

UNELE ASPECTE
ALE REZISTENȚEI FUNGIILOR
LA TRATAMENTUL ANTIMICROBIAN.
SINTEZA LITERATURII

Victoria BUCOV¹, Olga BURDUNIUC¹,
Greta BALAN², Olga CRACIUN¹, Maria BIVOL¹,
¹ Agenția Națională pentru Sănătate Publică,
² IP Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie
Nicolae Testemițanu

Rezumat

Articolul de față prezintă sinteza literaturii ce vizează problema legată de rezistența fungilor la preparatele antimicrobiene. Au fost analizate 120 de materiale, inclusiv documente ale Organizației Mondiale a Sănătății și publicații științifice. Este subliniată importanța rezolvării acestei probleme în cadrul Conceptului "O singură sănătate" ("One Health"). Cea mai importantă problemă este evoluția organismelor rezistente la mai multe medicamente. Mecanismele responsabile sunt caracteristice, în mare parte, atât tulpinilor rezistente, cât și celor care capătă rezistență în timpul terapiei. Mecanismele moleculare includ afinitatea modificată a medicamentului, nivelurile reduse de medicamente care pătrund intracelular (pompele de eflux și formarea biofilmelor). Noile abordări de diagnostic includ detectarea pe baza ADN-ului prin reacția de polimerizare în lanț, ce poate servi ca un instrument complementar pentru diagnosticul modern al infecțiilor fungice invazive.

Cuvinte-cheie: fungi patogeni, rezistență la preparatele antimicrobiene

Summary

Some aspects of fungal resistance to antimicrobial treatment. Review of literature

This article presents a review of the literature on the issue of fungal resistance to antimicrobial preparations. 120 materials were analyzed, including WHO documents and scientific publications. The importance of solving this problem in the One health strategy is underlined. The most important problem is the evolution of organisms resistant to several drugs. The responsible mechanisms are largely shared by both resistant strains and those that gain resistance during therapy. Molecular mechanisms include altered drug affinity, low levels of intracellularly penetrating drugs (efflux pumps, and biofilm formation). New diagnostic approaches include DNA-based detection by PCR that can serve as a complementary tool for the modern diagnosis of invasive fungal infections.

Keywords: pathogenic fungi, resistance to antimicrobial preparations

Резюме

Некоторые аспекты устойчивости грибов к противомикробному лечению. Обзор литературы

В данной статье представлен обзор литературы по проблеме устойчивости грибов к противомикробным препаратам. Было проанализировано 120 материалов, включая документы ВОЗ и научные публикации. Подчеркивается важность решения этой проблемы в стратегии "единого здравоохранения". Наиболее важной проблемой является эволюция организмов, устойчивых к нескольким лекарствам. Ответственные механизмы в значительной степени свойственны как устойчивым

штаммам, так и тем, которые приобретают устойчивость во время терапии. Молекулярные механизмы включают измененную аффинность лекарств, низкие уровни внутриклеточно проникающих лекарств (отток насосов и образование биопленки). Новые диагностические подходы включают ДНК-детекцию с помощью полимеразной цепной реакции, которая может служить дополнительным инструментом для современной диагностики инвазивных грибковых инфекций.

Ключевые слова: патогенные грибы, устойчивость к антимикробным препаратам

Introducere

Organizația Mondială a Sănătății și alte organizații internaționale elaborează programe speciale, realizarea cărora contribuie la rezolvarea problemelor majore de sănătate umană. Conceptul *O singură sănătate* (*One Health*) include proiectarea și implementarea programelor, politicilor, legislației și cercetării în care mai multe sectoare comunică și lucrează împreună pentru a obține rezultate mai bune în domeniul sănătății publice. Sectoarele de lucru în care o asemenea abordare este deosebit de relevantă sunt: siguranța alimentelor, controlul zoonozelor (anume a bolilor care se pot răspândi între animale și om, precum gripa, rabia și febra Rift Valley) și combaterea rezistenței la preparatele antimicrobiene (în cazul în care agentul patogen se modifică după ce a fost expus acțiunii antibioticelor și a devenit rezistent și, ca urmare, mai dificil de tratat) [1, 2].

Rezistența la preparatele antimicrobiene este o problemă globală în creștere, amenințând sănătatea ființelor umane și a animalelor. Această problemă ar trebui să fie gestionată din perspectiva numită „o singură sănătate” în sectoarele uman, veterinar și de mediu, cu necesitatea unei viziuni holistice asupra sănătății umane și animale, luând în considerare mediul înconjurător și condițiile naționale reale [3-6].

Fungii sunt cauze importante ale bolii în rândul organismelor din regnurile vegetal și animal, inclusiv la oameni. Deoarece utilizarea medicamentelor antifungice este răspândită atât în agricultură, cât și în medicina modernă, prevalența infecțiilor fungice rezistente a crescut considerabil. Problema creșterii rezistenței la preparatele antifungice este agravată de o pauză în elaborarea unor noi remedii ce ar avea niște mecanisme universale de acțiune. Având în vedere numărul din ce în ce mai mare de pacienți cu afecțiuni imunosupresive cronice care necesită

o terapie antifungică ca parte a tratamentului lor, există îngrijorarea că e posibil să ne apropiem nu numai de epoca postantibiotică, ci și de perioada postantifungică [7]. Aici ar trebui de menționat câteva momente importante.

