

Генотипирование клинических штаммов *Candida* spp./Genotyping of clinical *Candida* spp.strains

Горемыкина¹ Е.А./Goremykina¹ E.A.

Слукин² П.В., Мицевич² И.П., Фурсова² Н.К./Slukin² P.V., Mitsevich² I. P., Fursova² N.K.

¹ФГБОУ ВО «Пушкинский государственный естественно-научный институт», Пушкино, Россия/¹Pushchino State Natural Science Institute, Pushchino, Russia

¹ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», Оболенск, Россия/¹State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russia
Фурсова Н.К./Fursova N.K.

Введение

Грибы рода *Candida* - полиморфный диплоидный гриб, который считается частью микробиоты человека, однако при определенных патогенных состояниях он может быть основной причиной поверхностных инфекций кожи и слизистых оболочек, а также при системных инвазивных инфекциях [1]. Наиболее распространенным видом рода является *Candida albicans*.

Цель

Генотипирование клинических штаммов *Candida* spp. методом ПЦР со случайной амплификацией полиморфной ДНК (RAPD-ПЦР).

Материалы и методы

Клинические штаммы *Candida* spp. (n=18), в том числе *C. albicans* (n=13), *C. kefyr* (n=2), *C. auris* (n=1), *C. glabrata* (n=1) и *C. dubliniensis* (n=1) выделены из мочи (n=8), дыхательной системы (n=3), спинномозговой жидкости (n=1), крови (n=1) и других источников (n=5) в г. Москве в 2020 г. (n=17) и в г. Брянске в 2017 г. (n=1). Референс-штаммы *C. albicans* ATCC90028 и ATCC24433, *C. auris* CBS10913 и *C. parapsilosis* ATCC90018 получены из коллекции «ГКПМ-Оболенск». Чувствительность к амфотерицину, флуконазолу и тербинафину определяли методом серийных микроразведений в бульоне. Культуры выращивали на плотной питательной среде №2 ГРМ Сабуро (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск, Россия) (рис.1).

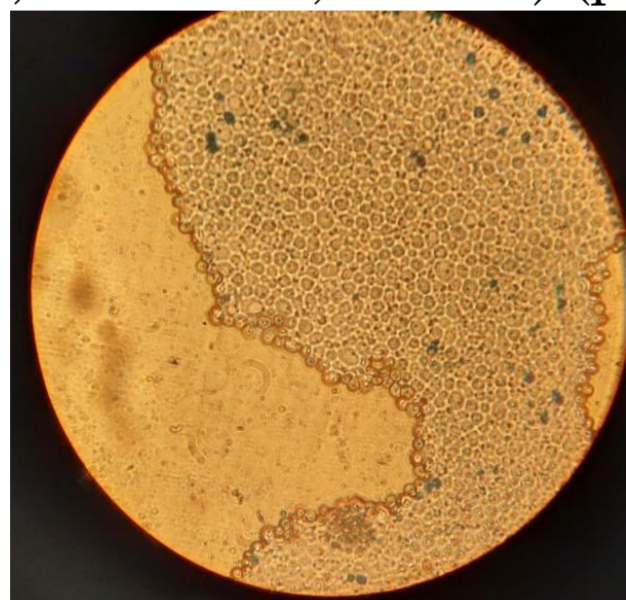


Рис.1. Световая микроскопия клеток *C. albicans* B2620/20 (× 1000). Выявляется структура живых клеток с ядрышком, погибшие клетки прокрашены красителем метиленовым синим.

Тотальную ДНК штаммов выделяли с помощью набора для экстракции ДНК «ДНК-сорб-В» (ООО «НекстБио», Москва, Россия). RAPD-ПЦР проводили с помощью «случайных» праймеров 1247, OPA11 и Wil2, как описано Zimmer et al., 2003 [3] (рис.2). Электрофореграммы анализировали с помощью программы GelJ 2.0 (Chem. Nutr. Res. Gr., Catalonia, Spain) и web-ресурса UPGMA (<http://genomes.urv.cat/UPGMA/>) [4].

