Nowe gatunki w obrębie kompleksów *Candida parapsilosis* i *Candida glabrata*New species within *Candida parapsilosis* and *Candida glabrata*

Dariusz Domański¹, Magdalena Anna Sikora^{2,3}, Robert Tomasz Kuthan^{2,4},
Ewa Augustynowicz-Kopeć⁵, Ewa Swoboda-Kopeć⁴

¹Salus Medycyna Medical Center, Siedlce

²Zakład Mikrobiologii Lekarskiej, Szpital Kliniczny Dzieciątka Jezus, Warszawa

³Zakład Mikrobiologii Stomatologicznej, Warszawski Uniwersytet Medyczny, Warszawa

⁴Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej, Warszawski Uniwersytet Medyczny, Warszawa

⁵Zakład Mikrobiologii, Instytut Gruźlicy i Chorób Płuc, Krajowe Referencyjne
Laboratorium Prątka, Warszawa

Candida parapsilosis i *Candida glabrata* to kolejne, po *Candida albicans*, drożdżaki tworzące kompleksy kryptogatunków. Pomimo, że gatunki te zostały opisane ponad dekadę temu, nadal wiedza na ich temat jest ograniczona. Celem pracy była identyfikacja gatunkowa szczepów klinicznych w obrębie kompleksów *C. glabrata* i *C. parapsilosis*. W wyniku przeprowadzonej analizy molekularnej wykryto 24 izolaty *Candida nivariensis* oraz 4 szczepy *C. metapsilosis* i 9 szczepów *C. orthopsilosis*.

Słowa kluczowe: *Candida nivariensis*, *Candida metapsilosis*, *Candida orthopsilosis*

ABSTRACT

Introduction: *Candida parapsilosis* and *Candida glabrata* are another yeasts that form complexes of cryptospecies. Although these species have been described more than a decade ago, knowledge about them is still limited. The reason for this is the large phenotypic similarity that unables them from being differentiated by classical diagnostic methods. The aim of the study was to identify species of clinical strains within *C. glabrata* and *C. parapsilosis* complexes.

Material and methods: Standard PCR-RFLP of the secondary alcohol dehydrogenase gene (*SADH*) with *BanI* restriction enzyme served to determine species affiliation within the *C. parapsilosis* complex. The internal transcribed spacer was used to confirm the identification of *C. glabrata* sensu stricto. The D1/D2 domain of the 26S rDNA gene was sequenced in order to identify *C. nivariensis* and *C. bracarensis* strains.

Results: As a result of the molecular analysis, 24 *Candida nivariensis* isolates and 4 *C. metapsilosis* strains and 9 *C. orthopsilosis* strains were detected.

Conclusions: Prevalence of new cryptic species was relatively low.

Key words: *Candida nivariensis*, *Candida metapsilosis*, *Candida orthopsilosis*

WSTĘP

Częstość występowania inwazyjnych zakażeń grzybiczych, w szczególności tych spowodowanych drożdżakami z rodzaju *Candida*, w ostatnich latach znacząco wzrosła, stając się istotnym powikłaniem infekcyjnym u pacjentów hospitalizowanych. W ostatnich latach zauważalna jest zmiana profilu gatunkowego z *C. albicans*, na non-*albicans Candida* species (NAC) (10).

Najczęstszym czynnikiem etiologicznym tego typu zakażeń wciąż pozostaje *C. albicans*, mimo wzrostu udziału grupy drożdżaków innych niż *C. albicans* (21). Stwierdzono, że NAC coraz częściej stanowią czynnik etiologiczny zakażeń szpitalnych, a wśród nich największe znaczenie mają *Candida glabrata* oraz *Candida parapsilosis* (1). Dokładna przyczyna zmiany profilu gatunków w obrębie rodzaju *Candida* nie jest znana, jednakże wzrost liczby zakażeń drożdżakami z rodzaju NAC, w szczególności *C. glabrata* przypisuje się nieracjonalnej profilaktyce przeciwgrzybiczej (11).

Obecnie obserwowany jest stały wzrost liczby kandydemii o etiologii *C. glabrata* (20). Drożdżak ten w zaledwie 10 lat (od 1989 roku) z czwartego czynnika etiologicznego zakażeń krwi na oddziałach intensywnej terapii, stał się drugim. Badacze zaobserwowali również występowanie niebezpiecznego zjawiska koinfekcji w przypadku zakażeń krwi spowodowanych przez *C. glabrata* oraz *C. albicans* (15). Od 2006 roku *Candida glabrata* sensu lato (kompleks *Candida glabrata*) jest kompleksem gatunków, w którego skład wchodzi: *Candida glabrata* sensu stricto oraz *Candida nivariensis* i *Candida bracarensis* (17). Częstość występowania gatunków *C. nivariensis* oraz *C. bracarensis* wynosi mniej niż 5% wśród izolatów kompleksu *C. glabrata* (16). Należy podkreślić, że częstość izolacji *C. nivariensis* jest wyższa, niż *C. bracarensis* (2).

Badania polimorfizmu fragmentów restrykcyjnych genomowego DNA *C. parapsilosis* wykazały większą heterogenność genetyczną niż w obrębie innych gatunków *Candida* spp. (27). Spowodowało to wprowadzenie podziału *C. parapsilosis* pierwotnie na trzy grupy genetyczne (I-III). Późniejsze badania molekularne ujawniły różnice genetyczne pomiędzy grupami, pozwalające na wyodrębnienie, 3 blisko spokrewnionych, ale odrębnych gatunków: *C. parapsilosis* (wcześniej grupa I), *C. orthopsilosis* (wcześniej grupa II) i *C. metapsilosis* (wcześniej grupa III) (25).