Rezistența atât la speciile *Candida*, cât și la speciile *Aspergillus* a devenit o problemă globală, cauzată de introducerea și utilizarea pe scară largă a triazolilor la începutul anilor 1990 [8].

Cunoașterea rezistenței la medicamentele antifungice este o preocupare majoră a domeniului sănătății umane la nivel mondial, influențând sectorul agricol și securitatea alimentară. Pentru a rezolva aceste probleme, este importantă înțelegerea mecanismelor ce provoacă rezistență antifungică. Drept exemplu de conlucrare internațională poate servi baza de date privind rezistența antifungică la medicamente (*MARDy*), care este un serviciu web ce se referă la mecanismele rezistenței și include substituții de aminoacizi, caracteristicile genomului etc. *MARDy* este implementată pe o platformă de dezvoltare web *Linux*, *Apache*, *MySQL* și *PHP*, include o instalare locală a *BLASTn* a bazei de date cu gene curate [9]. Baza de date completă poate fi preluată, comandată la nivel de organism, genă sau medicament, informația fiind permanent completată cu rezultate noi [10, 11].

În acest context, în vederea elaborării politicilor naționale în domeniul combaterii rezistenței la preparatele antimicrobiene, este necesar de făcut primul pas, și anume de analizat situația creată în lume în domeniul abordat, este necesar de cunoscut direcțiile cercetărilor științifice și rezultatele obținute, precum și experiența țărilor privind rezolvarea problemei în cauză, ceea ce a servit drept **scop** al articolului de față.

Materiale și metode

Au fost analizate 120 de surse de informație vizând problemele rezistenței fungilor la preparatele antimicrobiene din cadrul platformelor științifice *Embase*, *PubMed*, *Hinari* și din fondurile bibliotecilor naționale. Materialele analizate includ documente ale OMS și ale altor organizații internaționale, publicații științifice din anii 1996-2020.

Rezultate și discuții

Informații generale

Regatul fungic cuprinde o enormă diversitate de taxoni cu nișe ecologice variate, strategii pentru ciclul vieții și structură morfologică. În prezent nu se cunoaște mult despre adevărata biodiversitate a ciupercilor. Din cele 1,5 milioane de specii care aparțin acestui regat, doar aproximativ 5% au fost clasificate în mod oficial. Multe ciuperci sunt paraziți pentru plante, animale, oameni și alte ciuperci.

Ciupercile patogene ale plantelor sunt capabile să producă daune și pierderi mari în agricultură și silvicultură. Unele ciuperci pot cauza boli grave la oameni, multe dintre care pot fi fatale, dacă nu sunt tratate. Acestea sunt: aspergiloza, candidoza, coccidioidomicoza, criptococcoza, histoplasmoza, micetomul, mucormicoza și paracoccidioidomicoza. Ciupercile numite *dermatofitice* și *keratinofile* pot ataca ochii, unghiile, părul, dar mai ales pielea, și pot provoca infecții locale. Ciupercile din diferite grupe taxonomice, ca și sporii fungici, sunt și cauza diferitor reacții alergice [10].

Schimbarea epidemiologiei, creșterea vitezei de rezistență și mijloacele antifungice limitate cer în continuare o atenție permanentă asupra rezistenței, în special în cele mai răspândite infecții fungice invazive, cauzate de drojdiile *Candida* și mucegiurile *Aspergillus*, cu o rată de mortalitate în țările europene egală cu 38% [12, 13]. Infecțiile cu *Candida* invazive rămân o cauză importantă a morbidității și a mortalității, în special la pacienții spitalizați și imunocompromiși sau bolnavi critici. Un număr limitat de agenți antifungici din doar câteva clase de medicamente sunt disponibili pentru a trata pacienții cu aceste infecții grave. [14, 15]. De exemplu, în România, anual sunt înregistrate în medie circa 1762 de cazuri de candidoze [15].

Morbiditatea și mortalitatea substanțiale provocate de infecțiile fungice invazive constituie dovezi incontestabile ale gravității lor. Extinderea continuă a grupelor de populație sensibile (cum ar fi persoanele imunocompromise, pacienții care suferă o intervenție chirurgicală extinsă și cei spitalizați cu boli subiacente grave, în special în unitatea de terapie intensivă) și limitările remediilor antifungice actuale din cauza problemelor de toxicitate sau a dezvoltării rezistenței, condiționează dezvoltarea unor noi medicamente antifungice [16]. Candidoza sistemică este o problemă de sănătate din ce în ce mai complicată din cauza frecvenței crescânde a infecțiilor provocate de speciile *Candida* rezistente [15, 17].

