

Titolo: Nuove strategie diagnostiche e valutazione dei meccanismi molecolari di patogenicità e farmaco resistenza di miceti patogeni emergenti: Candida parapsilosis, C. orthopsilosis e C. metapsilosis

Abstract

4 - Abstract del Progetto di Ricerca

Italiano

L'incidenza di micosi opportunistiche ha subito un drammatico incremento negli ultimi 20 anni, con elevata frequenza di fungemie a rapida evoluzione soprattutto negli individui immunocompromessi. La maggior parte delle infezioni invasive è causata da patogeni appartenenti al genere *Candida*, con *C. albicans* la specie più frequentemente isolata da infezioni sistemiche. Recentemente, tuttavia, è stato registrato un deciso aumento dell'incidenza di candidemie dovute a specie di *Candida* non-*albicans*: tra queste, *C. parapsilosis* è emersa come uno dei più importanti patogeni opportunisti, attestandosi come la seconda o terza causa più comune di candidosi sistemica. Ciò nonostante, *C. parapsilosis* è, tra le specie emergenti, quella meno studiata: basti pensare che solo recentemente varianti intraspecifiche di *C. parapsilosis* sono state elevate al rango di specie e denominate *Candida metapsilosis* e *Candida orthopsilosis*. Indagini molecolari retrospettive hanno indicato che queste specie sono responsabili di infezione nell'uomo in circa l'1-10% delle infezioni erroneamente attribuite a *C. parapsilosis*. Le tre specie restano ancora oggi non discriminabili mediante i test routinariamente utilizzati nella diagnostica micologica, basati sulla caratterizzazione biochimico-metabolica. Pertanto, in seguito alla riorganizzazione del gruppo, le tecniche utilizzabili per la discriminazione delle tre specie sono basate su analisi del DNA ed includono profili di restrizione del gene *SADH*, digerito con l'enzima *BanI* o *NlaIII*, sequenziamento delle regioni ITS, pirosequenziamento di corte sequenze conservate; amplified fragment length polymorphism (AFLP) o sistemi basati su tecnologia microarray. Inoltre, non è ancora ben definito il repertorio di virulenza espresso dalle specie di recente definizione durante l'instaurarsi e la progressione dell'infezione, sebbene alcune indagini comparative indichino differenze nel potenziale patogenetico attribuibile alle specie del complesso "psilosis". L'insorgenza e lo sviluppo di un'infezione micotica è infatti un processo multi-fattoriale: una pletera di elementi contribuiscono alla sua progressione, tra cui fattori di virulenza espressi dal lievito (di particolare rilievo per queste specie adesività, organizzazione cellulare in biofilm, produzione di enzimi idrolitici), reattività immunitaria dell'ospite, sviluppo di fenotipi farmaco resistenti e loro reciproca interazione.

Appare, pertanto, motivato il vivo interesse a studiare la rilevanza clinica di *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis*, comparativamente alla più nota *C. parapsilosis*. In tale ottica, gli obiettivi principali che il Progetto di Ricerca si prefigge di raggiungere, con il contributo di 2 UR, dislocate in 2 Sedi Universitarie Italiane, sono di seguito riassunti.

- 1) Convalidare il nuovo approccio diagnostico per la rapida identificazione e la tipizzazione intraspecifica delle specie *C. metapsilosis* e *C. orthopsilosis*, mediante spettrometria di massa matrix assisted laser desorption ionization-time of flight (MALDI-TOF).
- 2) Studiare, attraverso RT-PCR quantitativa, la modulazione dell'espressione di TLRs, peptidi antimicrobici e citochine da parte di linee cellulari endoteliali umane (HUVEC) in risposta all'infezione con *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis* utilizzando modelli di colture cellulari tridimensionali. In base ai dati ottenuti dagli studi in vitro sarà possibile individuare marker diagnostici utili nella diagnosi precoce delle infezioni nosocomiali causate dal complesso psilosis.
- 3) Studiare le proprietà adesive del complesso psilosis, in grado di influenzare la colonizzazione e la permanenza del microrganismo nell'ospite, mediante modelli in vitro di adesione a cellule buccali epiteliali umane (HBEC).