Библиография

- Shrief R. et al. Study of Antifungal Susceptibility, Virulence Genes and Biofilm Formation in *Candida albicans* // Open Microbiol. J. 2019. Vol. 13, № 1.
- Zimmer, M. Detection of *Campylobacter jejuni* strains in the water lines of a commercial broiler house and their relationship to the strains that colonized the chickens / M. Zimmer, H. Barnhart, U. Idris, M.D. Lee // Avian. Dis. – 2003. – Vol. 47. –No. 1. – P. 101-107
- Heras J., Domínguez C., Mata E., Pascual V. GelJ – a tool for analyzing DNA fingerprint gel images. BMC Bioinformatics 2015, 16:270 <http://doi.org/10.1186/s12859-015-0703-0>

Результаты

При выращивании на плотных питательных средах культуры *Candida* spp. формировали округлые выпуклые колонии кремового цвета. При световой микроскопии 24 ч культуры наблюдали наличие ядрышка в живых клетках и адсорбцию красителя метиленового синего мертвыми клетками (рис.1). Показано, что все изучаемые штаммы *Candida* spp. были чувствительны ко всем антимикотикам, кроме штамма *C. glabrata* B 2587-1/20, который был резистентен к флуконазолу и тербинафину. RAPD-ПЦР типирование выявило 2 кластера генотипов: А и В. К кластеру А отнесены штаммы *C. kefyr*, *C. parapsilosis* и *C. glabrata*. Кластер В подразделился на 2 подкластера: В1, в который вошли все штаммы *C. albicans*, и В2, включающий в себя штамм *C. auris* (рис.3). Филогенетическое дерево выявило генетическое разнообразие среди штаммов *C. kefyr* и *C. albicans*. Антибиотикорезистентный штамм *C. glabrata* B 2587-1/20 отнесен в подкластер А2а

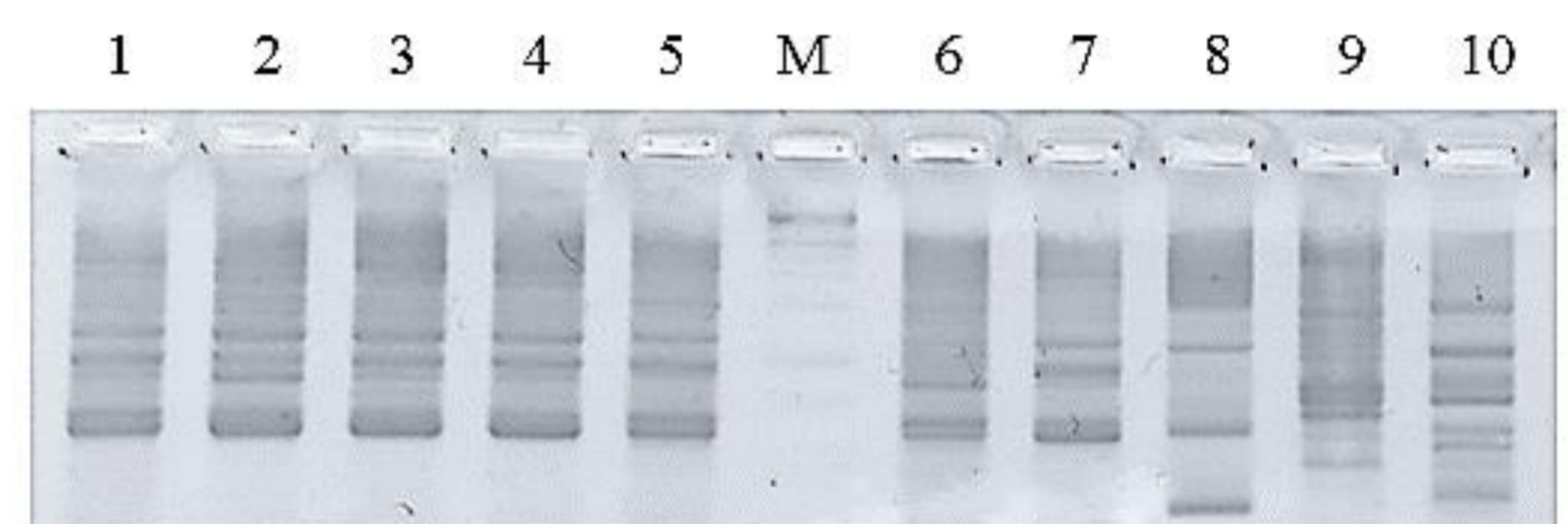


Рис.2. Электрофореграмма продуктов RAPD-ПЦР (праймер OPA11):

1-7 - *C. albicans* B560/20, ATCC24433, 2945-2, 2945-1, N253, ATCC90028, 1721; М - Маркер длин ДНК 1 kb DNA Ladder (Евроген, Москва, Россия); *C. kefyr* B341/20, *C. auris* 48/20, *C. dubliniensis* B3340/20

