

Identificarea fenotipică și moleculară a unor tulpini de *Candida spp.* izolate din infecții nosocomiale

SIMONA SOARE¹, MARIANA CONSTANTIN^{*2}, OLGUȚA DRACEA²,
RODICA OANCEA¹, ELENA- CARMINA DRĂGULESCU¹, IRINA CODIȚĂ²

(1) *Facultatea de Biologie, Universitatea din București, România*

(2) *I.N.C.D.M.I Cantacuzino, București*

Primit (Received): 19.09.2008 / Acceptat (Accepted): 07.10.2008

Phenotypic and molecular identification of some *Candida spp.* strains isolated from nosocomial infections

Abstract: The genus *Candida* contains ubiquitous species, widespread in various ecological niches. Out of the opportunistic *Candida* species, the most common agent infecting the immunodeficient human body is *Candida albicans*, causing superficial and deep infections. This species is also involved in nosocomial infections. *Aim.* The phenotypic identification and initiation of a molecular model to identify *C. albicans* strains isolated from nosocomial infections between 2005 and 2007. *Material and method.* Fifteen *C. albicans* strains isolated from sputum, blood culture, bronchial secretions and wounds were identified by phenotypic methods through cultivation on specific growth media, macroscopic and microscopic culture examination, germ tube test, chlamydoconidia formation, as well as biochemical commercial kits and/or automatic methods: Api 20C AUX, ID32C, Vitek 2. The isolation and purification of the chromosomal DNA was performed using a technique optimized according to Ausubel (1995). The purity and integrity of DNA extracts was checked up by nucleic acid electrophoresis and spectrophotometric analysis; 5,8S rDNA was amplified and amplification products digested with *Msp* I restriction enzyme. *Results.* It was found that 13 out of the 15 strains identified as *C. albicans* by phenotypic methods revealed identical restriction patterns to the positive control, *Candida albicans* ATCC 10231. The other two strains exhibited different restriction patterns as compared to the control strain. *Discussions.* These results are pleading for the need of molecular methods for certain identification of *Candida* strains.

Keywords: nosocomial infections, *Candida spp.*, molecular identification, 5,8S rDNA

Rezumat: Genul *Candida* cuprinde specii ubicvitare, larg răspândite în diferite nișe ecologice. Dintre speciile oportuniste ale genului *Candida*, *Candida albicans* afectează cel mai frecvent organismul uman aflat în disfuncție imunitară, determinând infecții superficiale și profunde. Această specie poate fi implicată și în infecții nosocomiale. *Scop.* Identificarea fenotipică și inițierea unui model de identificare moleculară a unor tulpini de *C. albicans* izolate din infecții nosocomiale în perioada 2005 – 2007. *Material și metodă.* Au fost investigate 15 probe de spută, hemoculturi, aspirate bronșice și secreții de plagă. Identificarea fenotipică s-a efectuat prin cultivare pe medii specifice, examinare macroscopică și microscopică a culturii, testul de filamentare în ser, evidențierea clamidosporilor, precum și cu ajutorul testelor rapide și/sau automate: API 20C AUX, ID32C, Vitek 2. Identificarea prin metode moleculare s-a realizat prin izolarea și purificarea ADN-ului cromozomal utilizând o tehnică adaptată după Ausubel (1995). Verificarea purității și integrității extractelor de ADN s-a făcut prin electroforeza acizilor nucleici și analiza spectrofotometrică a extractelor de acizi nucleici; a fost amplificată gena pentru ARNr 5,8S, iar restricționarea ampliconilor ARNr 5,8S s-a făcut cu enzima *Msp*I. *Rezultate.* S-a constatat că 13 dintre cele 15 tulpini încadrate de noi prin metode fenotipice în specia *C. albicans* au prezentat *pattern*-uri de restricție identice cu *Candida albicans* ATCC 10231, utilizată ca martor pozitiv. Restul de 2 tulpini au prezentat *pattern*-uri diferite de restricție față de tulpina martor. *Discuții.* Aceste rezultate pledează pentru necesitatea utilizării metodelor moleculare în identificarea de certitudine a speciilor de *Candida*.