Candida dubliniensis a fost descrisă pentru prima dată în anul 1995 și este cea mai cunoscută ca patogen fungic uman predominant la pacienți cu HIV SIDA și alte grupe imunocompromise, deși în general este mai puțin prevalentă și mai puțin patogenă, comparativ cu *C. albicans*. Structura populației *C. dubliniensis* este formată din trei tipuri bine definite și este semnificativ mai puțin diversă decât *C. albicans*. Majoritatea izolatelor de *C. dubliniensis* sunt sensibile la medicamentele antifungice utilizate frecvent pentru tratarea infecțiilor cu *Candida*. Până în prezent, au fost identificate doar două modele majore de rezistență la antifungice, iar mecanismele moleculare ale acestora sunt foarte similare cu mecanismele

de rezistență descrise anterior pentru *C. albicans*. Cu toate acestea, există diferențe semnificative evidente în mecanismele predominante de rezistență la *C. dubliniensis*, diferențe ce reflectă natura sa mai clonală, prevalența sa mai scăzută și caracteristicile genomului său, a cărui secvență completă a fost determinată doar recent [18].

În ultimul deceniu, apariția bolilor fungice invazive legate de biofilme create de fungi a fost subiectul numeroaselor studii axate pe rezistența antifungică și impactul acesteia asupra terapiei specifice. Majoritatea studiilor au investigat mecanismele moleculare implicate în rezistența antifungică și patogeniza producției de biofilm de către *Candida albicans* și *Aspergillus fumigatus* – cei mai comuni agenți etiologici ai infecțiilor invazive cu drojdie și mucegai. Principalul mecanism ce caracterizează rezistența antifungică legată de biofilm este producerea matricelor extracelulare – o barieră fizică ce împiedică pătrunderea medicamentelor și exprimarea activității acestora. Cu toate acestea, supraexpunerea pompelor de eflux, modificările genetice ale țintelor medicamentoase, celulele persistente, interacțiunea sistemului imunitar biofilm – gazdă, proteinele care conduc la filamentare favorizează împreună apariția rezistenței antifungice a biofilmului. Unele dintre aceste mecanisme sunt partajate cu celulele planctonice și sunt adesea legate de fazele de dezvoltare a biofilmului. Toți factorii fizici și genetici care conduc la rezistența antifungică legată de biofilm au fost discutați pe scurt [14, 15].

Rezistența fungică la azoli devine o problemă majoră de sănătate publică în ultimii ani. Problema respectivă era cunoscută în agricultură de câteva decenii; utilizarea extensivă a acestor compuși are ca rezultat contaminarea aerului, a plantelor și a solului. Frecvența din ce în ce mai mare a infecțiilor fungice care pot pune viața în pericol și creșterea utilizării profilactice a azolilor la pacienții cu risc ridicat, luate împreună cu biologia evolutivă, dovedesc că volumul utilizat al medicamentului este un factor important în apariția și răspândirea rezistenței la fungi, poate avea ca rezultat un scenariu dramatic. Este necesar deci de revizuit utilizarea azolului în contexte agricole [19].

În ultimii ani crește rata ciupercilor patogene rezistente la numărul limitat de agenți antifungici folosiți în mod obișnuit. Azolii, de exemplu, sunt utilizați nu numai pentru îngrijirea sănătății umane și animale, ci și pentru protecția culturilor și păstrarea lemnului. Aceasta a accelerat evoluția independentă a rezistenței în mai multe medii. Una dintre consecințe este riscul din ce în ce mai mare pentru sănătatea umană din cauza agenților patogeni oportuniști, care apar în mod natural și au dobândit rezistență la un șir de substanțe chimice.

Pentru a evita un colaps global în capacitatea noastră de a controla infecțiile fungice și pentru a evita eșecurile critice privind medicamentele și securitatea alimentelor, trebuie să îmbunătățim administrarea substanțelor chimice existente, să promovăm noi descoperiri antifungice și să folosim tehnologiile emergente pentru soluții de alternativă [13, 15].

Riscurile de toxicitate a noilor compuși antifungici, împreună cu apariția rezistenței, fac utilizarea inhibitorilor de rezistență, în combinație cu preparatele antifungice, o strategie adecvată pentru dezvoltarea noilor tactici antifungice. Terapiile precum inducerea apoptozei fungice sau imunostimularea de asemenea sunt strategii bune pentru reducerea riscurilor de rezistență și pentru îmbunătățirea eficacității terapiei antifungice [20].

Rezistența antifungică continuă să crească, să se modifice și, ca urmare, se complică managementul pacientului, în ciuda introducerii unor noi agenți antifungici. Testele de sensibilitate in vitro sunt adesea folosite pentru a selecta preparate cu o acțiune eficientă în caz de o anumită infecție, dar este mai important de a folosi aceste metode pentru a detecta rezistența, cu ce se și ocupă o instituție specializată (CLSI) din SUA și Comitetul European pentru Testarea Susceptibilității Antimicrobiene (EUCAST). Metodele standardizate pentru testarea fiabilă a antifungicelor in vitro sunt acum disponibile atât în SUA, cât și în Europa [21].

Pentru terapia bolilor sunt disponibile un număr restrâns de preparate antifungice. Odată cu introducerea criteriilor de întrerupere a răspândirii epidemiologice pentru fiecare agent patogen fungic, bazate pe distribuția concentrației inhibitoare minime (MIC), a fost facilitată distincția dintre tipul sălbatic și populația rezistentă la medicamente. Rezistența fungilor a fost descrisă pentru toți agenții antifungici disponibili în prezent și au fost descifrate majoritatea mecanismelor de rezistență la nivel molecular. Dar fenomenul de toleranță la antifungice a fost o problemă mai ignorată. Este important de conștientizat faptul că toleranța la agenții antifungici favorizează apariția celulelor persistente, ce sunt capabile să supraviețuiască terapiei antifungice și pot provoca recidive [22].