- 4) Identificare geni codificanti molecole di adesione nelle specie del complesso psilosis: l'analisi in silico del genoma di *C. parapsilosis* ha indicato la presenza di 5 potenziali sequenze omologhe ai geni ALS di *C. albicans*. Queste sequenze verranno utilizzate per ricercare la presenza di geni simili anche in *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis*.
- 5) Allestire ceppi mutanti, attraverso la delezione, in *C. parapsilosis*, di putativi geni ALS-like e valutare l'effetto di tale mutazione in vitro ed in vivo. In particolare, la virulenza e patogenicità dei mutanti deficienti nelle capacità adesive verranno valutate durante l'infezione urinaria mediante allestimento di un modello in vivo-in vitro di sopravvivenza all'interno di macrofagi murini.
- 6) Caratterizzare la ridotta suscettibilità alla classe delle echinocandine descritta per le specie del gruppo psilosis, attraverso sequenziamento del gene FKS1 in ceppi di *C. ortho-meta* e *parapsilosis* di isolamento clinico con ridotta suscettibilità. Verranno inoltre effettuati studi di espressione genica (real time RTPCR) in presenza/assenza di concentrazioni sub inibenti di caspofungina, allo scopo di valutare se una sovra-espressione del gene FKS1 possa contribuire al fenotipo di resistenza/ridotta suscettibilità.

Inglese

The incidence of opportunistic fungal infections has significantly increased over the past twenty years, with a high frequency of rapidly evolving disseminated infection, especially in immunocompromised patients. The most important cause of systemic mycoses worldwide remains to be Candida spp., with C. albicans being the most common species causing invasive candidiasis. However, a marked increase in non albicans candidemia has recently been observed. Among non albicans species isolated from candidemia, C. parapsilosis has emerged as an important nosocomial pathogen and is actually the second/third most common yeast isolated from blood. Despite the clinical relevance, this species is the less studied among emerging opportunistic fungi, as demonstrated by recent molecular phylogeny studies that have reclassified C. parapsilosis intraspecific variants as separate species, Candida metapsilosis and Candida orthopsilosis. Indeed, recent retrospective studies indicate that these new species each represents 1-10% of the infection/colonization cases erroneously attributed to C. parapsilosis. The species of the psilosis complex are still indistinguishable with conventional biochemical tests and their identification is currently performed with the aid of DNA-based techniques, such as restriction profiles of SADH gene fragment with BanI or NlaIII enzymes, ITS, sequencing, pyrosequencing of a short stretch of conserved sequences, amplified fragment length polymorphism (AFLP), microarray-based systems. Little is known on the virulence properties of these fungi and on their role in the establishment/progression of the infection, as C. parapsilosis is the better characterized, even though comparative studies show differences in the pathogenicity of the psilosis complex. Pathogenetic mechanisms contributing to the development of symptomatic mycoses by these species are only partially characterized. It is known, however, that a plethora of events regulates the course of opportunistic mycoses, among which several virulence factors produced by these yeasts (particularly relevant for C. parapsilosis, adhesion, hydrolytic enzyme and biofilm production), the host immuno-reactivity, the development of drug resistance phenotypes and their reciprocal interaction.

The growing interest in investigating the clinical relevance of the opportunistic pathogens C. orthopsilosis and C. metapsilosis appears justified, in comparison with the more extensively studied C. parapsilosis.

The specific tasks that will be undertaken by the Research Project, with the contribution of 2 Research Units (RU) located in 2 Italian Universities, are summarized as follows:

1. *To validate the novel approach based on matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF) for a rapid identification of C. parapsilosis C. metapsilosis and C. orthopsilosis, and their intraspecific typing.*

2. To analyze by real-time RT-PCR the expression of TLRs, antimicrobial peptides and pro-inflammatory cytokines during the interaction between *C. parapsilosis* complex and human vascular endothelial cells lines (HUVEC), using 3D cell culture models. On the basis of the results obtained from the *in vitro* studies, diagnostic markers for early detection of *C. psilosis* complex infections could be identified.
3. To investigate the adhesive properties of the "psilosis" complex, which may influence colonization and successful permanence within the host, through an *in vitro* model of adhesion to human buccal epithelial cells (HBECs).
4. To identify genes encoding for adhesion molecules in the species belonging to the "psilosis" group. *In silico* analysis of the recently available genome sequence of *C. parapsilosis* indicated the existence of 5 potential homologues of ALS genes. These sequences will be used to investigate the presence of similar genes in *C. orthopsilosis* and *C. metapsilosis*.
5. To create knock out strains in *C. parapsilosis*, by deleting putative ALS like genes. The effect of the deletion will be evaluated *in vitro* and *in vivo*. In particular, virulence and pathogenicity of *C. parapsilosis* adhesion defective mutants will be evaluated by using an *in vivo-in vitro* urinary tract infection model of survival within murine macrophages.
6. To better characterize the reduced susceptibility of these species against echinocandis. Clinical isolates with reduced susceptibility/resistance to echinocandins will be selected and used for FKS1 sequencing. FKS1 gene expression analysis (real time RT-PCR) will also be carried out in the presence/absence of sub-inhibitory concentrations of caspofungin, to evaluate whether over expression of the gene contributes to the resistant/less susceptible phenotype.