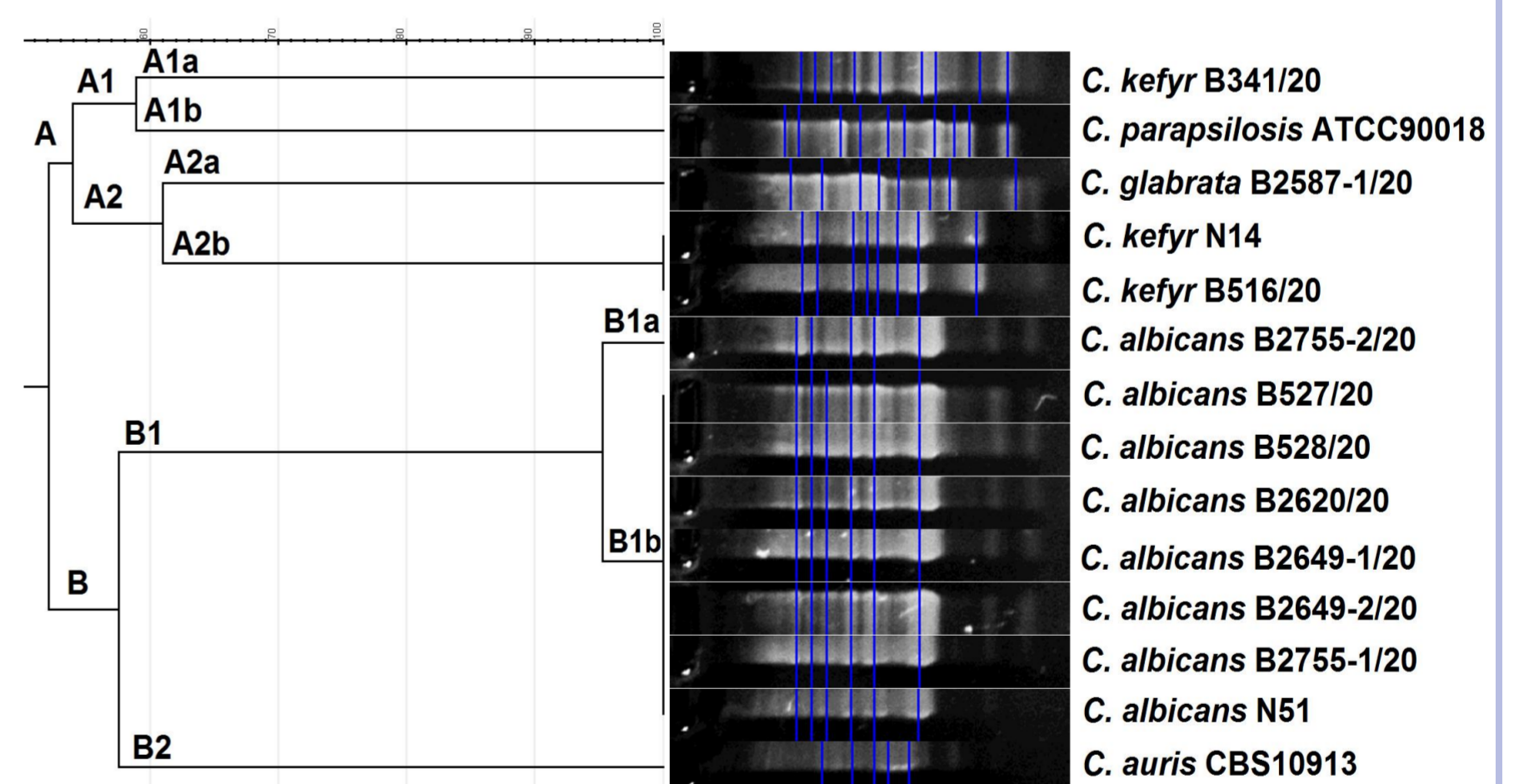


Рис.3. Дендрограмма RAPD-ПЦР профилей штаммов *Candida* spp. (GelJ 2.0 Cheminformatics and Nutrition Research Group, Catalonia, Spain)

Заключение

Методом RAPD-генотипирования выявлены межвидовые и внутривидовые различия клинических штаммов *Candida* spp., которые в дальнейшем будут охарактеризованы по способности к биопленкообразованию.

Работа выполнена в рамках Отраслевой программы Роспотребнадзора.



КОНКУРС НАУЧНЫХ РАБОТ МОЛОДЫХ УЧЁНЫХ И СТУДЕНТОВ
ВСЕРОССИЙСКИЙ КОНГРЕСС
по медицинской микробиологии, клинической микологии
и иммунологии (XXIV Кашкинские чтения)
9-11 июня 2021 г., Санкт-Петербург, Россия