

CONSIDERAȚII PRIVIND REZISTENȚA LA ANTIFUNGICE A TULPINILOR PATOGENE DE CANDIDA ALBICANS

ALINA MUȘETESCU*, **, SIMONA ROXANA GEORGESCU*, C. ILIE**,
LUCREȚIA DULGHERU*, L. CHIȚIMIA**, M. E. COJOACĂ**, DOINA LUPU*

București

Rezumat

Ne confruntăm cu din ce în ce mai multe cazuri de rezistență la antifungice a tulpinilor patogene de *Candida albicans*. Lucrarea include o menționare succintă a aspectelor generale morfologice și clinice ale tulpinilor de *Candida albicans*, urmând apoi o prezentare sintetică a antifungicelor celor mai utilizate în candidoze, a mecanismelor celulare și moleculare care determină rezistența diverselor clase de antifungice. Tendința evolutivă a rezistenței la antifungice în populații experimentale pe tulpini de *Candida albicans*, precum și strategii pentru prevenirea și combaterea rezistenței sunt de asemenea prezentate.

Cuvinte cheie: *Candida albicans*, rezistența, antifungice

Summary

There are more and more cases of antifungal resistance of *Candida albicans* pathogen strains. The paper includes a succinct drawing of the morphological and clinical aspects of *Candida albicans* strains, followed by a synthetic presentation of the most used antifungal drugs, of the cell and molecular mechanisms which lead to resistance, considering the class they belong to. The evolution of antifungal resistance on experimental *Candida albicans* strain populations and the prevention and fight strategies against the resistance are also depicted.

Key words: *Candida albicans*, resistance, antifungal drugs

DermatoVenerol. (Buc.), 53: 259-276

I. Introducere

Genul *Candida* cuprinde ciuperci levuriforme care se înmulțesc prin înmugurire și formare de blastospori. Acest tip de ciuperci a fost prima dată izolat de Langenbeck în 1839.

Există numeroase specii de *Candida*: *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida pseudotropicalis*, *Candida krusei*, *Candida guilliermondi*, *Candida parapsilopsis*, *Candida stellatoidea*.

Specia *Candida albicans* a fost prima dată izolată de Berckhout în 1923. La om, este un organism comensal al mucoasei bucale, tractului gastro-intestinal, exacerbarea sa cu apariția

manifestărilor clinice de boală fiind favorizată de distrugerea florei microbiene antagoniste în urma tratamentelor îndelungate cu antibiotice cu spectru larg de activitate, tratamentului cu imunosupresoare (ex. corticoterapia) care scad capacitatea de apărare a organismului, dar și în urma stărilor dispeptice și bolilor generale precum diabetul zaharat, alcoolismul, obezitatea, avitaminozele, hemopatiile maligne, bolile hepatice, neoplasmale viscerale, tuberculoza, infecția HIV. Alți factori de risc sunt reprezentați de: prezența unor traumatisme, în special arsuri, malnutriție, intervenții chirurgicale majore la

* Spitalul de Dermato-Venerologie "Prof. Dr. Scarlat Longhin", București.

** Universitatea "Titu Maiorescu" – Facultatea de Medicină.

nivelul abdomenului, contaminarea cu fecale a peritoneului, insuficiența renală acută, ventilația mecanică, catetere venoase sau urinare, hemodializă, diaree (18).

II. Aspecte generale morfologice și clinice

La examenul direct, *Candida albicans* se prezintă în general sub formă de celule levurice sau pseudomicelii. Celulele levurice sunt mici, rotunde sau ovale, de 2-5 μ , cu perete subțire. Pseudomiceliile sunt constituite din blastospori alăturați. Ramurile pseudomiceliilor se formează în grupuri de câte 4-6 la capătul unora dintre celulele care le constituie. Ramurile alcătuiesc o coroană (verticiliu), fiecare dintre ramuri putând forma noi coroane. Rareori pot apare la examenul direct și filamente miceliene veritabile.

Mediul de cultură specific este mediul Sabouraud cu cloramfenicol, cultura dezvoltându-se în 24-48 de ore la 30°C. În practica medicală, se chemă bolnavii pentru rezultat după 48 de ore. Coloniile de *Candida* sunt rotunde, mici, de culoare crem sau crem-galbuie, reliefate, convexe, umede, lucioase, de consistență cremoasă ca untul, neaderente de mediu. Aspectul microscopic al culturilor este variat. Astfel, se pot observa:

- celule levurice (blastospori), cu un diametru de 2-4 μ , rotunde sau ovalare, multe în curs de înmugurire;
- filamente, filamentarea fiind caracteristică pentru *Candida*;
- clamidospori, care apar numai la *Candida albicans* - celule sferice de 20 - 22 μ în diametru, refringente, cu dublu contur, ce se găsesc la extremitatea unor ramuri pseudomiceliene (6).

Există o multitudine de candidoze cutaneo-mucoase. Ele pot fi clasificate după sediu și aspectul clinic astfel:

- candidoze ale mucoasei bucale: muguetul, glosita candidozică, stomatita candidozică, perlesul candidozic;
- candidoze cutanate: intertrigoul candidozic, perionixisul și onixisul candidozic;
- candidoze ale mucoasei genitale: balanopostita candidozică și vulvovaginita candidozică;

- candidoza muco-cutanată cronică: candidoza muco-cutanată cronică a adultului, granulomul candidozic;
- candidoze sistemice: pulmonară, intestinală, urogenitală și septicemia candidozică (11).

Datele din literatura arată că candidoza invazivă nosocomială apare mai ales la pacienții cu boli maligne, în timp ce candidoza orofaringiană este comună la pacienții cu SIDA. În cazul pacienților cu cancer, infecțiile cu *Candida* spp., în special cu *Candida albicans* sunt printre cele mai frecvente cauze de morbiditate (15- 70%). (5) Dar, ca frecvență, diabetul zaharat este boala de fond care ocupă primul loc în favorizarea instalării unei candidoze cutaneo-mucoase, aceste manifestări fiind adesea un indicator al unui diabet zaharat nedignosticat.

III. Antifungice utilizate în candidoze - aspecte generale

În general, când se indică un tratament oral cu antifungic, trebuie să ținem seama de următoarele aspecte: eficacitatea, profilul farmacologic, dozele, siguranța, reacțiile adverse, interacțiunile medicamentoase și contraindicațiile, costul și complianța.

Eficacitatea și siguranța medicamentelor antifungice depind de: spectrul de activitate, modul lor de acțiune, concentrația minimă fungicidă, concentrația minimă inhibitorie.

Un rol important îl are și absorbția la nivelul intestinului subțire, care poate fi inhibată în prezența altui medicament (ex. ketoconazol și antiacide) sau factori serici. Concentrația poate să fie redusă semnificativ dacă antifungicul este rapid metabolizat sau preluat de țesutul adipos. În cazul micozelor de la nivelul tegumentelor, ajuns în circulație, antifungicul este eliberat către tegument prin mai multe mecanisme (12):

- concentrarea și secreția în sudoare;
- concentrarea și secreția în sebum;
- difuziunea pasivă prin membrana dermo-epidermică;
- depozitarea și concentrarea în celulele dermului și în stratul bazal al epidermului; migrarea în timpul turn-over-ului normal al keratinocitelor.

Cu excepția 5-flucitozinei, majoritatea antifungicelor actuale au drept țintă ergosterolul, component esențial al peretelui celular fungic, analog al colesterolului de la mamifere.

Dintre clasele de antifungice folosite în terapie, de menționat ar fi următoarele:

Polienele

Amfotericina B este principalul antifungic polienic în cazul candidozelor sistemice. Efectul său este fungicid. Amfotericina B formează canale la nivelul peretelui și membranei celulare a fungului, determinând efluxul ionilor de potasiu și a altor componente celulare, ducând la o afectare ireversibilă a echilibrului ionic al celulei. Amfotericina B are afinitate crescută pentru ergosterol și mult mai mică pentru colesterol. S-a considerat că amfotericina B ar determina stres oxidativ la nivelul celulelor antifungice, dar s-a demonstrat că în realitate efectul ei este antioxidant. (38)

Azoli (fluconazolul, itraconazolul și ketoconazolul)

Sunt folosiți cu succes în majoritatea infecțiilor fungice, deci și în cazul candidozelor.

Fluconazolul este un bi-triazol, fungistatic, cu două grupe triazol, fiecare conținând 3 atomi nitrogen. Atomii fluorinați în pozițiile 2 și 4 ale inelului fenil contribuie la lipofilia scăzută a fluconazolului și determină rezistența la metabolizare, specificitate crescută și potența mai înaltă în comparație cu alți agenți antifungici. Fluconazolul are un volum de distribuție în organism similar cu acela al apei. Concentrația serică este proporțională cu doza. (4) El acționează prin inhibarea 14alfa dimetilazei, enzimă care convertește lanosterolul în dimetillanosterol, inhibând astfel formarea ergosterolului, component esențial al membranei fungice, care asigură integritatea și creșterea fungilor (15). Inhibarea enzimei are drept rezultat depleția ergosterolului și acumularea în celulă a sterolilor 14 α metilați. Acest mecanism are drept rezultat stoparea creșterii celulare și nu moartea celulară, azolii având efect fungistatic (23). Fluconazolul se elimina mai lent din piele decât din plasma, explicându-se astfel eficacitatea terapeutică prelungită, chiar și după încetarea tratamentului.

Deoarece eliminarea medicamentului este în primul rând pe cale renală, este necesară ajustarea dozelor în caz de insuficiență renală (10). Fluconazolul este considerat cel mai eficient împotriva tulpinilor de *Candida albicans*, datorită lipsei efectelor adverse grave și modului flexibil de administrare atât în forma orală cât și intravenoasă.

