonuclease analysis. Our results corroborate previous studies that showed that the genetic diversity for *C. parapsilosis* is scarce, being one genetic profile dominant.

In order to characterize the development of antifungal resistance by *C. parapsilosis*, four azole-susceptible clinical strains and one type strain from the American Type Culture Collection were repeatedly cultured in the presence of fluconazole, voriconazole and posaconazole at different concentrations. The isolates developed variable degree of azole resistance according to the antifungal used. Fluconazole was the fastest inducer while posaconazole was the slowest. Fluconazole and voriconazole induced resistance to themselves and each other, but not to posaconazole. Posaconazole induced resistance to all three azoles. Developed resistance was stable; it could be confirmed after repeated subcultured in drug-free medium. Azole-resistant isolates revealed a homogeneous population structure; the role of azole transporter efflux pumps (ATP-dependent) was minor after evaluation by microdilution and flow cytometric assays with efflux pump blockers (verapamil and ibuprofen).

Regarding the echinocandin antifungal class, induction of resistance was also performed with one clinical *C. parapsilosis* strain incubated with anidulafungin. The developed resistance was stable and was not associated with mutation in the HS1 region of the *FKS1* gene. The correlation with high chitin level was not confirmed.

To highlight the molecular azole resistance mechanisms, the changes in gene expression profile of *C. parapsilosis* associated with the acquisition of experimentally-induced resistance to azole antifungal drugs were also described. The resistant strains obtained after exposure to fluconazole and to voriconazole displayed increased expression of the transcription factor *MRR1*, of the major facilitator transporter *MDR1*, and of several reductases and oxidoreductases. Interestingly, and similarly to what has been described in *C. albicans*, up-regulation of the *MRR1* and *MDR1* correlated with point mutations in *MRR1* in the resistant strains. The resistant strain obtained after exposure to posaconazole displayed up-regulation of two transcription factors (*UPC2* and *NDT80*) and increased expression of 13 genes involved in ergosterol biosynthesis. This was the first study addressing global molecular mechanisms underlying azole resistance by *C. parapsilosis*; the results suggest that similarly to *C. albicans*, tolerance to azoles involves the activation of efflux pumps and/or increased ergosterol synthesis.

In an attempt to compare *in vitro* and *in vivo* induction of resistance, isolates from three patients with *C. parapsilosis* fungaemia were serially recovered before, during and/or after treatment with fluconazole. A microbiological study was performed to characterize these isolates. *In vitro* antifungal susceptibility testing showed the increase for several azoles of the minimal inhibitory concentration values in isolates recovered after fluconazole treatment. Molecular typing of isolates showed that the post-treatment isolates with reduced susceptibility were identical to susceptible pre-treatment isolates, confirming the *in vivo* acquisition of azole resistance. The susceptibility phenotypes displayed by isolates were confirmed to be stable *in vitro*. The role of active efflux of drugs in resistance was evaluated by flow cytometry; the staining profiles in post-treatment isolates and pre-treatment isolates were similar. A deep analysis into genomic changes by microarray technology showed that the expression of genes involved in lipid metabolism process was increased among the resistant isolate.

The potential of different physical (heating at 60°C, microwave and ultraviolet irradiation) and chemicals agents (chlorhexidine, ethanol, sodium hypochlorite, hydrogen peroxide, potassium permanganate and acid boric) to inactivate *C. parapsilosis* was determined. For chemical agents the antifungal activity was determined using the microdilution method and a time-kill assay. Regarding physical agents, the kinetics of survival of the cells during treatment were assessed. Additionally, the membrane lesion provoked by each treatment was evaluated using a flow cytometric assay with propidium iodide. Concentrations of 0.06% of chlorhexidine, 10% of ethanol, 2.5% of sodium hypochlorite, 0.06% of hydrogen peroxide, 0.1% of potassium permanganate and 1% of acid boric were able to kill all *C. parapsilosis*. Regarding physical agents, after heating at 60°C for 5 min, microwave irradiation after 60 s and ultraviolet irradiation for 10 min, a reduction of at least 3 *log* in *C. parapsilosis* growth was achieved. Propidium iodide staining demonstrated that heating at 60°C, microwave irradiation and hydrogen peroxide causes serious primary membrane lesions. We also report on the antimicrobial activity of a new disinfection system: aerosolized hydrogen peroxide in combination with silver cations dry-mist. The *in vitro* activity against suspensions of pathogenic bacteria, yeasts and moulds was assessed. Additionally, flow cytometry was used to confirm membrane lesion of microbial cells following exposure to the disinfectant. A growth reduction of at least 5 *log* was observed *in vitro* with all tested microorganisms, the disinfectant solution being highly active even at very low concentration; flow cytometry evidenced cell membrane lesion.

In order to study the correlation between drug resistance and pathogenicity attributes, we compared, for the first time, large-scale gene expression profile between susceptible and

resistant strains using microarray analysis. Some particular groups of genes usually correlated with pathogenicity were found to be differentially expressed in the resistant strain: filamentous growth, lipid metabolic process, hyphal growth, pathogenesis, response to stress, interaction with host, pseudohyphal growth, cell budding, cell adhesion, biofilm formation and protein catabolic process. Several phenotypic studies, namely adherence ability, phenotype diversity, growth capacity, pseudohyphal development and catalase expression, corroborated such results.

Cell wall chitin content, considered a virulence attribute, of *C. parapsilosis* clinical isolates with different echinocandin susceptibility profiles was evaluated by epifluorescence microscopy and flow cytometry. Despite the chitin role in drug tolerance, no relation between the chitin amount and antifungal resistance was established; although a possible relation with paradoxical growth effect of echinocandins could be established. Flow cytometry represents an efficient and fast approach in analysis of cell phenotypes; using calcofluor white staining, we developed a flow cytometric assay to quantitatively measure chitin content in yeasts.

Considerable efforts are needed to provide elucidation regarding the sources of *C. parapsilosis* in the hospital milieu, the relation between environmental isolates and the clinical isolates, its virulence attributes and its respective antifungal susceptibility profile, in order to reduce morbidity and mortality in a cost-effective manner.

Herein we performed a comprehensive evaluation of many of such topics involved in the genesis of bloodstream infection by *C. parapsilosis*, which is a common isolate in hospitals in Portugal, namely in S. João Hospital, a large University Hospital in the North of country.