Cuvinte cheie: infecții nosocomiale, *Candida spp.*, identificare moleculară, 5,8S ADN

* Mariana Constantin, INCDIM Cantacuzino, Splaiul Independenței 105, 050096-București (Romania);
Phone: +40722166883; Email: marriconstantin@yahoo.com

Introducere

Genul *Candida* aparține clasei *Deuteromycetes* (funghi imperfecti) și cuprinde specii ubicvitare, cu o largă răspândire în diferite nișe ecologice (1, 2). Dintre speciile genului *Candida*, *Candida albicans* este cea mai studiată datorită potențialului ei patogen ridicat, în special asupra organismului uman. Statusul fiziologic al gazdei reprezintă primul factor care influențează etiologia candidozelor. În acest sens s-a constatat că simple modificări ale acestuia sunt capabile să determine conversia la patogenitate a speciilor din genul *Candida*. Această evoluție se află sub influența unor factori de virulență și patogenitate care permit acestor microorganisme să adere, să colonizeze, să invadeze și în final să disemineze în organismul gazdă aducând acestuia prejudicii majore care pot culmina chiar cu moartea individului.

Printre aceste mecanisme ale patogenității și virulenței se numără dimorfismul celular, capacitatea de a sintetiza molecule cu rol în procesul de aderență, sinteza și secreția unor enzime litice care permit invadarea țesuturilor gazdei (proteinaze, fosfolipaze, lipaze, esteraze, factorul hemolitic), imunomodularea sistemului imunitar precum și rezistența crescută la diferite clase de compuși antifungici.

Material și metodă

1. Tehnici convenționale de identificare a levurilor (identificare fenotipică)

Au fost investigate 15 probe de spută, hemoculturi, aspirate bronșice și secreții de plagă. Însămânțarea s-a efectuat pe Agar Sabouraud cloramfenicol, iar incubarea la 28° și 37° C, 24-48 h, observându-se apoi caracterele de cultivare.

Pentru evidențierea caracterelor microscopice s-au realizat frotiuri utilizându-se colorația cu albastru de metilen. În ceea ce privește identificarea taxonomică preliminară a acestor microorganisme aceasta a fost realizată prin utilizarea testelor comerciale manuale sau automate API 20C AUX, ID32C, Vitek 2. Ca investigații suplimentare s-au utilizat testul de filamentare prin incubare în ser sanguin timp de 2 ore, la temperatura de 37°C.

1. Tehnici moleculare de identificare a levurilor

Caracteristicile morfologice și biochimice ale microorganismelor au fost utilizate pentru a se realiza o identificare preliminară a acestor microorganisme, însă pentru identificarea taxonomică finală s-a trecut la utilizarea testelor

moleculare, teste care au vizat: izolarea și purificarea ADN nuclear, amplificarea genei pentru ARNr 5.8S, obținerea profilurilor de restricție a ampliconului genei pentru ARNr 5.8S (3-7).

Izolarea și purificarea ADN cromozomal s-a realizat printr-o tehnică adaptată, stabilindu-se condițiile specifice optime pentru următoarele etape: (a) digestia enzimatică a peretelui celular utilizând concentrații caracteristice de enzimă (liticaza) și timpi variabili de incubare; (b) deproteinizare a lizatului celular. Tulpinile de levuri au fost cultivate pe mediul YPG timp de 18 ore. Pereții celulari au fost labilizați prin tratament cu 4 μl β-mercaptoetanol și incubare 30 minute la 37°C. Protoplastii levurici au fost obținuți prin tratament cu liticază în concentrație finală de 1,5mg/ml și incubare 90 minute la 37°C (8,9).

Îndepărtarea membranei celulare a fost realizată utilizându-se soluție TEG la care s-a adăugat 33 μl soluție SDS 10% (detergent ce distruge membrana celulară, producând liza celulară completă) și 20μl soluție KCl 2,5 M.

Deproteinizarea lizatului celular s-a realizat în mai multe etape: a) enzimatică - cu proteinaza K, până la o concentrație finală de 200 μg/ml și incubare 30 minute la 37°C; b) chimică - adăugarea unui volum aproximativ egal de amestec fenol: cloroform: alcool isoamilic (25: 24:1 raporturi volumetrice).

Îndepărtarea ARN cu masă moleculară mare și precipitarea ADN cromozomal. Supernatantul reprezentat de acizii nucleici a fost supus unui tratament enzimatic cu RNA-ază A până la o concentrație finală de 100 μg/ml pentru îndepărtarea moleculelor de ARN. Pentru precipitarea ADN-ului s-a folosit alcool izopropilic (la temperatura camerei), agitare ușoară prin inversarea tubului și incubare 15 minute la temperatura camerei. ADN cromozomal a fost sedimentat prin centrifugare 15 minute la 15000 rpm și resuspendat în 20 μl soluție TE. Probele s-au stocat la 4°C.