O tulpină de candida este considerată rezistentă la fluconazol dacă un organism izolat în timpul terapiei arată o creștere semnificativă a concentrației minime inhibitorii pentru fluconazol comparativ cu nivelul determinat anterior sau la începutul terapiei. Valori mai mari de 64 $\mu\text{g/ml}$ ale CMI sunt corelate cu apariția rezistenței.

Itraconazolul este un agent antifungic triazolic, fungistatic in vitro. El împiedică sinteza ergosterolului în celula fungică prin blocarea enzimei lanosterol C14 alpha demetilaza dependentă de citocromul P450. Astfel, are loc scăderea ergosterolului și creșterea lanosterolului pe membrana celulei fungice, determinând alterarea permeabilității și funcției acesteia. Este greu solubil în apă, dar biodisponibilitatea crește dacă este administrat cu grăsimi sau după o masă principală. Deoarece este lipofilic, se găsește în concentrație foarte mare în grăsimi, vagin, tegument, unghii. Concentrația la nivelul tegumentului este de 3-10 ori mai mare decât cea plasmatică, iar o concentrație utilă poate persista în tegument până la 4 săptămâni de la încetarea tratamentului, în timp ce nivelele plasmatice devin nedetectabile în 7 zile de la încetarea tratamentului (13). Nu este necesar a se ajusta dozele în caz de insuficiența renală sau hepatică.

În cazul administrării sale pe cale orală nivelele variabile de absorbție duc adesea la concentrații plasmatice suboptimale, iar o formă intravenoasă nu este încă disponibilă.

Ketoconazolul este primul antifungic cu spectru larg din grupul azolilor, disponibil pentru administrare orală din 1980. Este în principal fungistatic. Inhibă lanosterol 14 demetilaza din citocromul P450 și consecutiv conversia lanosterolului în ergosterol (20). Are loc acumularea sterolilor C14 cu depleția membranală de ergosterol. În interiorul celulei fungice se petrece o inhibiție a sintezei de trigliceride și fosfolipide. Sinteza de chitină este de asemenea inhibată.

Permeabilitatea și sinteza membranei sunt afectate. Este bine absorbit în prezența acidității normale gastrice și în timpul unei mese bogate în grăsimi. El suferă o transformare de prim pasaj hepatic cu ruperea inelelor imidazolic și piperazimic (8). Nu este necesară ajustarea dozelor la pacienții cu insuficiență renală, deoarece medicamentul este metabolizat rapid și eliminat prin excreție biliară. Are dezavantajul unui potențial crescut de hepatotoxicitate.

Alilaminele (terbinafina)

Terbinafina are un mecanism de acțiune diferit de cel al azolilor. Blochează sinteza ergosterolului prin inhibiția squalen – epoxidazei fungice, enzimă care nu aparține familiei citocromului P450. Această inhibiție duce la acumularea intracelulară a unor cantități mari de squalen și scăderea sintezei ergosterolului. Efectul fungicid al terbinafinei s-ar datora mai degrabă acumulării de squalen decât scăderii sintezei ergosterolului. Terbinafina este bine absorbită după administrarea orală, atinge peak-ul plasmatic în aproximativ 2 ore și are o biodisponibilitate de 70-80%, indiferent dacă administrarea se face pe stomacul gol sau postprandial (10). Este foarte lipofilică și keratofilică (16). Se leagă puternic de proteinele plasmatică și numai în proporție de circa 8% în globulele roșii (17). Deși reacțiile hepatice sunt rare, este necesară monitorizarea funcțiilor hepatice și a parametrilor hematopoietici.

Morolfinele (amorolfina) inhibă două enzime din calea de biosinteză a ergosterolului, C-14 sterol reductaza și C-8 sterol izomeraza.

5-flucitozina

Are un mecanism diferit de celelalte antifungice. Aceasta este preluată în celulă și transformată în 5 fluorouracil care poate trece în 5-fluoro-dUMP (uracilmonofosfat), inhibitor specific al timidilat sintetazei, esențială pentru sinteza ADN. (18, 38)

Echinocandinele (caspofungin și micafungin)

Reprezintă o nouă clasă de medicamente antifungice. Acestea inhibă sinteza 1,3- beta- D-

glucanului, o componentă esențială a peretelui celular fungic, prin inhibarea enzimei 1, 3-beta-D-glucan sintetaza, o enzimă complexă care formează polimeri ai glicanului în peretele celular și este absentă în celulele de mamifere. Inhibiția este eficientă și specifică, o expunere scurtă ducând la moartea celulară. Excelenta activitate in vitro a echinocandinelor demonstrată pe tulpinile de *Candida albicans* rezistente la fluconazol, demonstrează că echinocandinele sunt foarte promițătoare ca agenți antifungici noi. Modul lor unic de acțiune caracterizat de specificitatea marcată asupra pereților celulari fungici duce la o toxicitate minimă la nivelul celulelor de mamifere. (21)

În tabelul I sunt prezentați agenții antifungici: activitate, mod de acțiune, mecanisme de rezistență împotriva lor:

IV. Factori generali care determină rezistența la antifungice

Primele cazuri de rezistență la antifungice în cazul *Candida albicans* au fost identificate la pacienți cu defecte imunitare congenitale (1980) predispuși la candidoze mucocutanate cronice: pacienții primeau inițial azoli locali (clotrimazol, miconazol), apoi pe cale orală ketoconazol și fluconazol în doze din ce în ce mai mari pe măsură ce boala progresează. Această administrare de lungă durată avea drept efect creșterea numărului de recurențe. Actualmente, majoritatea cazurilor de rezistență sunt asociate cu tratamentul candidozelor orofaringiene la pacienții cu SIDA, deși s-a constatat că rezistența apare în mai puțin de 10% dintre cazuri; adevărata cauză a acestui fenomen biologic nu este de fapt elucidată (10, 18)

Din punct de vedere clinic, rezistența poate fi definită ca persistența sau progresia unei infecții în ciuda terapiei administrate (38). Rezistența la un anumit antifungic este un proces complex care implică mai mulți factori:

Factori dependenți de microorganism

Aceștia sunt de două tipuri: factori celulari și factori umorali.

Din categoria factorilor celulari fac parte:
- substituția tulpinilor sensibile de *Candida albicans* cu alte subspecii (*C. krusei*,

Tabelul I

Agent antifungic	Spectru	Mod de acțiune	Mecanism de rezistență
Poliene: Amfotericina B	Activă împotriva Candida spp., C.neoformans și funghi filamentoși	Legarea la ergosterol și destabilizarea funcțiilor membranei celulare	Modificări în calea de biosinteză a ergosteroalului
Analogi pirimidinici: 5-Fluorocitozina	Activă împotriva Candida spp. și Cryptococcus spp. Totuși, rezistența se poate instala rapid în cazul monoterapiei cu 5-FC	Înteruperea biosintezei acizilor nucleici prin formarea unor antimetaboliți pirimidinici (FdUMP)	Descreșterea preluării 5-FC în celulă; descreșterea formării compușilor antimetabolici
Azoli: 1. Fluconazol	Activ împotriva Candida spp. și Cryptococcus spp, mai puțin activ împ. C. glabrata, și inactive asupra C. krusei și fungilor filamentoși	Inhibarea citocrom P450- 14 α lanosterol demetilazei	Modificări prin mutație ale enzimei țintă. Eflux crescut al azolilor din celulă prin reglarea genelor pentru transportorii multidrug. Modificări în calea de sinteză a ergosterolului
2. Itraconazol	Ca fluconazolul, dar active și împotriva fungilor filamentoși	Ca la fluconazol	Ca la fluconazol
3. Voriconazol	Ca fluconazolul, dar activitate crescută împotriva fungilor filamentoși	Ca la fluconazol	Ca la fluconazol
4. Posaconazol	Înrudit cu itraconazolul dar mai activ	Ca la fluconazol	Ca la fluconazol
5. Alilamine: Terbinafina	Activitate slabă împotriva C. spp, mult mai activ asupra dermatofitelor	Inhibarea epoxidazei scualenice	Necunoscut
6. Morfoline: Amorolfina	Activitate slabă împotriva Candida spp., mult mai activ împotriva dermatofitelor	Inhibarea sterol Δ 14 reductazei și Δ 20 izomerazei	Necunoscut
Echinocandine: Caspofungina	Activă împotriva Candida spp. cu activitate fungicidă, activitate moderată asupra Aspergillus și slabă asupra C. neoformans	Inhibarea enzimei β -1,3 glucan sintază implicate în sinteza peretelui celular	Necunoscut

(33)

Candida glabrata) sau dezvoltarea în cadrul populației de Candida albicans a unei clone rezistente;

- modificările genetice; exprimări genetice tranzitorii care duc la apariția unor tulpini cu rezistența temporară; modificări la nivelul speciei (microevoluție). În categoria factorilor moleculari ne putem confrunta cu:

- alterări ale expresiei enzimei 14 α sterol demetilaza sau a altor enzime implicate în biosinteza ergosterolului;
- activarea transportorilor la nivelul membranei care împiedică acumularea antifungicului în celulă. (10, 38)

Factori dependenți de gazdă

Este important să se facă o distincție între rezistența microbiologică și factorii specifici

gazdei care pot determina o recurență: gradul de imunosupresie, locul și gravitatea infecției, defecte fiziologice, parametri farmacocinetici, precum absorbția orală scăzută și interacțiuni medicamentoase, etc. (10, 18)

V. Mecanismele celulare prin care tulpinile de *Candida albicans* pot deveni rezistente sunt multiple (38):

*Înlocuirea tulpinilor sensibile de *Candida albicans* cu tulpini rezistente ale altor subspecii (C. krusei sau Candida glabrata).* Acestea pot supraviețui prin comensalism la persoane sănătoase, dar pot deveni o problemă la pacienți cu imunitatea afectată la care s-au administrat perioade lungi antifungice de tip fluconazol contra *Candida albicans*.