În general, principala preocupare este schimbarea epidemiologiei *Candida* față de speciile mai puțin sensibile la fluconazol, combinată cu dobândirea rapidă a rezistenței la echinocandină, în special în izolatele de *C. glabrata*. Pentru *A. fumigatus*, preocuparea este apariția tulpinilor rezistente la azol în mediul înconjurător, care prezintă rezistență încrucișată la azoli în cazurile clinice și, prin urmare, prezintă provocări clinice neprevăzute în gestionarea aspergilozei invazive [12].

Raporturile speciilor non-*Candida* rezistente la azoli și ale speciilor *Candida* rezistente la multe medicamente, precum *Candida glabrata* sau, în ultimul timp, *Candida auris*, cresc cu o viteză alarmantă. În plus, apariția speciilor *Aspergillus*, care sunt rezistente la triazoli, se referă în special la faptul că azolii sunt unici pentru utilizarea orală în profilaxia și tratamentul pe termen lung al bolii fungice invazive [3, 24, 25]. Selecția iatrogenă a rezistenței atât pentru *Candida*, cât și pentru *Aspergillus* în trecut a fost restricționată, de obicei, la pacienții care au primit cursuri de tratament prelungite în stabilirea controlului surselor slabe sau a imunosupresiei severe persistente. Mai recent, aspergiloza rezistentă la azol a fost raportată pe patru continente și s-a presupus că este determinată de utilizarea agricolă a azolilor [3, 26-28]. Aceasta creează o problemă dificilă din cauza nevoii de strategii complexe de izolare, care implică reglementarea utilizării agricole a agenților antifungici.

Ultimii ani au adus rezultate semnificative în cunoașterea mai bună a bazei moleculare a rezistenței antifungice și, în general, a metabolismului ciupercilor patogene. Rezistența la medicamentele antifungice pare să se datoreze, în esență, mutațiilor apărute. În cursul tratamentului infecțiilor fungice ar trebui de utilizat instrumente de diagnostic pentru a detecta rezistența și a ajusta strategiile terapeutice [7].

Metodele de cercetare și mecanismele rezistenței

Metodele fenotipice de identificare a rezistenței antifungice sunt proceduri fiabile, iar determinarea MIC prin tehnici de referință este standardul de aur pentru detectarea izolatelor clinice de fungi rezistente. În ultimii ani s-au înregistrat progrese în ceea ce privește descrierea mecanismelor de rezistență la nivel molecular. Există metode de detectare ce pot fi utile laboratoarelor clinice, dar lipsa standardizării împiedică aplicarea lor deplină și eficientă în practica de zi cu zi. Detectarea moleculară a rezistenței *Candida* la azoli și la echinocandine și a rezistenței *Aspergillus* la triazoli poate fi relevantă din punct de vedere clinic și ar putea ajuta la elaborarea strategiilor mai eficiente de prevenire și de control [7, 10].

În ultimele două decenii au fost publicate mai multe studii ce examinează mecanismele moleculare de rezistență antifungică la speciile *Candida*. Cu toate acestea, puține dintre ele au explorat modul în care astfel de mecanisme influențează răspunsul imun al gazdei la acest patogen oportunist. Odată cu progresele recente în înțelegerea imunității gazdelor față de *Candida*, ar trebui de verificat de ce anume speciile *Candida* predomină în anumite populații de pacienți, de ce nivelurile ridicate de rezistență in vitro nu se corelează cu efectele medicamentului in vivo.

Aceasta va permite înțelegerea strategiilor imunoterapeutice eficiente pentru combaterea rezistenței la medicamente. Deși acest domeniu de cercetare este încă la început, apar două teme: imuno-evaziunea și persistența intracelulară a *C. glabrata* pot servi drept factor-cheie în capacitatea acestei specii de a persista în cursul mai multor tratamente antifungice și de a dezvolta multidrogrezistență. Totodată, schimbările din peretele celular, asociate cu rezistența antifungică, favorizează adesea evaziunea pentru răspunsul imun al gazdei [29].

În ultimii 10 ani, mecanismele moleculare ce stau la baza acestui fenomen au fost dezvăluite pe larg. Se pare că mecanismele majore de rezistență sunt semnificative din cauza dereglării genelor efectoare de rezistență antifungică. Această dereglare este o consecință a mutațiilor punctuale, care apar la regulatorii transcripționali ai acestor gene efectoare. Rezistența poate urmări, de asemenea, apariția mutațiilor punctuale direct în genele ce codifică țintele antifungice [10].

