

Różnicowanie fenotypowe i genotypowe drożdży z rodzaju *Candida* izolowanych z kału zwierząt mięsożernych (psów i kotów).

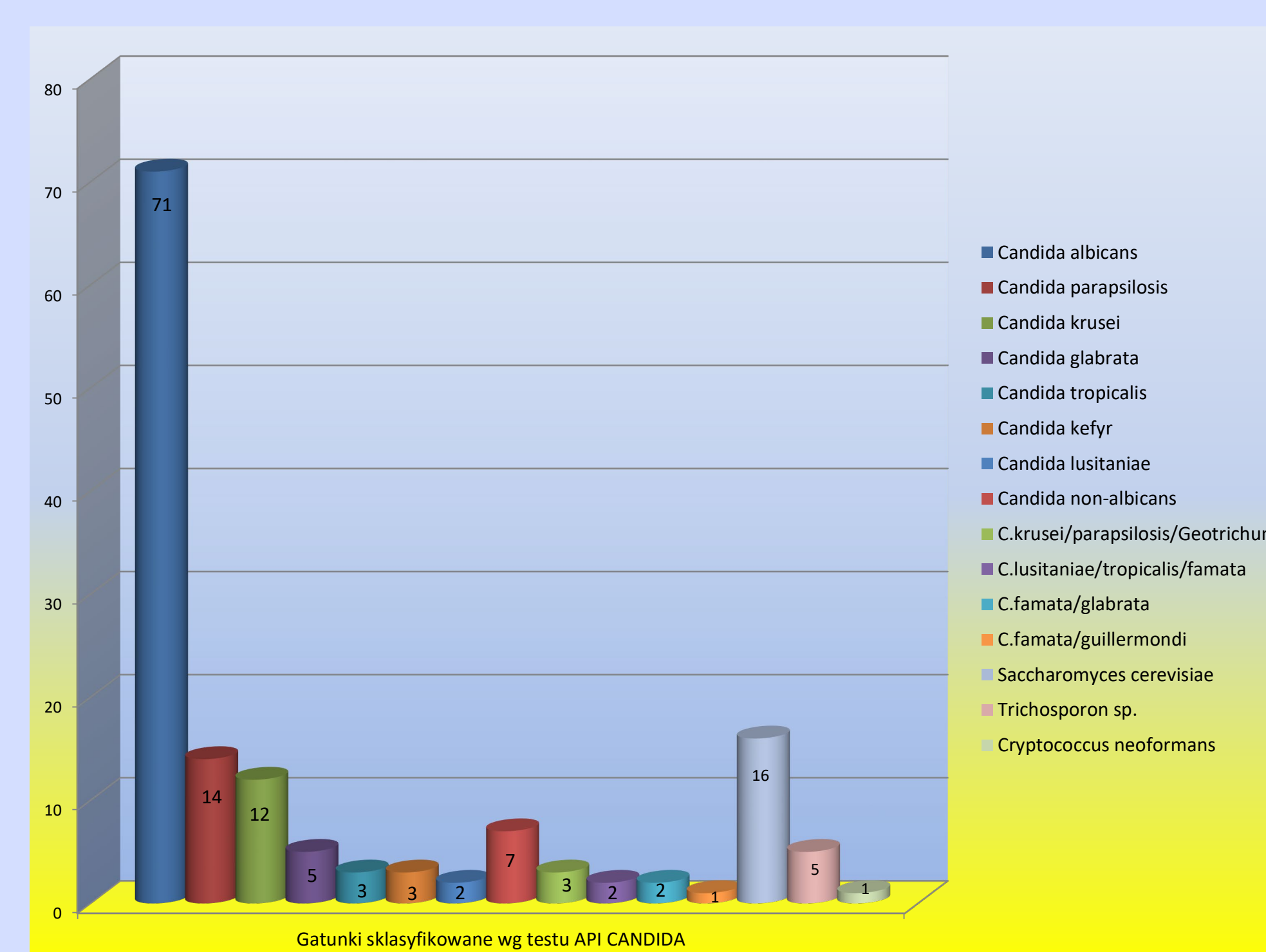
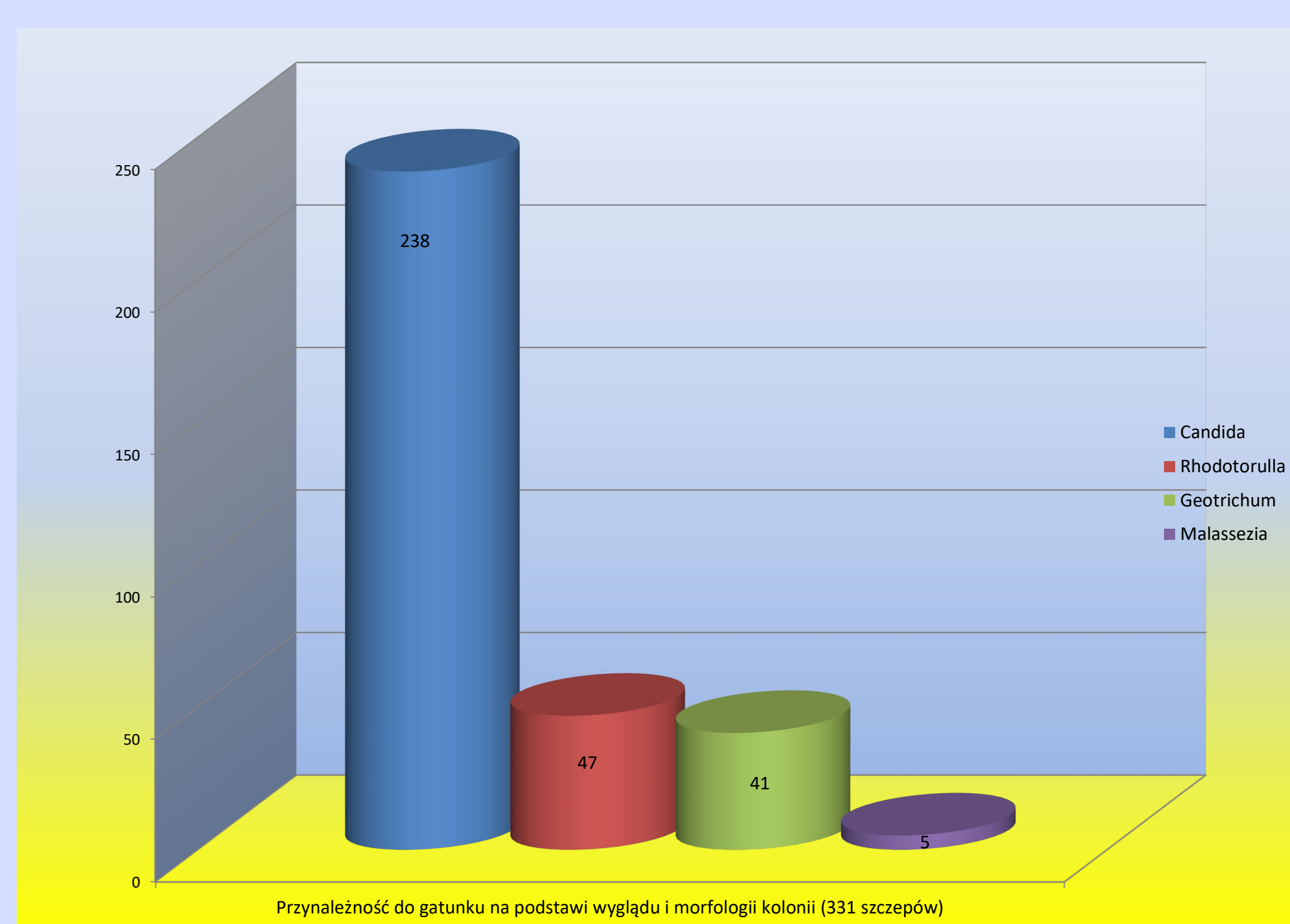
Altrych Paulina¹ Krutkiewicz Alicja¹ Klockiewicz Maciej² Dworecka-Kaszak Bożena¹