*Dezvoltarea unor clone rezistente de *Candida albicans* în populații heterogene*

Dobândirea unei rezistențe secundare la un anumit medicament, ca urmare a perioadelor lungi de expunere la acest antifungic. Mutații genetice au loc cu o frecvență foarte scăzută în populațiile de *Candida albicans*, dar este posibil ca anumite celule să dobândească prin mutație avantajul rezistenței și să se selecteze astfel o tulpină rezistentă.

Exprimare tranzitorie a unor gene care pot determina rezistența temporară a anumitor tulpini, fenomen reversibil când nu mai este prezentă presiunea indusă de medicament.

Modificări ale serotipului celular: *Candida albicans* prezintă două serotipuri, A și B în funcție de markerii carbohidrați de la suprafața membranei. Serotipul B este mai sensibil la azoli, în timp ce A este mai sensibil la 5-flucitozina (17). Între cele două serotipuri există diferențe marcante ale profilurilor biochimice. Serotipul A, susceptibil la 5 FC, prezintă totodată, toleranță mult mai mică decât serotipul B la săruri, este mai puțin rezistent la safranină, iar capacitatea sa de a asimila citratul este mai mică (30).

VI. Mecanisme moleculare prin care tulpinile patogene de *Candida albicans* pot deveni rezistente la azoli

În tabelul II sunt rezumate principalele mecanisme implicate în rezistența la azoli (13):

Supraexprimarea enzimei țintă pentru azoli, 14- α sterol dimetilaza citocrom P-450 dependentă sau lanosterol dimetilaza (P450DM); activitatea antifungică a azolilor constă în inhibarea P450DM, enzima importantă în biosinteza ergosterolului la fungi (spre deosebire de P450DM de la mamifere care catalizează sinteza colesterolului) (18). Au fost identificate izolate clinic tulpini de *Candida albicans* ce prezentau mutații la nivelul genei ERG11 ce codifică enzima, mutația fiind prezentă la amfotericina B pe alele ale genei, enzima nemaifiind astfel inhibată de azoli (29). În cazul mutațiilor erg11/erg 11 homozigote la care enzima devine nefuncțională,

Tabelul II

Mecanism	Cauzat de	Comentarii
Alterarea țintei agentului antifungic (14 α demetilaza) sau supraexprimarea acesteia	Mutații care alterează legarea medicamentului, dar nu și a substratului enzimei; creșterea numărului de copii ale enzimei țintă	În cazul mutațiilor, enzima rămâne activă, dar are o afinitate scăzută pentru azoli; Creșterea numărului de copii determină creșterea producției de ergosterol, acest mecanism fiind implicat în cross-rezistența la fluconazol și itraconazol
Modificări în biosinteza sterolilor	Leziuni la nivelul $\Delta_{5,6}$ desaturazei	Are loc acumularea de 14 α metal fecosterol în loc de ergosterol
Reducerea concentrației intracelulare a antifungicului	1. Supraexprimarea pompelor specifice pentru efluxul medicamentelor (CDR, MDR)	1. Eflux activ, ATP dependent al azolilor din celulă
	2. Modificări în compoziția lipidică și sterică a membranei	2. Diminuarea pătrunderii antifungicelor la nivelul membranei

rezistența la azoli este corelată cu anumite dezavantaje pentru celulele fungice: în primul rând, celulele care prezintă această mutație nu sunt în general capabile să supraviețuiască în condiții aerobe, decât dacă mutația la nivelul Erg 11 este însoțită de o mutație la nivelul genei Erg 3; în al doilea rând, rata de creștere a celulelor care prezintă mutația Erg 11 este mult diminuată, celulele fiind mai puțin competitive *in vitro* și *in vivo* decât cele normale. În general, mutațiile erg 11 + erg 3 sunt rezistente la azoli, dar devin mai susceptibile decât fenotipul sălbatic la inhibitori metabolici (cicloheximida, flufenazina, higromicina B). (34). În ceea ce privește supraexprimarea enzimei 14 α sterol demetilaza, anumite studii au arătat că o creștere de 20 de ori a nivelului acestei enzime determină o creștere de numai 5 ori a nivelului MIC pentru fluconazol. Acest lucru dovedește că mecanismul respectiv nu poate fi singur responsabil de nivelele înalte de rezistență și că probabil sunt antrenate și alte procese.(2)

Mutații la nivelul căii de biosinteză a ergosterolului, prin implicarea altor enzime care să compenseze inhibarea P-450DM. (18) În corelație cu rezistența la azoli, s-au determinat modificări la nivelul unor proteine implicate în biosinteza ergosterolului (ex erg 10, erg 3), precum și a altor tipuri de proteine (Grp2p, Ifd1p, Ifd4p, Ifd5p). S-au identificat, de asemenea, modificări în mecanismele de reglare ("up" și "down") pentru o serie de enzime a căror activitate este legată periferic de sinteza ergosterolului, cum ar fi S-adenozil homocistein-transferaza, aspartat aminotransferaza, sterol C-24 metil transferaza și acetilcoenzima A acetil transaminaza și pentru enzimele implicate în metabolismul carbohidraților. (10, 19) Mutația la nivelul genei Erg3 care codifică enzima 5,6 Δ desaturaza (Erg3p) are ca rezultat apariția rezistenței la tulpinile de *Candida albicans*. La mutanțele la care enzima este modificată devenind nefuncțională, se poate constata depleția ergosterolului și acumularea în celulă a ergosta-7, 22- dienolului (34). Interesant este faptul că aceste mutanțe devin rezistente și față de amfotericina B întrucât ergosterolul este absent în membrana lor celulară. În orice caz, acest tip de rezistență apare rar, sugerând că probabil este corelat cu anumite dezavantaje pentru agentul patogen. (Fig. 1) (33).

Reducerea nivelului de acumulare a medicamentului în celulele de Candida albicans prin creșterea dependentă de energie a efluxului acestuia, pe calea unor transportori de membrană implicați în rezistența "multi-drug". Se pare că pătrunderea azolilor în celulă este un mecanism pasiv, dat fiind faptul că alterări ale peretelui celular constând în modificarea glicozilării proteinelor de suprafață, au ca rezultat modificarea susceptibilității față de azoli. În schimb, efluxul azolilor din celulă este un proces activ, care necesită consum de energie. (33). S-au descris două tipuri de transportori activi:

- un tip codificat de genele *cdr* (*Candida Drug Resistance*) (superfamilia ABC: ATP-Binding Cassette)
- un tip codificat de genele *mdr1* (*Multi Drug Resistance*) (clasa MF: Major Facilitators) (10)

De exemplu, în anumite tulpini izolate clinic s-a identificat supraexprimarea genelor MDR1 și CDR1 care codifică pompe de eflux ATP dependente pentru azoli. Identificarea s-a făcut prin determinarea unei cantități crescute de ARNm pentru proteine din familiile CDR și MDR (CaMDR1, CDR1 și CDR2). (2, 10) Se pare că supraexprimarea transportorilor codificați de genele *mdr* confera rezistența doar la fluconazol, în timp ce supraexprimarea genelor *cdr* confera rezistența încrucișată la toți azolii (5). În anumite studii s-a observat că un rol important în rezistența la fluconazol îl are proteina - transportor CaMDR1 din clasa MF. Deleția genei care codifică această proteină a fost urmată de creșterea susceptibilității față de fluconazol a tulpinilor aflate în studiu (33). În ceea ce privește modificarea sau degradarea agentului antifungic, mecanism important în cazul rezistenței la bacterii, acest aspect este în continuare subiect de studiu. S-a demonstrat, totuși, că azolii sunt inerti la metabolismul fungic.. (15, 38).

Apariția unor fenotipuri mutante rezistente la tratamentul antifungic este rar întâlnită la *Candida albicans*. Spre deosebire de alte subspecii (ex *Candida glabrata*), *Candida albicans* este diploida, fără un stadiu sexual haploid, astfel încât pentru exprimarea unui fenotip mutant este necesară prezenta unor gene alele homozygote. De aceea, *Candida albicans* este mai puțin susceptibilă la mutații ca un