Rezistența la azoli printre speciile *Candida* și *Aspergillus* este una dintre cele mai mari provocări ale succesului clinic, urmată de echinocandină și multidrogrezistența la unele specii *Candida*, în special *Candida glabrata*. Răspândirea *Aspergillus fumigatus*, rezistentă la azoli, derivată din agricultură, și amenințările emergente, cum ar fi *Candida auris*, rezistentă la multe medicamente, sunt de asemenea alarmante. Mecanismele moleculare ce provoacă rezistență la medicamente apar în mod natural la speciile mai puțin sensibile și sunt dobândite în tulpinile de organisme sensibile. Aceste mecanisme includ interacțiuni modificate între medicamentul-țintă, concentrațiile de medicamente reduse mediate de transportatorii de eflux și barierele de permeabilitate asociate cu biofilme. Rezistența la medicamente se dezvoltă prin selectarea în trepte a mai multor mecanisme respective. Stresul celular provocat de tratamentul medicamentos creează adaptare, contribuind la rezistență. Expunerea la medicamente determină de asemenea apariția rezistenței [15, 26].

Rezistența fungilor la preparatele antimicrobiene pare a fi multifactorială, implicând atât mecanisme similare cu rezistența antifungică convențională, planctonică, cum ar fi activitatea crescută a pompei de eflux, cât și mecanisme specifice stilului de comportare al biofilmului. O proprietate unică a biofilmului este producerea unei matrice extracelulare. Două componente ale acestui material, β -glucanul și ADN-ul extracelular, promovează rezistența biofilmului la multiple antifungice. Formarea biofilmului implică, de asemenea, mai multe căi de răspuns la stres, care afectează activitatea medicamentelor-azoli. Rezistența în cadrul unui biofilm este adesea eterogenă, cu dezvoltarea unei subpopulații de celule persistente rezistente [36].

Au fost studiate mecanismele moleculare responsabile pentru rezistența la azoli în izolatele *Candida tropicalis* de la 507 pacienți cu candidoză invazivă. A fost examinată sensibilitatea la antifungice prin cercetarea și verificarea mutațiilor punctuale ale genei ERG11, care poate crea rezistență la azol. Mutațiile ERG11 au fost mecanismul principal responsabil pentru rezistență, dar supraexprimarea ERG11, CDR1 și MDR1, precum și expresia redusă a CYTb, au contribuit de asemenea la rezistență [30].

Într-un studiu au fost determinate formarea biofilmului, activitățile enzimactice extracelulare ale 182 de izolate clinice ale complexului de parapsiloză *Candida*. O combinație de mecanisme moleculare, inclusiv supraexpresia ERG11, și gene ce codifică pompele de eflux (CDR1, MDR1 și MRR1) au fost implicate în rezistența la azol în *C. parapsiloză*. Identificarea moleculară a complexului speciilor de *C. parapsiloză* a fost realizată utilizând PCR RFLP al genei SADH și secvențierea PCR a regiunii ITS. A fost evaluată susceptibilitatea izolatelor noastre la agenții antifungici și mecanismele moleculare care stau la baza rezistenței la azol [31].

Principalul mecanism ce caracterizează rezistența antifungică legată de biofilm este producerea de matrice extracelulare – o barieră fizică ce împiedică pătrunderea medicamentelor și exprimarea activității lor. Cu toate acestea, supraexprimarea pompelor de eflux, modificările genetice, celulele persistente, interacțiunea sistemului imunitar biofilm – gazdă, proteinele care conduc la filamentare, contribuie împreună la apariția rezistenței antifungice a biofilmului. Unele dintre aceste mecanisme sunt partajate cu celulele planctonice și sunt adesea legate de fazele de formare a biofilmului [32].

Modificările epigenetice, cum ar fi modificările de ADN sau cromatină, influențează nivelurile de exprimare a genelor ca răspuns la anumiți stimuli, inclusiv interacțiunea cu gazda în cazul agenților patogeni fungici. Aceste modificări pot crea rezistență la medicamente prin modificarea expresiei genelor țintă sau a genelor ce codifică pompele de eflux medicamentoase [36].

Rezistența poate fi *intrinsecă* sau *dobândită*. La *Candida*, rezistența dobândită apare ca răspuns la o presiune de selecție antifungică la un pacient separat sau, mai rar, apare din cauza transmiterii orizontale a tulpinilor rezistente între pacienți. Este în creștere multidrogrezistența la azoli, echinocandine și polene a mai multor specii *Candida*, în special *Candida glabrata*, și mai recent – *Candida auris*. Cauzele sunt consumul antifungic general, utilizarea neadecvată a medicamentelor la locurile de infecție/colonizare, sechestrarea medicamentului în matricea biofilmului și, în cazul apariției focarelor, controlul suboptim al infecției. Mai mult decât atât, cercetările recente

sugerează că mutațiile genelor respective privind ADN-ul pot facilita apariția de mutații de rezistență, în special *C. glabrata* [14].

Rezistența speciilor *Candida* și *Aspergillus* la medicamente – fie intrinsecă, fie dobândită – poate fi întâlnită la medicamentul antifungic folosit, dar și la un pacient care nu a fost tratat. Acest lucru este valabil, în special, atunci când este vorba de agenți patogeni cu rezistență dobândită, care nu poate fi prezisă la identificarea speciei. Acest scenariu este deosebit de relevant pentru infecțiile cu *A. fumigatus*, din cauza prevalenței crescânde a izolatelor rezistente la azoli în mediu [34].