Zakład Mykologii¹, Zakład Parazytologii i Inwazjologii², Katedra Nauk Przedklinicznych,
Szkola Główna Gospodarstwa Wiejskiego, ul. Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa

Wstęp Grzyby z rodzaju *Candida* sp. mogą występować u osobników zdrowych jako składnik stałej, endogennej bioty, zasiedlając głównie błony śluzowe organizmu, w tym również przewodu pokarmowego. Wśród komensalnych gatunków znajdują się także potencjalnie chorobotwórcze *C.albicans*, *C.parapsilosis* czy *C.tropicalis*. Obok tradycyjnych metod fenotypowego różnicowania gatunków stosuje się coraz bardziej powszechne metody oparte o różnice w genomie. Najczęściej sekwencjonowane obecnie fragmenty DNA grzybów to Regiony ITS (Internal Transcribed Spacer), charakteryzujące się dużą zmiennością wewnątrzgatunkową i stanowiące podstawę systematyki molekularnej na poziomie gatunku.

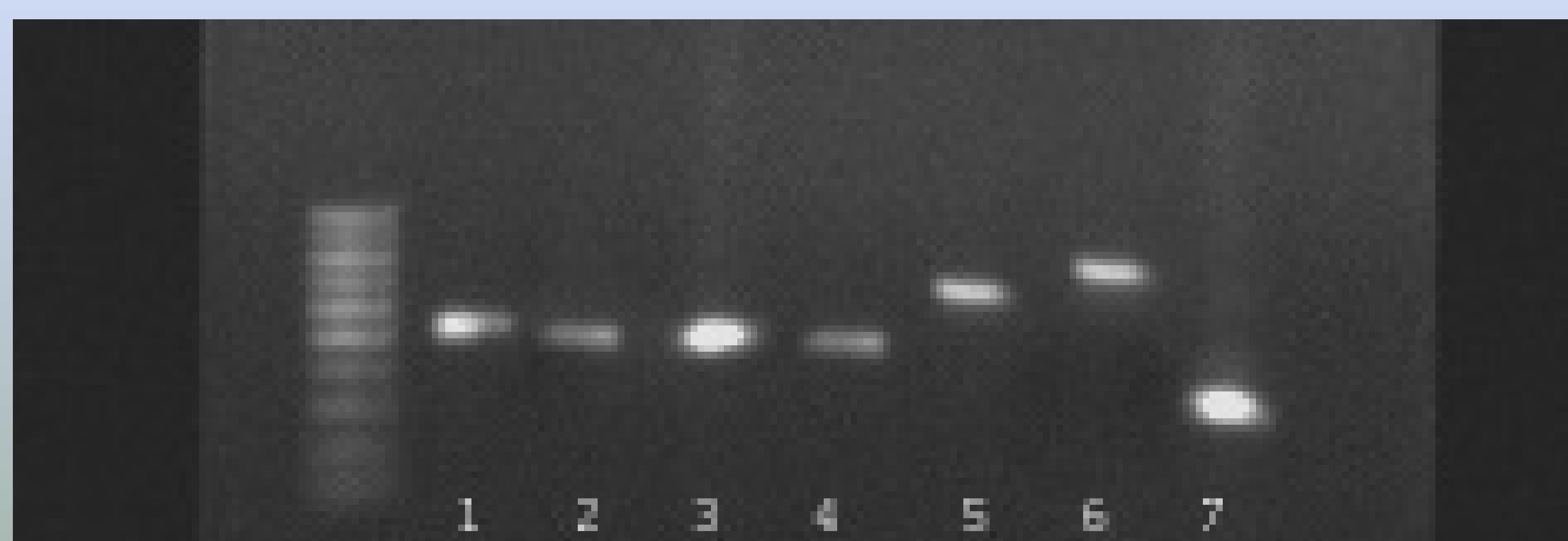
Materiał i metody Próbkę kału pozyskiwano od psów i kotów. Z każdej próbki wykonywano preparat bezpośredni celem obserwacji obecności komórek drożdżopodobnych oraz wykonywano posiew na podłoże mykologiczne Sabouraud, inkubowano w temp. 30°C przez 72 godziny. Hodowle oceniano na podstawie makroskopowych cech kolonii oraz mikroskopowej morfologii blastospor. Wykonywano test filamentacji, wynik dodatni uważano za przynależność do gatunku *C.albicans*. Identyfikację fenotypową przeprowadzono na podstawie testu API CANDIDA (bioMerieux). Przy użyciu zestawu do izolacji DNA z drożdży Genomic Mini AX YEAST wyizolowano DNA ze wszystkich szczepów o potwierdzonej przynależności do z rodzaju *Candida*. Stosując uniwersalne dla grzybów startery ITS1 - 5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3' ITS4 - 5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3' przeprowadzono reakcję amplifikacji. Uzyskano produkt zawierający region ITS1, gen rDNA 5,8S oraz ITS2, który wizualizowano przeprowadzając elektroforezę w 0,8% żelu agarozowym. Porównywano wielkość uzyskanych amplikonów w obrębie jednego gatunku, jak również analizowano różnice w wielkości uzyskanego produktu w zależności od gatunku, z którego pochodziło DNA. Przeprowadzono trawienie uzyskanych produktów reakcji amplifikacji celem rozróżnienia poszczególnych gatunków. Do analizy restrykcyjnej użyto enzymów *DdeI* i *HpaII* dobranych na podstawie analizy sekwencji nukleotydów. Produkty trawienia rozdzielono elektroforetycznie i przeanalizowano różnice we wzorach prążków.