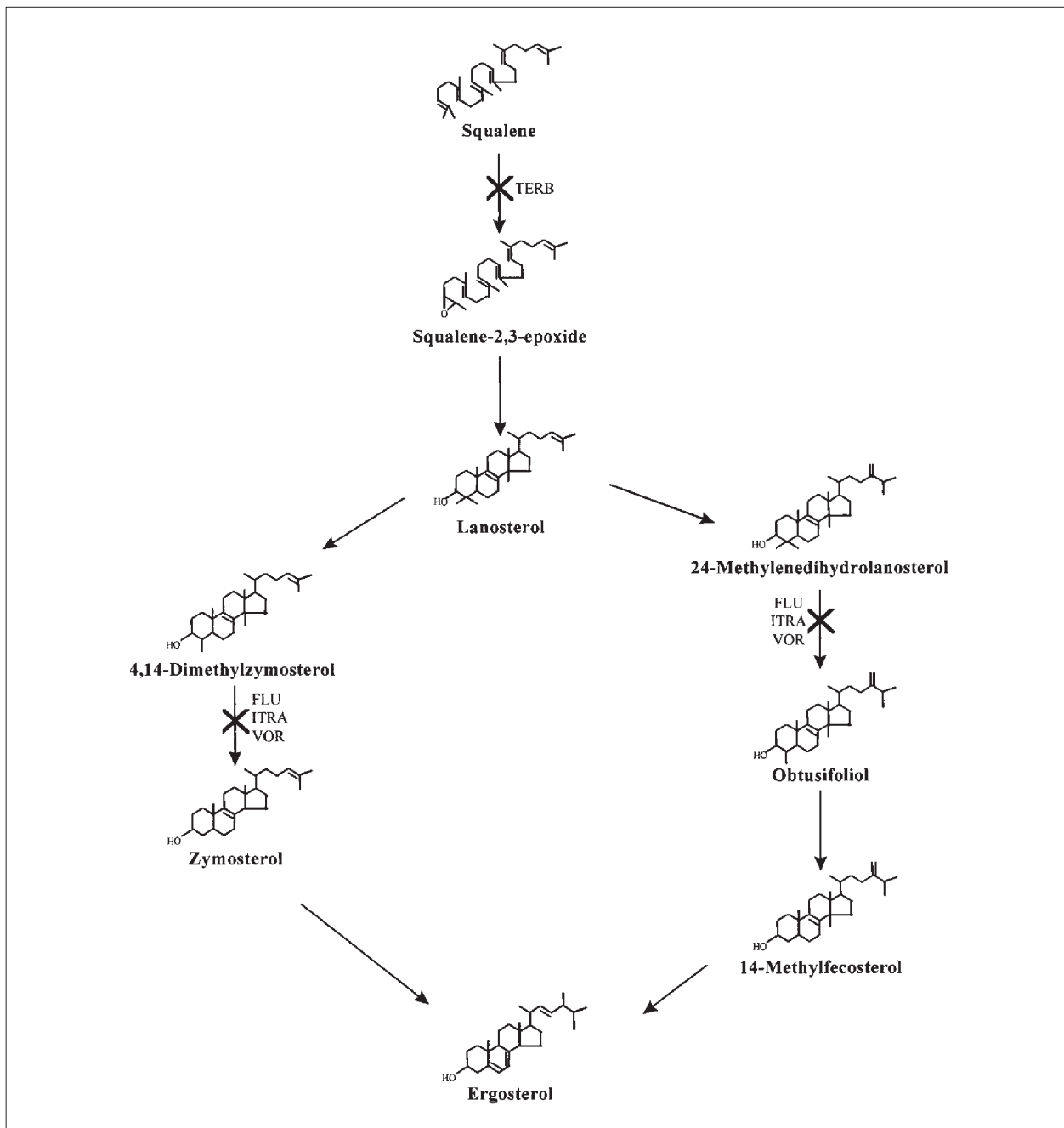


Fig. 1. Calea de sinteză a ergosterolului și punctele la nivelul cărora acționează agenții fungici de tip azol

organism haploid. De asemenea, fungii difera de bacterii în ceea ce privește capacitatea de a transfera material genetic între tulpini, devenind astfel rezistenți. Neavând plasmide și nici capacitatea de transducție, *Candida albicans* nu poate deveni rezistentă prin transfer de material genetic, precum în cazul bacteriilor. (12,18) Totuși,

s-au identificat fenotipuri mutante de tip "mating-type-like" (MTL) - după numele genei omologe de la *Sacharomices cerevisia* - care sunt rezistente atât la fluconazol cât și la flucitozina, antifungic cu un mod de acțiune total diferit de al fluconazolului (15) și al azolilor în general. (29)

Modificări ale fazei lipidice și de asimetrie la nivelul membranei celulare.

S-a sugerat că schimbările statusului lipidic al membranei și/sau ale asimetriei acesteia pot contribui la rezistența față de azoli la *Candida albicans*. Aparent, activitatea MDR1 ar putea fi influențată de statusul lipidic al membranei. (22). Fluiditatea și asimetria membranei sunt influențate de interacțiunile dintre fosfolipide și steroli, acestea influențând implicit și transportul moleculelor prin membrane. Profilele alterate ale fosfolipidelor și acizilor grași ai *C. albicans* afectează permeabilitatea membranei față de azoli determinând apariția rezistenței. S-a arătat că tulpini de *C. albicans* rezistente atât la azoli cât și la AmB prezentau un conținut mai ridicat de lipide decât tulpinile sensibile și totodată un conținut mai scăzut de lipide polare. Paternul sterolic al membranei pare de asemenea să fie corelat cu rezistența. Mutanții la care ergosterolul este înlocuit în membrane cu metilfecosterolul prezintă o rezistență sporită față de antifungice (13).

Studierea anumitor tulpini de *C. albicans* a condus la concluzia că în majoritatea cazurilor nu doar un singur mecanism este implicat în apariția rezistenței. Se pare că nivelele crescute de rezistență sunt corelate cu acțiunea combinată a mecanismelor mai sus menționate, rezistența dovedindu-se un proces multifactorial. S-a arătat că circa 85% dintre izolatele clinice prezentau up-reglarea genelor pentru transportorii activi, iar 65% dintre aceștia prezentau și mutații la nivelul genei Erg11, codificatoare pentru sterol demetilază. (24) Alte studii au demonstrat că la circa 75% dintre izolate rezistența era rezultatul combinării mecanismelor și nu al unui singur mecanism. (33)

Fiecare din aceste mecanisme conferea rezistența încrucisată la diversii agenți antifungici disponibili comercial, dar există diferențe de susceptibilitate de la o tulpină la alta și de la un agent la altul. Astfel, s-au separat tulpini rezistente la fluconazol, ketoconazol, itraconazol și voriconazol care rămăneau sensibile la amfotericina B, precum și tulpini rezistente la ketoconazol și fluconazol, dar sensibile la itraconazol, voriconazol și amfotericina B. S-a observat că în general tulpinile rezistente la ketoconazol sunt de asemenea rezistente și la

fluconazol. Rezistența la itraconazol este, de asemenea, asociată de cele mai multe ori cu rezistența la ketoconazol. Alte studii au arătat că voriconazolul poate fi activ împotriva tulpinilor fluconazol- rezistente de *Candida albicans*. (12, 28)

Nu numai expunerea prelungită la un anumit antifungic determină rezistența la acesta, ci și dozajul utilizat. Astfel, un studiu a evidențiat faptul că rezistența la fluconazol era mai crescută la pacienții care au primit o doză cumulativă de fluconazol, de mai mult de 10 g, indicând influența dozajului total asupra dezvoltării rezistenței la azoli. Alte studii efectuate *in vitro* folosind tulpini de *C. albicans* expuse la concentrații de fluconazol $\geq 8 \mu\text{g/ml}$ au arătat că acestea devin rezistente după câteva pasaje (cca. 15- 20 zile) pe mediul cu fluconazol. Dacă tulpinile sunt expuse la concentrații de $4 \mu\text{g/ml}$ fluconazol, ele rămân susceptibile chiar după 10 astfel de pasaje (25 de zile). În concluzie, este posibil ca această concentrație să nu exercite o presiune suficient de mare asupra culturii încât să inducă rezistența tulpinilor de *C. albicans* sau poate este necesară o perioadă mai mare de timp în cazul acestei concentrații pentru apariția rezistenței. (2).

Într-un studiu realizat pe 59 de tulpini de *Candida*, din care 52 de *C. albicans*, 4 *C. tropicalis* și 3 *C. krusei*, numai 8,47% și 5,08% au dovedit rezistența față de amfotericina B, respectiv 5-flucitozina, în timp ce frecvența rezistenței față de alți agenți antifungici de tip azol era mult mai mare (25,42% la itraconazol, 45,76% la ketoconazol, 66,10% la fluconazol) (32). În graficul de mai jos sunt evidențiate datele rezultate în studiul respectiv.

Comparativ cu alte subspecii de *Candida*, *C. albicans* este nu numai cea mai frecvent întâlnită, dar, în general, și cea mai puțin rezistentă. După cum se observă în tabelul III, *C. albicans* apare în 50% din cazuri între tulpinile izolate, fiind sensibilă la toate tipurile de antifungice utilizate. (26)

Interesantă este relația dintre rezistență și patogenicitate, tulpinile de *Candida albicans* azol-rezistente fiind mult mai puțin patogene in vivo decât variantele lor sensibile la tratament. În plus, capacitatea reproductivă a tulpinilor rezistente este, de asemenea, redusă, în mod