Verificarea purității și integrității extractelor de ADN

1. Electroforeza acizilor nucleici

Verificarea integrității acizilor nucleici izolați (ADN cromozomal) și a eficienței tratamentului cu RNAază A, s-a realizat prin electroforeză în gel de agaroză în sistem submers. S-a utilizat o agaroză de concentrație 0,8% într-un tampon de TBE 1x. Probele de ADN au fost amestecate cu albastru de bromfenol, iar

vizualizarea ADN s-a realizat la transiluminator cu ajutorul bromurii de etidiu.

1. Amplificarea genei pentru ARNr 5.8S

La eucariote, gena pentru ARNr 5.8S are o dimensiune de aproximativ 500-550pb. Pentru amplificarea acestei gene s-au folosit primerii pentru eucariote, ITS1 și respectiv ITS4 (6, 10, 11). Amestecurile de reacție PCR au avut un volum final de 25 μ l și au cuprins: 100 ng ADN genomic, amestecul de nucleotide (dGTP, dATP, dTTP, dCTP) cu o concentrație finală 0,8mM, fiecare din cei doi primeri în concentrație de 0,2 μ M, 2,5 μ l tampon pentru ADN polimeraza Taq, 1,25U ADN polimerază ADN dependentă Taq. După mixarea componentelor, se aplică următoarea variantă de amplificare:

- denaturarea inițială a matriței 3 minute la 95°C ;
- 25 de cicluri formate din: - denaturare 1 minut la 95°C, atașare primeri 1 minut la 50°C, polimerizare 2 minute la 72°C;
- polimerizare 10 minute la 72°.

La sfârșitul reacției de amplificare se realizează o electroforeză în gel de agaroză de concentrație 1.4%, în tampon TBE 0.5x cu bromură de etidiu 0,5 μ g/ μ l. Tensiunea aplicată este de 3 V/cm. Pentru verificarea contaminării amestecurilor de reacție a fost realizat și un amestec martor care nu conținea ADN.

1. Analiza cu enzime de restricție

Produsul de amplificare a fost digerat cu enzima *Msp* I, iar fragmentele de restricție au fost analizate în gel de agaroză 2,7% în 0,5x Tris-Borate-EDTA buffer (8, 11).

Rezultate

În urma examinării caracterelor de cultură, toate izolatele au prezentat colonii globuloase, cu consistență cremoasă, de culoare alb-crem, fără eliberarea de pigmenți în mediul de cultivare. Forma celulelor reprezintă un criteriu de taxonomie și este un aspect frecvent utilizat în caracterizarea și identificarea microorganismelor. În cazul tulpinilor analizate în acest studiu, s-a constatat că acestea prezentau formă ovală, cu burjeonare unipolară și capacitate de formare a filamentelor. Toate tulpinile testate au prezentat profilul numeric caracteristic speciei *Candida albicans* la determinările efectuate cu ajutorul kit-urilor comerciale API 20 C AUX și ID32C. Același rezultat a fost obținut și la determinările în sistem automat VITEK 2.

În cazul izolării și purificării ADN-ului genomic, datorită protocolului de izolare aplicat la

tulpinile studiate, s-a putut obține un ADN genomic pur și nefragmentat, fapt dovedit de analizele electroforetice și spectrofotometrice realizate pe extractul de ADN.

Toate cele 15 extracte de ADN se prezintă într-o concentrație optimă pentru folosirea lor în analizele moleculare ulterioare (fig. nr. 1).

În cazul amplificării genei pentru ARNr, au fost realizate analize preliminare prin care s-a reușit punerea la punct atât a schemei de reacție, cât și a programului de rulare a reacției PCR. La finalul reacției PCR s-a constatat că au fost obținuți ampliconii genei ADNr 5.8S, ampliconi care au o dimensiune de 500-550 pb. Toate aceste date corespund cu cele existente în literatura de specialitate (fig. nr. 2).

Pentru tulpinile luate în studiu s-a constatat că majoritatea au prezentat *pattern*-uri de restricție identice cu *Candida albicans* ATCC 10231, excepție făcând tulpinile *C. albicans* 58641 și *C. albicans* 51646. La aceste două tulpini, în cazul restricției cu enzima *Msp* I nu au fost obținute *pattern*-uri de restricție identice cu *Candida albicans* ATCC 10231. Din acest motiv, aceste tulpini nu vor fi încadrate decât până la nivel de gen (genul *Candida*), rămânând să fie supuse și altor tehnici de identificare pentru determinarea speciei din care fac parte.