Diferite mecanisme pot duce la rezistența dobândită a speciilor *Candida* la medicamentele-azoli, cea mai frecventă fiind inducerea pompelor de eflux codificate de genele MDR sau CDR și achiziționarea unor mutații punctuale în gena ce codifică enzima (ERG11). Rezistența dobândită a speciilor *Candida* față de echinocandine este, de obicei, mediată prin apariția mutațiilor punctuale în genele FKS, care codifică subunitatea principală a enzimei-țintă. Rezistența antifungică este asociată cu concentrații inhibitorie minime crescute, rezultate clinice mai slabe și infecții intercurente în timpul tratamentului și al profilaxiei antifungice. Candidemia cauzată de *Candida glabrata* devine din ce în ce mai frecventă, iar izolatele *C. glabrata* sunt tot mai rezistente atât la agenții antifungici azoli, cât și la echinocandină. Ratele de *Aspergillus fumigatus* rezistente la azoli sunt în prezent scăzute, dar există rapoarte de rezistență emergentă, inclusiv izolații rezistente la mai mulți azoli în unele părți ale Europei [21].

Un mecanism care duce la recalitranta medicamentoasă este formarea celulelor persistente antifungice. Aceste celule au un genotip sălbatic, cu capacitatea de a supraviețui expunerii la agenți antifungici datorită compoziției membranei modificate, răspunsului reglat la stres și integrității sporite a peretelui celular. Cunoașterea mecanismelor ce reglementează intrarea și ieșirea fenotipului persistent este limitată, dar recent s-a demonstrat că inhibarea căii TORC1 ce reglează creșterea produce persistență fungică. Proprietățile fenotipice ale celulelor persistente și implicarea căii TORC1 demonstrează că celulele persistente sunt încetinite în perioada G0 a ciclului celular. Se poate presupune că mecanismele de toleranță comună identificate pot servi drept fundament pentru dezvoltarea noilor strategii de tratament [35]. A fost demonstrat că rezistența este cauza unei mutații homozigote în FKS1 din *Candida tropicalis*, ceea ce duce la o schimbare de aminoacizi corespunzătoare unei S645P cunoscute în *Candida albicans* [12].

Preparate antifungice cu acțiune nouă

Un program eficient de terapie antifungică este esențial pentru controlul rezistenței la medicamente

și ar trebui să includă un diagnostic rapid al fungilor, monitorizare terapeutică a medicamentelor și intervenție clinică. Dezvoltarea unor instrumente și strategii de diagnostic mai bune, care permit utilizarea orientată a preparatelor antifungice, este esențială pentru a păstra eficacitatea medicamentelor [36]. Toate infecțiile fungice grave au nevoie de terapie antifungică adecvată. Doar câteva clase de antifungice sunt disponibile, astfel că apariția rezistenței la clasele de medicamente unice și, actualmente, multidrogrezistența împiedică managementul pacientului. Identificarea unor noi antifungice se realizează în esență prin screeningul colecțiilor de compuși chimici naturali sau sintetici. Descoperirea noilor ținte antifungice posibile are loc prin abordări la nivelul genomului, pentru o mai bună înțelegere a biologiei fungilor patogeni [10].

Proprietățile antifungice ale peptidelor macrociclice au fost cercetate împotriva unui șir de izolate clinice ale speciilor *Candida albicans* și *non-albicans*. Rhesus θ -defensin 1 (RTD-1), prototipul θ -defensin, a fost un fungicid rapid și puternic împotriva tulpinilor. Acțiunea antifungică a avut loc prin permeabilizarea celulară, care a fost corelată temporal cu eliberarea de ATP și cu acumularea intracelulară a speciilor reactive de oxigen (ROS). Nimicirea prin RTD-1 a fost comparată cu cea cu histatină 5 (Hst 5) – o peptidă anticandida caracterizată pe larg, exprimată în saliva umană. RTD-1 a ucis *C. albicans* mult mai repede și la o concentrație de 200 de ori mai mică decât cea a Hst 5. Spre deosebire de Hst 5, activitatea anticandida a RTD-1 a fost independentă de producția de ATP mitocondrial. Mai mult, RTD-1 a fost pe deplin rezistent la proteazele *Candida* timp de 2 ore în condiții de degradare rapidă și completă a Hst 5. MIC-urile și concentrațiile minime de fungicide (MFC) de 14 izoforme naturale θ -defensine împotriva *C. albicans* rezistente la medicamente sunt mai active decât amfotericina B și/sau caspofungina împotriva organismelor rezistente la fluconazol, inclusiv MDR *Candida auris*. Aceste rezultate indică potențialul defens-defensinelor macrociclice ca șabloane structurale pentru proiectarea terapiei antifungice [17].

Caracteristicile-cheie ale patogenezii infecțiilor fungice, inclusiv formarea filamentului, sunt exprimate în anumite nevertebrate și gazde-mamifere. Printre diferite gazde potențiale, *C. elegans* oferă o platformă atractivă atât pentru studiul interacțiunilor gazdă – patogen, cât și pentru identificarea unor noi agenți antifungici. Avantajele screeningului compusului în acest context animal, simplu, relativ ieftin și nu la fel de contestat din punct de vedere etic, includ evaluarea simultană a eficacității și a toxicității antifungice, care ar putea duce la identificarea compuşilor cu mecanisme de acțiune distincte, de exemplu, prin promovarea răspunsurilor imune ale

gazdei sau prin împiedicarea factorilor de virulență fungică. [16].