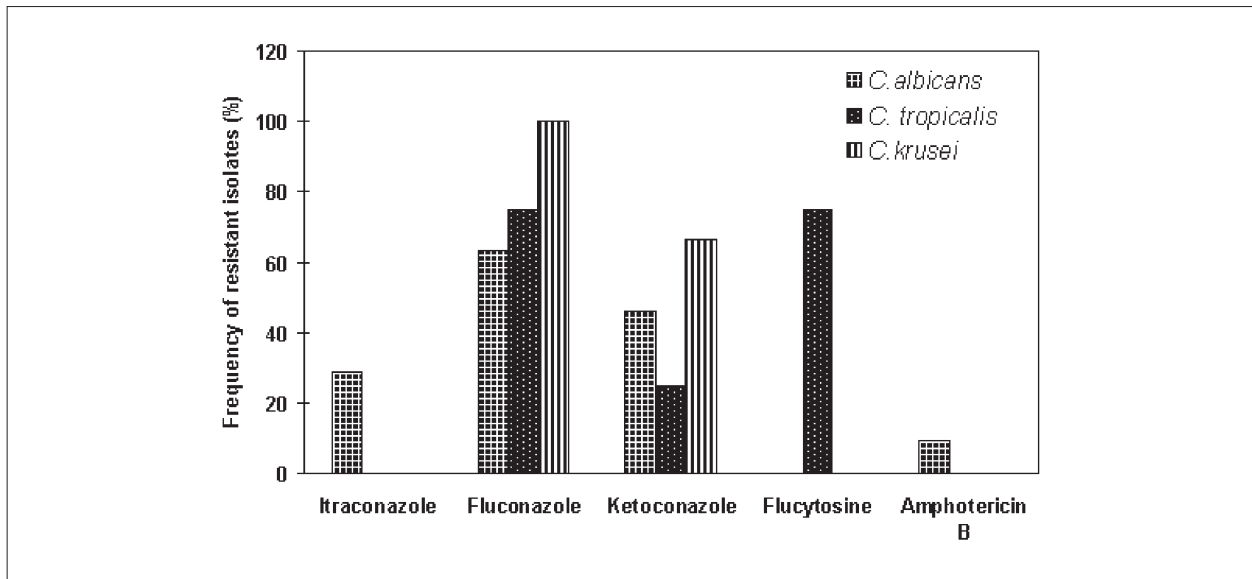


Fig. 2

Tabelul III

Specie	Frecvența apariției la nr. cazuri	Interpretare, bazată pe CMI			
		Fluconazol	Itraconazol	AmB	5FC
<i>C. albicans</i>	50%	S	S	S	S
<i>C. parapsilopsis</i>	10-20%	S	S	S	S
<i>C. tropicalis</i>	10-20%	S	S	S	S
<i>C. glabrata</i>	10-30%	S-DD	S-DD	I	S
<i>C. krusei</i>	£ 1%	R	S-DD	S	R
<i>C. lusitaniae</i>	£ 1%	S	S-DD	R	R

S - sensibilă S-DD - sensibilă în funcție de doză I - sensibilitate intermediară R - rezistență

reversibil însă, după o expunere prelungită la medicament revenind la nivelul normal.

Experimental, compararea tulpinilor sensibile și a celor rezistente de *Candida albicans* a arătat că expresia a nu mai puțin de 301 gene a fost alterată semnificativ la populațiile care au devenit rezistente. (29)

Rezistența la azoli poate fi permanentă (la pacienții cu sistemul imunitar afectat în mod ireversibil) sau tranzitorie (cum ar fi la persoanele care primesc un transplant sau la pacienții ce primesc chimioterapie).

În ceea ce privește rezistența tranzitorie, se presupune că în cadrul unei populații de *Candida albicans* sensibile la tratamentul cu azoli, dezvoltarea rezistenței este corelată cu selecția

unei clone rezistente din populația heterogenă de celule în urma expunerii îndelungate la medicament. Ca atare, într-un astfel de caz, celulele rezistente coexistă cu cele sensibile. Culturile de *Candida albicans*, *Candida glabrata* și *Candida krusei* conțin populații heterogene în care coloniile sensibile la azoli alternează cu cele rezistente. (12, 25) Cele mai multe tulpini de *C. albicans* au capacitatea de a-și modifica fenotipul spontan, reversibil, cu o înaltă frecvență (10⁻⁴- 10⁻¹), noul fenotip putând fi evidențiat pe baza trăsăturilor morfologice ale coloniei. Aceste modificări joacă un rol important în patogeneză, fiind corelate în general cu creșterea virulenței, modificări ale antigenicității, sensibilității la neutrofile și oxidanți, capacității de adeziune,

secreției de aspartil proteinaze. Totodată, s-au identificat modificări ale genei CDR3 implicată în rezistența la antifungice. Tulpinile cu fenotip modificat prezintă ca atare o rezistență crescută la o azoli, amfotericina B, 5 floucitozina (36). Se pare că subpopulațiile diferite de fungi, din punct de vedere al rezistenței și al mecanismelor prin care se dobândește această rezistență, pot coexista la un moment dat la același pacient. (23)

Este posibil că rezistența la azoli a populațiilor de *Candida albicans* să se realizeze prin mecanisme similare celor care determină rezistență la antibioticele β lactamice și glicopeptidice a populațiilor de enterococi și stafilococi. Aceste mecanisme presupun modificări la nivelul peretelui celular și întrucât azolii au ca țintă tocmai peretele celular, schimbări ale componentelor acestuia ar putea determina rezistența la aceste antifungice. (10, 28)

Înainte, dar și pe parcursul tratării unui bolnav, în special când acesta a suferit o recidivă, se recomandă a se efectua teste de susceptibilitate la azoli: determinarea concentrației minime inhibitorii; creșterea concentrației minime inhibitorii marchează apariția rezistenței față de azoli.

În ultimii ani, în țara noastră, rezistența tulpinilor de *Candida albicans* față de azoli, a devenit semnificativă. Într-un studiu efectuat de laboratoarele Synevo pe 114 tulpini de *Candida* și făcut public în noiembrie 2004, s-a arătat că 49,52% dintre bolnavii diagnosticați cu tulpini de *Candida* prezentau rezistență la fluconazol. Rezistența la econozal, a fost chiar mai mare, de 56,19%, în timp ce rezistența la miconozol, a întregitrat o valoare de 31,43%, aceste ultime două produse fiind disponibile în numeroase forme farmaceutice cu aplicare topică. Din totalul tulpinilor de *Candida*, 64 erau *Candida albicans*. S-a observat o rezistență de doar 1,9% la amfotericină B și tot 1,9 % la flucitozină, antifungice mult mai puțin folosite pe scară largă.

VII. Rezistența la amfotericina B

În ciuda utilizării clinice intense a amfotericinei B, rezistența la acest antifungic apare destul de rar. Mecanismul prin care se dobândește această rezistență nu este pe deplin elucidat. S-a sugerat că rezistența la AmB ar

putea să apară prin selecția unei clone rezistente într-o populație, că urmare a unei mutații, identificându-se diferențe fenotipice între tulpinile sensibile și cele rezistente la amfotericină.

O altă posibilitate este că rezistența să apară datorită modificărilor, cantitative sau calitative, ale conținutului de steroli al membranei, întrucât ergosterolul este ținta AmB.

Conform acestei ipoteze, celulele rezistente cu sterolii modificați ar trebui să lege cantități mai mici de antifungic decât cele sensibile, acest lucru putând fi atribuit:

- descreșterii conținutului total de ergosterol al celulei, fără schimbări concomitente în compoziția sterolilor;
- înlocuirii unora sau tuturor sterolilor cu afinitate crescută pentru poliene cu alții care leagă mai puțin acești compuși, cum ar fi substituția ergosterolului, colesterolului sau stigmasterolului cu 3-hidroxi sau 3-oxo sterol;
- reorientarea sau mascarea ergosterolului, astfel încât legarea amfotericinei B să devină dificilă.

S-a arătat că peretele celular joacă un rol important în ceea ce privește rezistența la amfotericina B. Prin compararea rezistenței tulpinilor în faza staționară și în faza de creștere exponențială, s-a observat faptul că în faza staționară, rezistența este mai crescută decât în cea exponențială. Această observație a fost pusă pe seama faptului că în faza exponențială distrugerea și refacerea peretelui celular au loc la un nivel mult mai înalt decât în cea staționară, astfel încât accesul AmB în celulă este crescut. (13)

Rezistența la tratamentul cu azoli a tulpinilor de *Candida albicans* nu este corelată cu rezistența la amfotericina B. Experimental, s-a demonstrat că tulpini rezistente la fluconazol, ketoconazol și itraconazol sunt în continuare sensibile la tratamentul cu amfotericină B. (15, 25) De altfel, *Candida albicans* și *Candida tropicalis* sunt cele mai susceptibile dintre subspeciile de *Candida* la tratamentul cu amfotericina B. După circa 6 ore de expunere în vitro a acestor subspecii la amfotericina B, mai puțin de 1% din populație supraviețuiește.

S-a observat însă că, dacă în prealabil tulpinile de *Candida albicans* sunt expuse unor

concentrații subinhibitoare de fluconazol sau itraconazol (chiar dacă expunerea este de numai 3 ore), acest lucru are drept rezultat creșterea pronunțată a rezistenței față de amfotericină B. Imediat după expunerea la azoli, tulpinile de *Candida albicans* sunt capabile să crească pe medii care conțin amfotericina B. Această rezistența se poate menține câteva zile după îndepărtarea azolilor, dar nu este permanentă. Acest antagonism *in vitro* între azoli și amfotericina B poate demonstra că anumite combinații antifungice nu sunt benefice în tratamentul pacienților. Dacă un pacient nu răspunde tratamentului cu azoli, terapia imediată cu amfotericina B se poate dovedi ineficientă (cel puțin temporar) din cauza efectului protectiv al azolilor.

De asemenea, se poate concluziona că rezistența la amfotericina B se datorează mai degrabă utilizării prelungite a azolilor decât terapiei în sine cu amfotericina B. Mecanismul prin care se dobândește această rezistența nu este elucidat. Este posibil că expunerea la azoli să determine anumite modificări ale ergosterolului din peretele celular fungic, principala țintă a amfotericinei B. (15)

Rezistența la amfotericina B este crescută la pacienții cu cancer, deși nu se cunoaște modul în care chimioterapia determină rezistența la acest antifungic.