Discuții

Prin metode fenotipice clasice, metode comerciale multitest și automate au fost identificate 15 tulpini de *Candida albicans*. Utilizarea metodelor moleculare a făcut posibilă diferențierea între aceste tulpini, pe baza profilului de macrorestricție obținut în urma digestiei produșilor de amplificare ai genei codante pentru ARNr 5.8S cu enzima *Msp* I. Prin optimizarea protocolului de izolare a ADN cromozomal a fost posibilă obținerea unor extracte de ADN cu puritate crescută și concentrație optimă utilizării lor ulterioare. Folosind primerii ITS 1 și ITS4 a fost amplificată întreaga genă pentru ARNr 5.8S, ceea ce a permis obținerea *pattern*ului ARDRA, analiză moleculară de mare valoare taxonomică.

Apreciem că, deși rezultatele noastre privind *pattern*urile ARDRA sunt preliminare, pentru tulpinile de levuri studiate, rezultatele obținute ne permit încadrarea a doar 13 din cele 15 tulpini studiate în specia *Candida albicans*. Rezultatele obținute pledează pentru necesitatea utilizării metodelor moleculare în identificarea de certitudine a speciilor genului *Candida*.

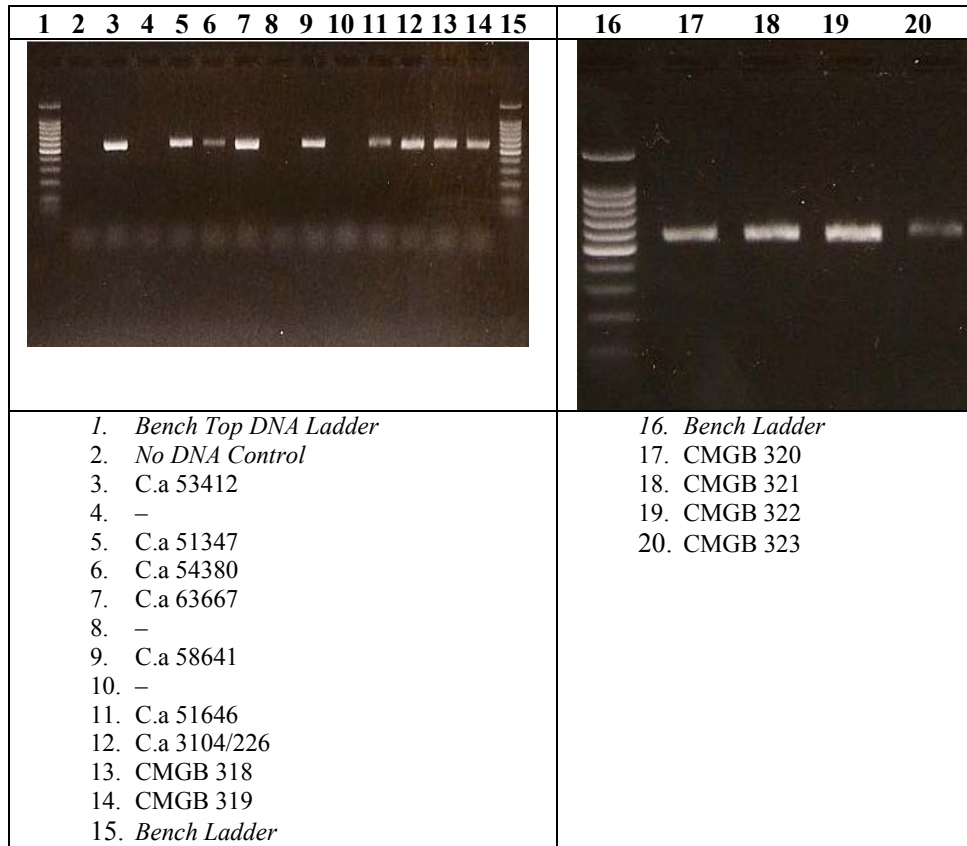


Figura nr. 1 Electroforeză în gel de agaroză pentru ampliconul ARNr 5.8S

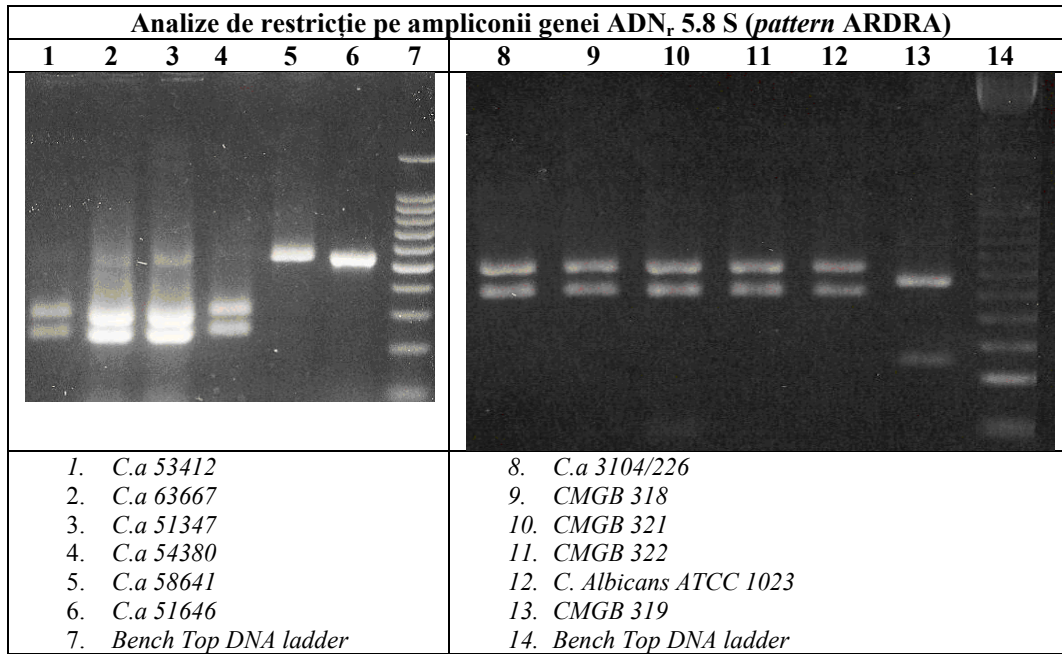


Figura nr. 2 Pattern-uri ARDRA evidențiate prin electroforeză în gel de agaroză

Bibliografie

1. Coman I, Mareş M. *Micologie Medicală Aplicată*; Iaşi: Editura Junimea; 2000.
2. Neguţ M, Buiuc D. *Tratat de Microbiologie Clinică*; Bucureşti: Editura Medicală; 2008.
3. Cirak M Y, Kalkanci A, Kustimur S - Use of Molecular Methods in Identification of *Candida* Species and Evaluation of Fluconazole Resistance; *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* **2003**; 98(8):1027-1032.