A fost studiată activitatea antifungică sporită a nanoparticulelor de argint biosintetizate prin filtrarea fără celule a *Trichoderma viride* (MTCC 5661), în comparație cu nanoparticulele de argint sintetizate chimic (CSNP) de formă și dimensiuni similare. S-a observat activitatea antifungică sporită a nanoparticulelor de argint biosintetizate, în comparație cu cele sintetizate chimic [36]. Așadar, sunt utilizate diferite abordări în vederea obținerii substanțelor active antifungice, cu utilizarea metodelor moderne originale.

Concluzii

Se poate concluziona că terapia antifungică este o componentă centrală a managementului pacienților cu micoze acute sau cronice. Cu toate acestea, opțiunile de tratament sunt restricționate din cauza numărului redus de medicamente antifungice. Managementul clinic al bolilor este în continuare compromis de apariția rezistenței la medicamente. Odată considerată o întâmplare rară, rezistența la medicamentele antifungice este în creștere în multe centre medicale, având un risc ridicat.

Cea mai importantă problemă este evoluția organismelor rezistente la mai multe medicamente. Mecanismele responsabile sunt caracteristice, în mare parte, atât tulpinilor rezistente ce prezintă o susceptibilitate redusă în mod inerent, cât celor care obțin rezistență în timpul terapiei. Mecanismele moleculare includ afinitatea modificată a medicamentului și abundența-țintă, nivelurile reduse de medicamente ce pătrund intracelular (pompele de eflux și formarea biofilmelor). Noi perspective sunt legate de factorii genetici care reglementează aceste mecanisme, precum și de factorii celulari, de importanța testării susceptibilității tuturor izolatelor de la bolnavii cu infecții fungice prin metode de referință sau validate. Mai mult, sunt justificate noi abordări de diagnostic pentru agenții patogeni necultivați și, în special, detectarea pe baza ADN-ului prin PCR poate servi ca un instrument complementar în diagnosticul modern al infecțiilor fungice invazive.

Bibliografie

1. One Health / O sănătate. Disponibil pe: <https://www.who.int/features/qa/one-health/en/>
2. ECDC Technical Report. *ORT Towards One Health preparedness*. Expert consultation. 11–12 December 2017. 22 p.
3. Ellen Trane Nørby, Esben Lunde Larsen. *One Health Strategy against antibiotic resistance in Denmark*. 2017. 10 p.
4. Antti Hakanen, Jari Jalava, Liisa Kaartinen. *National action plan on antimicrobial resistance 2017–2021*. Helsinki, 2016. 56 p.