Se presupune că pre-expunerea la un alt antifungic polienic, ex. nistatinul, ar avea ca rezultat apariția unor tulpini rezistente față de amfotericina B. (20, 38)

VIII. Rezistența la 5-flucitozina

Apare destul de des în cazul monoterapiei cu acest antifungic. 10% din tulpinile izolate de *Candida albicans* prezintă rezistență primară (intrinsecă) la 5-flucitozina, alte 30% dezvoltă rezistență secundară. Rezistența la 5-flucitozina are un caracter recesiv și poate să apară prin mutație sau prin recombinare în timpul meiozei. Rezistența primară este urmarea unui defect la nivelul citozin dezaminazei care determină transformarea 5-flucitozinei în 5-fluorouracil, iar rezistența secundară implică un defect al uracil fosforibozil transferazei care determină trecerea 5-FU în FdUMP (20, 38) Cele două serotipuri de la *C. albicans* prezintă rezistență diferită la 5-flucitozină, serotipul A fiind mult mai susceptibil

la acest antifungic decât serotipul B. (30) Descreșterea activității dezaminazei responsabile de transformarea 5FC în 5FU este asociată cu rezistența într-o manieră dependentă de genotip. Homozigoții FCY/FCY prezintă activitate dezaminazică crescută (tulpinile fiind sensibile la 5FC); heterozigoții FCY/fcy prezintă activitate mai scăzută, iar la homozigoții recesivi fcy/fcy activitatea dezaminazei este foarte slabă, aproape nedetectabilă, aceste tulpini izolate prezentând rezistență crescută la 5 FC. (13)

IX. Rezistența la alilamine

Alilaminele, cum ar fi terbinafina și naftifina sunt o clasă de inhibitori ai biosintezei ergosterolului distincți din punct de vedere chimic și funcțional de alte tipuri de agenți antifungici anti-ergosterol. Deși terbinafina este eficientă mai ales împotriva dermatofitelor, a fost utilizată și în infecțiile cu *Candida*. Terbinafina s-a dovedit folositoare în cazul unor tulpini azol-rezistente de *C. albicans*. Alilaminele acționează prin inhibarea primelor etape ale sintezei ergosterolului. Inhibarea coincide cu acumularea în celulă a precursorilor de tip squalene și absența oricărui alt intermediar sterolic, sugerând faptul că terbinafina acționează asupra enzimei squalen-epoxidază, inhibând-o. Acumularea squalenei în celulă determină moartea acesteia mai degrabă decât absența ergosterolului.

Utilizarea destul de scăzută a alilaminelor în cazul infecțiilor cu *Candida* a făcut ca până în prezent să nu se identifice cazuri de rezistență la acestea. Este totuși de așteptat ca utilizarea din ce în ce mai frecventă să ducă la apariția rezistenței, fiind raportate cazuri de tulpini de *C. glabrata* azol rezistente care exprimau rezistența încrucișată la terbinafină. Unele studii au demonstrat că transportorii CDR1 pot folosi și terbinafina ca substrat. (13)

X. Determinarea rezistenței la diverse antifungice

Se face pe baza testelor de susceptibilitate ce urmăresc valorile CMI în plasmă. Sunt considerate rezistente tulpinile care au valori ale CMI > 64 μg/ml pentru fluconazol, itraconazol și ketoconazol; > 32 μg/ml pentru 5 flucitozina și >2 μg/ml pentru amfotericina B. (vezi tabelul IV) (32)

Tabelul IV. Concentrația inhibitorie minima pentru *Candida* spp. din cadrul agenților antifungici (25)

Ketoconazol ≤ 0,0312- 64	Fluconazol ≤0,0312- 64	Itraconazol ≤ 0,125- 1	AmpB ≤0,-312- 2	5 -FC ≤ 0,0312- 64	Grad de susceptibilitate
≤ 0,125- 4	≤ 1- 8	≤ 0,125	≤ 0,0123- 1	≤ 0,0 312	Sensibilă
16- 32	16- 32	0,25- 0,5	2	16	Sensibilitate redusă (intermediar)
≥ 64	≥ 64	≥ 1	≥ 2	32- 64	Rezistență

XI. Rezistența la antifungice datorată capacității *Candidaei albicans* de a forma biofilme

Candida albicans are capacitatea de a forma biofilme pe anumite suprafețe (catetere, dinti, epitelii). Biofilmele se formează în urma adoptării unei fiziologii specifice prin trecerea de la forma de drojdie la forma filamentoasă. Stransa imbinare a hifelor duce la constituirea unui astfel de biofilm în interiorul căruia celulele de *Candida albicans* sunt protejate de antifungice, chiar dacă în mod normal ar fi sensibile. Ca atare, pot apărea adesea recurențe ale bolii chiar după tratamente antifungice aparent eficiente. (10, 21)

Este posibil să existe diferențe de susceptibilitate față de antifungice chiar între cele două fenotipuri, formele filamentoase putând fi mai rezistente și mai patogene decât cele lipsite de hife. (10, 21)

Biofilmele se formează în trei etape:

- timpurie (în care are loc adeziunea la substrat);
- intermediară: blastomerele proliferază și formează comunități ce produc o matrice extracelulară bogată în carbohidrați;
- faza de maturare în care celulele sunt complet încapsulate în matrice.

S-a observat de asemenea la nivelul celulelor din biofilm activarea pompelor care realizează efluxul de fluconazol. Spre deosebire de celulele planctonice de *C. albicans* în care pompele sunt exprimate în stadii mai târzii, la nivelul biofilmului, transportorii se exprimă timpuriu și apoi în toate stadiile de dezvoltare a biofilmului. Aprecierea implicării acestora în rezistența la antifungice a biofilmului se poate face folosind o proteină fluorescentă, rodamina 123, care este un cunoscut substrat pentru pompele de eflux în

celula mamiferă, bacteriană sau de drojdie. Folosind rodamina 123 s-a demonstrat că transportorii contribuie la rezistența biofilmului în stadiile timpurii, dar nu și în faza de maturare. În etapele intermediară și de maturare, se pare că fenotipul rezistent este datorat modificărilor care au loc în compoziția sterolilor. Depleția genelor *cdr* și *mdr* codificatoare pentru transportori nu afectează capacitatea celulelor de a forma biofilme (27).

Chiar dacă pompele sunt deficitare, biofilmul continua să fie rezistent la antifungice, ceea ce arată că rezistența la nivelul acestei structuri este un fenomen complex care implică mai mult de un singur mecanism. În ceea ce privește ergosterolul, s-a constatat o reducere a nivelului acestuia până la 50% în faza matură față de cea timpurie, în vreme ce în cazul celulelor planctonice reducerea este de numai 18%. Nivelele altor steroli, atât în celulele planctonice cât și în biofilm s-au dovedit de asemenea modificate (zimosterol, 4,14-dimetilzimosterol, obtusifoliol). Compoziția în steroli a membranei celulare pare a fi un factor critic asociat cu rezistența la azoli a biofilmelor în faza matură. Modificări ale compoziției sterolilor pot conduce la alterarea permeabilității membranei ceea ce încetinește pătrunderea agentului antifungic în celule (16). Creșterea rezistenței antifungice în timpul dezvoltării biofilmului arată că progresia rezistenței la medicament este corelată cu o activitate metabolică crescută; rezistența se dezvoltă deci în timp, odată cu maturizarea biofilmului. Biofilmul este rezistent la majoritatea antifungicelor. Numai agenții antifungici mai noi din familia echinocandinelor și forma liposomală nouă a amfotericinei B s-au dovedit eficiente contra biofilmelor. (7, 20)

XII. Evoluția rezistenței la antifungice în populații experimentale de *C. albicans*

S-a demonstrat că exista un patern evolutiv al rezistenței față de un anumit antifungic care implică selecția și perpetuarea unei tulpini la care aleator a apărut o mutație ce conferă un avantaj adaptativ. Adaptarea la concentrațiile inhibitoare ale antifungicelor a fost urmărită în populații experimentale de celule sensibile la fluconazol de *Candida albicans*. Într-un astfel de studiu, s-au folosit 12 populații de *C. albicans*, dintre care 6 au fost cultivate în mediu în care concentrația de fluconazol era dublă față de CMI, iar celelalte 6 au fost menținute în mediu fără antifungic. Adaptarea la prezența fluconazolului a fost evidențiată prin modificarea valorilor CMI, în timp ce la populațiile crescute pe mediu fără fluconazol nu s-a înregistrat nici o modificare a CMI. Creșterea rezistenței la fluconazol a fost însoțită în cazul tuturor celor 6 populații de rezistență la ketoconazol și itraconazol. S-a constatat că cele 6 populații prezentau nivele diferite de rezistență cu paternuri distincte de supraexpunere a patru gene implicate în rezistența la fluconazol: genele pentru transportorii ABC (*cdr1* și *cdr2*), gena *erg11* codificatoare pentru C14 α demetilaza, enzima țintă pentru fluconazol, și gena pentru major facilitator MDR1. Adaptările selective ale acestor populații au fost însoțite de modificări genomice a căror legătură cu dobândirea rezistenței rămâne încă necunoscută: pierderea heterozigotismului anumitor markeri genetici, alterări ale cariotipului electorforetic și ale amprentelor AND (DNA fingerprinting). Aceste rezultate au arătat că șansa apariției unor mutații care conferă un anumit avantaj este determinantă în evoluția rezistenței la azoli în populațiile experimentale de *C. albicans* (7)

XIII. Strategii pentru prevenirea și combaterea rezistenței la *C. albicans*

În ultimii ani incidența infecțiilor cu *C. albicans* a crescut foarte mult în condițiile în care s-au dezvoltat tulpini rezistente la antifungicele actuale. Resursele de medicamente anti-*Candida* se dovedesc destul de limitate, iar unii dintre agenții antifungici folosiți pot avea efecte adverse grave. Dezvoltarea unor noi strategii pentru

prevenția și tratarea candidozelor pare a fi o provocare importantă în cadrul micologiei moderne. O etapă preliminară în dezvoltarea unor astfel de strategii este cunoașterea amănunțită a modului în care *Candida* provoacă boala și a mecanismelor prin care își dobândește rezistența. Până recent, se presupunea că infecțiile sunt produse de tulpini de *Candida* existente la pacienți și anterior bolii în forma comensală. Au apărut însă indicii care arată că aceste tulpini sunt de fapt înlocuite cu altele, mai virulente și mai rezistente la antifungice determinând infecția. De multe ori, o astfel de tulpină se dezvoltă în cadrul populației anterioare prin perpetuarea unei mutații ce conferă un avantaj selectiv. Aceste noi tulpini sunt responsabile de o treime până la o jumătate din candidoze.