4. Couto B M M, Eijsma B, Hofstra H, Veld J H, Van der Vossen J B M - Evaluation of Molecular Typing Techniques To Assign Genetic Diversity among *Saccharomyces cerevisiae* Strains; *Applied and Environmental Microbiology* **1996**; 62:41-46.
5. Csutak O, Stoica I, Ghindea R, Nohit A-M, Pelinescu D, Vassu T - Molecular taxonomy studies on some yeast strains with biodegrading abilities; *Romanian Biotechnology Letters* **2006**; 11:2579-2585.
6. Esteve-Zarzoso B, Belloch C, Uruburu F, Querol A - Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers; *International Journal of Systematic Bacteriology* **1999**; 49: 329–337.
7. Mihrendi S H, Makimura K - PCR-detection of *Candida albicans* in Blood Using a New Primer Pair to Diagnosis of Systemic Candidiasis; *Iranian Journal of Public Health* **2003**; 32:1-5.
8. Mihrendi H, Makimura K, Khoramizadeh M, Yamaguchi H - A one-enzyme PCR-RFLP Assay for identification of six medically important *Candida* Species. *Japanese Journal of Medical Mycology* **2006**; 47:225-229.
9. Mirhendi S H, Kordbacheh P, Pezeshki M, Khorramizadeh M R - Simple and rapid Identification of most medically important *Candida* species by a PCR restriction enzyme method; *Acta Medica Iranica* **2003**; 41(2):79-83.
10. Pinto P M, Resende M A, Koga-Ito C Y, Ferreira J C, Tendler M - rDNA-RFLP identification of *Candida* species in immunocompromised and seriously diseased patients; *Canadian Journal of Microbiology* **2004**; 50:514- 520.
11. Williams D W, Wilson M J, Lewis M A O, Potts J C - Identification of *Candida* Species by PCR and Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of Intergenic Spacer Regions of Ribosomal DNA; *Journal of Clinical Microbiology* **1995**; 33:2476–2479.