Wyniki Przebadano 723 próbki kału, z czego 348(48%) pochodziło od psów, a 375(52%) od kotów. Z 238(33%) próbek wyizolowano szczepy wstępnie zakwalifikowane do rodzaju *Candida* sp. Na podstawie cech fenotypowych wykazano obecność innych grzybów drożdżopodobnych – *Malassezia* sp.5(0,7%), *Rhodotorulla* sp.47(6,5%) oraz *Geotrichum* sp.41(5,7%) Na podstawie testów API CANDIDA zidentyfikowano szczepy z rodzaju *Candida* sp. 128(85,3%): *C.albicans* 71(47,3%), *C.parapsilosis* 14(9,3%), *C.krusei* 12(8%), *C.glabrata* 5(3,3%), *C.tropicalis* 3(2%), *C.kefyr* 3(2%), *C.lusitaniae* 2(1,3%), *C.non-albicans* 7(4,6%), *C.krusei/parapsilosis/Geotrichum* 3(2%), *C.lusitaniae/tropicalis/famata* 2(1,3%), *C.famata/glabrata* 2(1,3%), *C.famata/guillermondi* 1(0,6%), oraz z gatunków *Saccharomyces cerevisiae* 16(10,6%), *Trichosporon* spp. 5(3%), *Cryptococcus neoformans* 1(0,6%). Wyizolowano DNA ze wszystkich 128 szczepów i po przeprowadzeniu reakcji amplifikacji z użyciem odpowiednich starterów analizowano różnice w wielkości uzyskanych produktów. Przeprowadzona analiza restrykcyjna umożliwiła różnicowanie gatunków na podstawie analizy wielkości prążków. Na podstawie wielkości amplikonu będącego produktem reakcji PCR z użyciem uniwersalnych starterów ITS1 i ITS4 możemy jednoznacznie zidentyfikować 3 gatunki: *C.glabrata* (881pz), *C.kefyr*(721pz), *C.lusitaniae*(341pz), wzory prążków należących do poszczególnych izolatów z gatunków *C.albicans*(536pz), *C.krusei*(509pz), *C.parapsilosis*(546pz), *C.tropicalis*(554pz) wykazują minimalne różnice– co obrazuje ryc.1. Jednakże analiza restrykcyjna z użyciem odpowiednich enzymów pozwala na różnicowanie gatunkowe. Po przeprowadzeniu trawienia z użyciem enzymów *DdeI* i *HpaII* uzyskano prążki o wielkościach: *C.albicans* (297pz,121pz,118pz), *C.krusei* (260pz,249pz), *C.parapsilosis* (546pz), *C.glabrata* (465pz,320pz,51pz,45pz), *C.tropicalis* (367pz,118pz,69pz), *C.lusitaniae* (242pz,98 pz), *C.kefyr* (549pz,172pz) – co obrazuje ryc.2. Wśród zebranych 3 izolatów zakwalifikowanych do gatunku *C.famata* ustalonego na podstawie testu API CANDIDA, zaobserwowano różnice w wielkość fragmentu zawierającego region ITS1, gen rDNA 5,8S oraz ITS2, po zsekwencjonowaniu analizowanego fragmentu zakwalifikowano dwa szczepy do gatunku *C.lusitaniae*, jeden do gatunku *C.lipolytica* co wskazuje na małą przydatność testu API CANDIDA do różnicowania tego gatunku.



Wnioski

- Grzyby z rodzaju *Candida* sp. mogą występować w kale psów i kotów nie wykazujących objawów klinicznych ze strony przewodu pokarmowego.
- Najbardziej rozpowszechnionym gatunkiem jest *C.albicans*.
- Fenotypowa Klasyfikacja grzybów z rodzaju *Candida* nie zawsze jest zgodna z identyfikacją genotypową.



Ryc.1 Elektroforeza w 0,8% żelu agarozowym barwionym bromkiem etydyny, produkt reakcji PCR z użyciem starterów ITS 1 i ITS 4
1 - *C.albicans* 2 - *C.krusei* 3 - *C.parapsilosis* 4 - *C.tropicalis* 5 - *C.kefyr* 6 - *C.glabrata* 7 - *C.lusitaniae*



Ryc 2 Elektroforeza z 2% żelu agarozowym barwionym bromkiem etydyny, produkt trawienia enzymami *DdeI* i *HpaII*
1 - *C.albicans* 2 - *C.krusei* 3 - *C.parapsilosis* 4 - *C.glabrata* 5 - *C.tropicalis* 6 - *C.lusitaniae* 7 - *C.kefyr*