În prezent, se fac cercetări vizând compararea acestor noi tulpini cu celelalte, în scopul identificării diferențelor genomice și secvențelor caracteristice tulpinilor mai virulente. Aceste diferențe sunt potențiali factori de virulență și de rezistență și identificarea lor crește șansele înțelegerii modului în care se instalează infecția cu *Candida*; totodată, secvențele identificate pot servi ca țintă pentru dezvoltarea a noi antifungice.

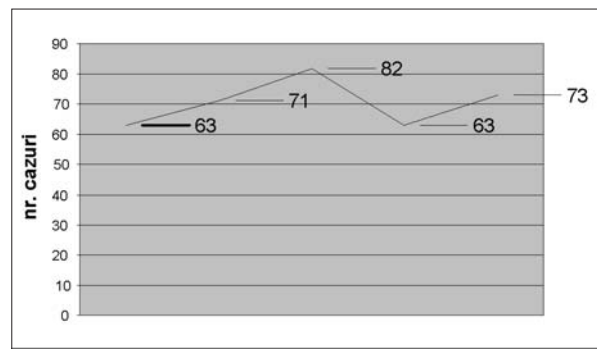


Fig. 3. Infecții cu *Candida* la nivelul pielii și al unghiilor în anii 2000-2004 în România

Forma filamentoasă a *C. albicans* este mai capabilă de aderență decât forma de drojdie și ca atare, va invada mai ușor țesuturile gazdă formând în plus biofilme care au ca rezultat o rezistență sporită. Noile strategii terapeutice trebuie să ia în considerare acest lucru, proiectând agenți antifungici care să aibă ca țintă stoparea dezvoltării hifelor. Deși fluconazolul și itra-

conazolul s-au dovedit eficienți împotriva formelor filamentoase ale *C. albicans*, în multe cazuri apariția rezistenței la aceste antifungice generează probleme importante. Anumite studii au demonstrat faptul că lactoferina, o proteină antimicrobiană identificată în secrețiile exocrine la mamifere și în neutrofile prezintă activitate anti-Candida. Lactoferina și lactofericina (peptida rezultată din capătul N-terminal al lactoferinei) au fost testate pentru evaluarea capacităților antifungice. S-a constatat că lactofericina B rezultată din lactoferina bovină prezintă puternice efecte distructive asupra membranei celulare fungice, având activitate fungicidă împotriva *C. albicans*. În combinație cu fluconazolul și itraconazolul, lactoferina și lactofericina B prezintă acțiune sinergică împotriva *C. albicans*. S-a constatat că tulpinile rezistente la azoli sunt mai degrabă inhibitate de lactoferină și lactofericină decât cele susceptibile, iar pe de altă parte efectul itraconazolului și fluconazolului asupra acestor tulpini rezistente se îmbunătățește în prezența celor doi compuși. Acest lucru indică posibilitatea folosirii lactoferinei și lactofericinei ca inhibitori ai creșterii formelor filamentoase de *C. albicans*. Acest efect al lactoferinei și lactofericinei asupra tulpinilor rezistente de *C. albicans* nu este surprinzător. Întrucât lactoferina se leagă la membrana celulară fungică determinând anumite modificări, iar lactofericina are chiar capacitatea de a distruge membrana, este explicabil modul în care combinarea lor cu azolii reface efectul acestora asupra tulpinilor rezistente. Este de asemenea posibil că lactofericina B să determine o reducere a nivelului de ATP în celula fungică, întrucât disipează gradientul protonic de-a lungul membranei celulare. În acest caz, activitatea transportatorilor care realizează efluxul azolilor din celulă se diminuează și ca atare, rezistența față de azoli scade. Este posibil ca la nivelul organismului gazdă lactoferina din mucoase și din neutrofile să determine amplificarea acțiunii azolilor inhibând colonizarea gazdei de către tulpinile rezistente de *C. albicans* în cavitatea bucală unde nivelul lactoferinei este scăzut, acesta fiind situsul primar în cazul infecției cu tulpini rezistente de *C. albicans*. Sunt necesare

studii suplimentare pentru a evalua capacitățile terapeutice ale acestor peptide și modul în care ele pot fi exploatare (37).

Recent, s-au făcut studii care indică faptul că efectul azolilor împotriva tulpinilor rezistente de *C. albicans* ar putea fi amplificat de combinarea acestora cu un antiinflamator nesteroidian. S-a constatat in vitro efectul sinergic al fluconazolului cu ibuprofenul în cazul unor tulpini rezistente de *C. albicans*, efect neevidențiat în cazul tulpinilor sensibile la fluconazol. În plus, s-a observat că inhibarea creșterii tulpinilor rezistente are loc numai în cazul în care concentrațiile de fluconazol și ibuprofen se mențin la nivel inferior valorilor CMI. Studiile viitoare vor arata dacă o atare combinație este utilă în tratarea infecțiilor *Candida* fluconazol-rezistente. (1)

Strategiile viitoare împotriva infecțiilor cu tulpini rezistente de *C. albicans* trebuie să ia în considerare mai multe direcții:

- stabilirea dozelor și duratei optime de acțiune pentru un anumit antifungic la fiecare pacient;
- profilaxie medicamentoasă la pacienții cu risc crescut de apariție a infecțiilor rezistente;
- ameliorarea tolerabilității și accesibilității pentru un anumit medicament;
- terapii combinate (amfotericina B, flucitozina, azoli) luând în considerare și eventualele interacțiuni medicamentoase care ar putea să apară;
- cercetări pentru descoperirea a noi agenți antifungici, în special cu activitate fungicidă;
- ameliorarea funcției imunitare.

Unele studii au arătat că folosirea antifungicelor sub formă de suspensie (AmB 100 mg/ml), itraconazol (10 mg/ml), fluconazol (10 mg/ml) sau sub formă lipidică (AmB) este mai eficientă împotriva tulpinilor rezistente. (15)

Ca terapii alternative în cazul rezistenței la fluconazol se pot folosi în mod practic:

- capsule de itraconazol (de obicei în doze mari);
- doze mărite de fluconazol;
- suspensie orală de fluconazol sau itraconazol;

- suspensie orală amfotericina B;
- amfotericina B în formă intravenoasă;
- un azol sau amfotericină B cu flucitozină (26).

O nouă tendință în tratamentul infecțiilor fungice rezistente, mai ales la persoanele cu defecte imunitare, este imunoterapia, în încercarea de a ameliora sau amplifica funcția imunitară. În general, aceasta este orientată spre corectarea defectului imunitar subiacent care predispune la infecția fungică, dar poate de asemenea să urmărească amplificarea funcției imune contra agentului fungic. Citochinele, factorii de creștere și leucocitele pot amplifica apărarea gazdei împotriva unei largi varietăți de agenți patogeni și transfuziile cu aceste elemente reprezintă un exemplu de imunoterapie non-specifică.

Administrarea anticorpilor este un tip specific de imunoterapie, orientată asupra unui anumit agent patogen. Potențiala eficiență a anticorpilor din ser împotriva fungilor a fost sugerată de prelungirea supraviețuirii la soarecii cu infecții *Candida* experimentale care au fost tratați cu imunoglobuline intravenos în combinație cu amfotericină B. S-a sugerat de asemenea că o administrarea intravenoasă de imunoglobuline, chiar și în doze mici, poate preveni infecțiile fungice la persoanele imunocompetente. Administrarea de anticorpi bovini față de *C. albicans* la pacienți cu transplant de maduvă a redus colonizarea *Candidaei* la 7 din 10 pacienți, arătând că anticorpii specifici față de *C. albicans* pot fi eficienți și la persoanele cu imunitatea afectată.(4)

XIV. Concluzii

Rezistența tulpinilor de *Candida albicans* la tratamentul antifungic este o realitate din ce în ce mai prezentă. Ea apare prin mecanisme complexe celulare sau umorale, pe un teren care ține fie de fungul care determină infecția, fie de organismul gazdă.

Pentru a scădea incidența rezistenței la antifungice, trebuie să evaluăm posibilitățile terapeutice și trebuie să ținem cont de anumite aspecte practice:

1. Azolii, în special cei cu toleranță mai bună, cum sunt fluconazolul, itra-conozolul, au

fost și sunt de ales ca primă opțiune pentru tratamentul *Candidaei albicans*. Însă, folosirea pe scară largă a fluconazolului în România, care a devenit foarte accesibil după apariția pe piața farmaceutică a produselor românești, a determinat o creștere a rezistenței tulpinilor patologice de *Candida albicans* într-o proporție îngrijorătoare. Am menționat un studiu efectuat pe 114 tulpini de *Candida*, dintre care 64 tulpini patologice de *Candida albicans*, în care, 49,52% dintre pacienți au prezentat rezistența la fluconazol, 56,19% la econozol și 31,43% la miconazol, ultimele preparate găsimându-se în diverse forme pentru tratament local. Acest studiu ne relevă o situație de care trebuie să ținem seama pentru a institui un tratament corect.