5. Sixty-Seventh World Health Assembly. *Antimicrobial resistance*. Disponibil pe: http://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/WHA67/A67_R25-en.pdf?ua=1&ua=1
6. Global action plan on antimicrobial resistance, WHO. Disponibil pe: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/193736/1/9789241509763_eng.pdf?ua=1
7. Guyatt G.H., Oxman A.D., Vist G.E., et al. GRADE: an emerging consensus on rating quality of evidence and strength of recommendations. In: *BMJ*. 2008, nr. 336, p. 924.
8. Vermes A., Guchelaar H.J., Dankert J. Flucytosine: a review of its pharmacology, clinical indications, pharmacokinetics, toxicity and drug interactions. In: *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2000, vol. 46, nr. 2, pp. 171-179.
9. *Mycology Antifungal Resistance Database*. Disponibil pe: <http://www.mardy.net>
10. Patrick Vandeputte, Selene Ferrari, Alix T. Coste. Antifungal Resistance and New Strategies to Control Fungal Infections. In: *International Journal of Microbiology*. 2012, vol. 2012(3), 26 p.
11. Anthony Nash, Thomas Sewell, Rhys A. Farrer. MARDy: Mycology Antifungal Resistance Database. In: *Bioinformatics*. 2018, vol. 34(18), pp. 3233-3234.
12. Rasmus Hare Jensen. Resistance in Human Pathogenic Yeasts and Filamentous Fungi: Prevalence, Underlying Molecular Mechanisms and Link to the Use of Antifungals in Humans and the Environment. In: *Dan. Med. J.* 2016, vol. 63(10): B5288.
13. Tortorano A.M. Abstract, 20008. No: S 315. In: *18th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. April 19-22, 2008, Barcelona, Spain.
14. Maiken Cavling Arendrup, Thomas F Patterson. Multidrug-Resistant Candida: Epidemiology, Molecular Mechanisms, and Treatment. In: *J. Infect. Dis.* 2017, vol. 216 (suppl. 3), pp. 445-451.
15. Fendrihan Sergiu. *Date clinice, epidemiologice și de laborator în infecțiile cu levuri din genul Candida pentru optimizarea diagnosticului hepatitelor de tip B și C*. București, 2016. 42 p.
16. Cleo G. Anastassopoulou, Beth Burgwyn Fuchs, Eleftherios Mylonakis. Caenorhabditis Elegans-Based. Model Systems for Antifungal Drug Discovery. In: *Curr. Pharm. Des.* 2011, vol. 17(13), pp. 1225-1233.
17. Elisa Borghi, Francesca Borgo, Giulia Morace. Fungal Biofilms: Update on Resistance. In: *Adv. Exp. Med. Biol.* 2016, nr. 931, pp. 37-47.
18. David C. Coleman, Gary P. Moran, Brenda A. McManus, Derek J. Sullivan. Mechanisms of Antifungal Drug Resistance in Candida Dubliniens. In: *Future Microbiol.* 2010, vol. 5(6), pp. 935-949.
19. Maria-Manuel Azevedo, Isabel Faria-Ramos, et al. Genesis of Azole Antifungal Resistance From Agriculture to Clinical Settings. In: *J. Agric. Food Chem.* 2015, vol. 63(34), pp. 7463-7468.
20. Matthew C. Fisher, Nichola J. Hawkins, Dominique Sanglard, Sarah J Gurr. Worldwide Emergence of Resistance to Antifungal Drugs Challenges Human Health and Food Security. In: *Science*. 2018, vol. 360(6390), pp. 739-742.
21. J.A. Reales-Calderón, Gl. Molero, C. Gil, J.L. Martínez. The Fungal Resistome: A Risk and an Opportunity for the Development of Novel Antifungal Therapies. In: *Future Med. Chem.* 2016, vol. 8(12), pp. 1503-1520.
22. Michael A. Pfaller. Antifungal Drug Resistance: Mechanisms, Epidemiology, and Consequences for Treatment. In: *Am. J. Med.* 2012, vol. 125(1), pp. 3-13.
23. Rasmus Hare Jensen. Resistance in Human Pathogenic Yeasts and Filamentous Fungi: Prevalence, Underlying Molecular Mechanisms and Link to the Use of Antifungals in Humans and the Environment. In: *Dan. Med.* 2016, vol. 63(10): B5288.
24. Coman I., Constantin M., Rogut O., Gogu M. *Etiologia și terapia infecțiilor fungice*. Iași: Performantica, 2012.
25. Cornely O.A., Maertens J., Winston D.J. Posaconazole vs. fluconazole or itraconazole prophylaxis in patients with neutropenia. In: *N. Engl. J. Med.* 2007, nr. 356, pp. 348-359.
26. Denning D.W. Echinocandins and pneumocandins – a new antifungal class with a novel mode of action. In: *J. Antimicrob. Chemother.* 1997, nr. 40, pp. 611-614.
27. Denning D.W., Venkateswarlu K., Oakley K.L., et al. Itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus*. In: *Antimicrob. Agents Chemother.* 1997, nr. 41, pp. 1364-1368.
28. Espinel-Ingroff A. Comparison of in vitro activities of the new triazole SCH56592 and the echinocandins MK-0991 (L-743,872) and LY303366 against opportunistic filamentous and dimorphic fungi and yeasts. In: *J. Clin. Microbiol.* 1998, nr. 36, pp. 2950-2956.
29. Russell E. Lewis, Pierluigi Viale, Dimitrios P. Kontoyianis. The Potential Impact of Antifungal Drug Resistance Mechanisms on the Host Immune Response to Candida. In: *Virulence*. 2012, vol. 3(4), pp. 368-376.
30. X. Fan, M. Xiao, D. Zhang, et al. Molecular Mechanisms of Azole Resistance in Candida Tropicalis Isolates Causing Invasive Candidiasis in China. In: *Clin. Microbiol. Infect.* 2019, vol. 25(7), pp. 885-891.
31. S. Neji, I. Hadrich, H. Trabelsi, et al. Virulence Factors, Antifungal Susceptibility and Molecular Mechanisms of Azole Resistance Among Candida Parapsilosis Complex Isolates Recovered From Clinical Specimens. In: *J. Biomed. Sci.* 2017, vol. 24(1), p. 67.
32. Elisa Borghi, Francesca Borgo, Giulia Morace. Fungal Biofilms: Update on Resistance. In: *Adv. Exp. Med. Biol.* 2016, nr. 931, pp. 37-47.
33. Leah E. Cowen, Dominique Sanglard, Susan J. Howard, P. David. Mechanisms of Antifungal Drug Resistance Affiliations expand Cold Spring. In: *Harb. Perspect. Med.* 2014, vol. 5(7): a019752.
34. Rasmus Bojsen, Birgitte Regenber, Anders Folkesson. *Persistence and Drug Tolerance in Pathogenic Yeast*. 2017. Disponibil pe: https://www.researchgate.net/scientific-contributions/2023662240_Rasmus_Bojsen
35. Heather T. Taff, Kaitlin F. Mitchell, Jessica A. Edward, David R. Andes. Affiliations expand. Mechanisms of Candida Biofilm Drug Resistance. In: *Future Microbiol.* 2013, vol. 8(10), pp. 1325-1337.
36. Madhuree Kumari, Ved P. Giri, Shipra Pandey et al. An Insight into the Mechanism of Antifungal Activity of Biogenic Nanoparticles Than Their Chemical Counterparts. In: *Pestic. Biochem. Physiol.* 2019, nr. 157, pp. 45-52.

Victoria Bucov, dr. hab. șt. med.,
 profesor universitar,
 Agenția Națională pentru Sănătate Publică,
 tel.: 022 574 587; 079261188,
 e-mail: v.e.bucova@gmail.com