2. Este imperios necesar să se efectueze fungrama oricărui pacient care se prezintă la medic cu infecții fungice recurente; vom economisi astfel fondurile alocate de bolnav inutil pentru tratamentul micozei care îl supără, dar mai important, putem alege opțiuni terapeutice care să vindece bolnavul.
3. Ținând cont de toate experiențele efectuate pentru determinarea rezistenței, informațiile privind antigenicitatea componentelor peretelui celular la *C. albicans* s-ar putea dovedi utile într-o eventuală abordare a posibilităților terapeutice. S-a stabilit că peretele celular este important în aproape toate aspectele privind biologia și patogenicitatea acestui fung. Proteinele peretelui celular și manoproteinele constituie antigene majore și principalele molecule de recunoaștere. Marea lor variabilitate poate ajuta celulele fungice să scape de mecanismele de apărare ale gazdei. Caracterizarea componentelor peretelui celular, mai ales a acelor care prezintă proprietăți antigenice, se poate dovedi o bază pentru dezvoltarea strategiilor alternative în cadrul managementului global al candidozelor, în special acelor provocate de tulpini rezistente la antifungice.

Intrat în redacție: 12.11.2008

Bibliografie

1. Arai, R., Sugita, T., Nishikawa, A., Reassessment of the in vitro synergistic effect of fluconazole with the non-steroidal antiinflammatory agent ibuprofen against *Candida albicans*, *Mycoses*, 2005, 48 (1): 38.
2. Calvet, H.M., Yeaman, M. R., Filler, S. G., Reversible fluconazole resistance in *Candida albicans*: a potential in vitro model, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1997, 41 (3): 535- 539.
3. Cauvenbergh, G., Degreef H., Heykants, J., Woestenberhs, R, Van Rooy, P., Haeverans, K., Pharmacokinetic profile of orally administered itraconazole in human skin, *Journal of the American Academy of Dermatology* 1988; 18: 263 – 268 7.
4. Casadevall, A., Pirofski, L. Adjunctive immune therapy for fungal infections, *Clinical Infectious Disease*, 2001, 33: 1048-1056.
5. Citak, S., Ozcelik, B., Cesur, S., Abbasoglu, U., in vitro susceptibility of *Candida* species isolated from Blood culture to some antifungal agents, *Jpn. J. Infect. Disease*, 2005, 58: 44-46.
6. Cojocaru I. , Elemente de dermato-micologie, Ed. Medicala, 1979, 72- 73.
7. Cowen, L.E., Sanglard, D., Calabrese, D., Sirjusingh, C., Anderson, J.B., Kohn, L.M., Evolution of drug resistance in experimental populations of *Candida albicans*, *J. Bacteriol*, 2000, 182 (6): 1515-1522.
8. Daneshmend, T.K., Warnock, D. W., Clinical pharmacokinetics of ketoconazole, *Clinical pharmacokinet*, 1988, 14: 13-34.
9. d'Enfert, C, Biofilms fongiques: de leur role clinique a l'etude de mecanismes moleculares responsables de leur formation et leur proprietes, *Annales de l'Institute Pasteur Actualites, Les Mycoses*, 181-194.
10. Elewski, B., Pharmacokinetic characteristics of oral antifungal agents, *Journal of the American Academy of Dermatology*, 2000, 12-20.
11. Faergemann, J., Pharmacokinetics of fluconazole in skin and nails, *Journal of American Academy of Dermatology*, 1994, 131: 684:686.
12. Feier, V., *Dermatovenerologie.*, Ed. Amarcord, Timisoara, 1998, 112.
13. Ghannoum, M. A., Rice, L. B., Antifungal agents: mod of action, mechanisms of resistance and correlation of these mechanisms with bacterial resistance, *Clinical Microbiology Reviews*, 1999, 12 (4): 504- 517.
14. Gupta, A. K., Scher, R. K., De Donker, P., Current management of onychomycosis (N.B....onixis, perionixis): an review, *Dermato. Clin*, 1997, 15: 121-135.
15. Gupta, A. K., Shear, N. H., Katz, H.I., Drug interactions with itraconazole, fluconazole, terbinafine and their management, *J. of American Academy of Dermatology*, 1999, 41: 237-249.
16. Gupta, A. K., Shear, N. H., Terbinafine: an update, *J. of American Academy of Dermatology*, col. 37, nr. 6, 1997.
17. Gupta, A. K., Sander, D. N., Shear, N. H., Antifungal agents: an overview, p. II, *J. of American Academy of Dermatology*, 1994, 30: 911-933.
18. Hitchcock, C. A., Azole antifungal resistance in *Candida Albicans*, *APUA Newsletter*, 1996, 14 (1): 1, 5-6,8.
19. Hooshdaran, M. Z., Barker, K. S., Hilliard, G. M., Kusch, H., Morschhauser, J., Rogers, P. D., Proteomic analysis of azole resistance in *Candida albicans* clinical izolates, *Antimicob. Agents Chemother*, 2004, 48 (7): 2733- 2735.
20. Ibrahim Al-Mohsen, Hughes, W., Systemic antifungal therapy: past, present, future, 2003, 121-135.
21. Jabra-Rizk, M.A., Falker, W. A., Meiller, T. F., Fungal Biofilms and drug resistance, *Emerging Infections Diseases*, 2004.
22. Kohli, A., Smriti, N.F.N., Mukhopadhyay, K., Rattans, A., Prasad, R., in vitro low- level resistance to azoles in *Candida albicans* is associated with changes in membrane lipid fluidity and asymmetry, *Antimicob. Agents Chemotherapy*, 2002, 46 (4): 1046- 1052.
23. Lopez-Ribot, J.L., McAtee, R.K.,Perea, S., Kirkpatrick, W. R., Rinaldi, M. G., Patterson, T.F., Multiple resistant phenotypes of *Candida albicans* during episodes of oropharyngeal candidiasis in human immunodeficiency virus- infected patients, *Antimicrob. Agents Chemotherap.*, 1999, 43 (7): 1621-1630.
24. Lopez-Ribot, J. L., Kirkpatrick, W. R, McAtee, R.K., Revankar, S. G., Patterson, T. F., Cell wall proteinaceous components in in izolates of *Candida albicans* and non-albicans species from HIV- infected patients with oropharyngeal candidiasis, *Rev. Iberoam. Micol.*, 1998, 15: 125-130.
25. Marr K. A., Lyons C. N., Kien Ha, Rustad, T. R., White, T. C., Inducible Azole Resistance Associated with a Heterogeneous Phenotype in *Candida Albicans*, *Antimicob. Agents Chemother.*, 2001, 45 (1): 52-54.
26. Martins, M. D., Rex, J. R., Antifungal drug resistance: a focus on *Candida*, *Fungal Infections*, 1997, 1(3).
27. Mukherjee, P.K., Chandra, J., Kuhn, D.M., Ghannoum, M.A., Mechanisms of fluconazole resistance in *Candida albicans* Biofilms: phase-

- specific role of efflux pumps and membrane sterols, *Infection and Immunity*, 2003, 71 (8): 4333- 4340.
28. Muller F. C., Weig, M., Peter, J., Walsh, T. J., Azole cross- resistance to ketoconazole, fluconazole, itraconazole and voriconazole in clinical *Candida albicans* isolates from HIV- infected children with oropharyngeal candidosis, *J. Antimicrob. Chemotherapy*, 2000, 46: 338-341.
 29. Odds, F., The evolution of antiungal resistance in *Candida* species, *Microbiology Today*, 2004, 31: 139- 141.
 30. Odds, F.C., Abbott, A.B., Stiller, R.L., Scholer, H.J., Polak, A, Stevens, D.A., Analysis of *Candida albicans* phenotypes from different geographical and anatomical sources, *Journal of Clinical Microbiology*, 1983, 18 (4): 849-856.
 31. Perea, S., Lopez-Ribot, J.L., Kirkpatrick, W.R., McAtee, R.K., Santillan, R.A., Martinez, M., Calabrese D., Sanglard D, Patterson, T.F., Prevalence of molecular mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* strains displaying high-level fluconazole resistance isolated from human- immunodeficiency virus-infected patients, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2001, 45: 2676-2684.
 32. Rodrigues Silva, M.R., Rodrigues de Paula, C., Silva, S. C., Costa, T.R., Costa, M.R., Drug resistance of yeasts isolated from oropharyngeal candidiasis in AIDS patients, *Rev. Microbiol.*, 1998, 29 (4).
 33. Sanglard, D., Resistance of fungal human pathogens to antifungal drugs, *Current Opinion in Microbiology*, 2002, 5: 379-385.
 34. Sanglard, D., Ischer, F., Parkinson, T., Falconer, D., Bille, J., *Candida albicans* mutations in the ergosterol biosynthetic pathway and resistance to several antifungal agents, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2003, 47 (8): 2404- 2412.
 35. Vargas, K., Messer, S.A., Phaller, M., Lockhart, S.R., Stapleton, J.T., Hellstein, J., Soll, D., Elevated phenotypic switching and drug resistance of *Candida albicans* from human immunodeficiency virus – positive individuals prior to first thrush episode, *Journal of Clinical Microbiology*, 2000, 38 (10): 3595- 3607.
 36. Vazquez, J.A., Arganoza, M.T., Boikov, D., Yoon, S., Sobel, J. D., Akins, R. A., Stable phenotypic resistance of *Candida* species to amphotericin B conferred by pre-exposure to subinhibitory levels of azoles, *J. Clin. Microbiol.*, 1998, 36 (9): 2690-2695.
 37. Wakabayashi, H., Abe, S., Teraguchi, S., Hayasawa, H., Yamaguchi, H., Inhibition of hyphal growth of azole-resistant strains of *Candida albicans* by triazole antifungal agents in the presence of Lactoferrin-related compounds, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1998, 42(7): 1587- 1591.
 38. White, T. C., Marr, K, A., Bawden, R. A., Clinical, cellular and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance, *Clinical Microbiol. Rev.*, 1998, 11 (2): 382-402.