Ze względu na bliskie pokrewieństwo genetyczne, gatunki w obrębie kompleksów *C. parapsilosis* i *C. glabrata* są fenotypowo nie do odróżnienia.

Celem pracy była identyfikacja gatunkowa szczepów klinicznych w obrębie kompleksów *C. glabrata* i *C. parapsilosis*.

MATERIAŁ I METODY

Materiał do badań obejmował 445 klinicznych szczepów *C. glabrata* sensu lato oraz 171 szczepów *Candida parapsilosis* sensu lato izolowanych z różnych materiałów klinicznych od pacjentów Szpitala Dzieciątka Jezus. Materiały kliniczne posiewano zgodnie z zasadami rutynowej diagnostyki mikrobiologicznej na standardowe podłoże Sabouraud, do hodowli i izolacji grzybów i inkubowano w temperaturze 30°C przez 24-72h do uzyskania reprezentatywnych, pojedynczych kolonii. Identyfikację gatunkową do kompleksów wykonano przy użyciu komercyjnych testów ID 32 C (bioMérieux, France).

Identyfikacja gatunków w obrębie kompleksów *C. parapsilosis* i *C. glabrata*. Izolacja DNA genomowego. Izolacja DNA genomowego szczepów z kompleksów *C. parapsilosis* i *C. glabrata* przeprowadzona została przy użyciu zestawu do izolacji DNA genomowego firmy EurX zgodnie z protokołem dostarczonym przez producenta (EurX, Polska).

Identyfikacja gatunków *C. metapsilosis* i *C. orthopsilosis* w obrębie kompleksu *C. parapsilosis*. Przynależność gatunkowa w obrębie kompleksu *C. parapsilosis* została wykonana z zastosowaniem standardowej metody PCR – RFLP genu dehydrogenazy alkoholowej (SADH), enzymem restrykcyjnym BanI wg metody opisanej przez Tavanti i wsp. (26). Gen SADH *C. parapsilosis* był amplifikowany za pomocą reakcji PCR przy użyciu starterów specyficznych SADHF (5'-GTTGATGCTGTTGGATTGT-3') i SADHR (5'-CAATGCCAAATCTCCCAA-3'). Identyfikacja gatunkowa wykonana była na podstawie analizy wzorów restrykcyjnych, otrzymanych po trawieniu produktu amplifikacji fragmentu (o długości 716 pz) genu SADH, enzymem BanI.

Identyfikacja gatunków *C. nivariensis* i *C. bracarensis* w obrębie kompleksu *C. glabrata*. Różnicowanie gatunkowe w obrębie kompleksu *Candida glabrata* przeprowadzono w dwóch etapach. W pierwszym za pomocą metody PCR poszukiwano fragmentu genu wewnętrznego regionu kodującego ITS (internal transcribed spacer) charakterystycznego dla gatunku *C. glabrata* sensu stricto. Drugi etap obejmował sekwencjonowanie fragmentów DNA. Szczepy charakteryzujące się brakiem fragmentu ITS charakterystycznego dla *C. glabrata* sensu stricto poddano sekwencjonowaniu w rejonie D1/D2 genu 26S rRNA według metody opisanej przez Kurtzman (13). Do amplifikacji użyto starterów: NL-1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG'), NL-4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG'). Do sekwencjonowania użyto wewnętrznych starterów: NL-2A (5'-CTTGTCGCTATCGGTCTC') oraz NL-3A (5'-GAGACCGATAGC GAACAAG'). Wyniki sekwencjonowania analizowane były w programie BLAST.

WYNIKI

Identyfikacja szczepów nowych gatunków w kompleksach *C. glabrata* oraz *C. parapsilosis*. Czterysta czterdzieści pięć szczepów pierwotnie zidentyfikowanych jako *Candida glabrata*, poddano analizie genetycznej z wykorzystaniem metody PCR. Przeprowadzona analiza wykazała obecność 24 izolatów (5,4% wszystkich analizowanych szczepów), nie posiadających zamplifikowanego fragmentu ITS charakterystycznego dla *C. glabrata* sensu stricto. Wszystkie 24 szczepy zostały poddane sekwencjonowaniu w rejonie D1/D2 genu 26S rRNA. Na podstawie analizy otrzymanych sekwencji, u wszystkich 24 izolatów wykazano 99% homologii z fragmentem 26S rRNA dla gatunku *Candida nivariensis*. W wyniku przeprowadzonej analizy nie wykryto szczepów wykazujących homologii do fragmentu 26S rRNA gatunku *C. bracarensis*.

Sto siedemdziesiąt jeden szczepów wyizolowanych z materiałów klinicznych jako *Candida parapsilosis* sensu lato poddano badaniu opartemu na reakcji PCR-RFLP genu SADH (dehydrogenazy alkoholowej) enzymem BanI. Wykazano różnice we wzorach restrykcyjnych pozwalające na rozróżnienie poszczególnych gatunków w obrębie kompleksu *C. parapsilosis*. W przypadku braku miejsca cięcia enzymem restrykcyjnym stwierdzono przynależność do gatunku *Candida orthopsilosis*. Obecność jednego miejsca cięcia świad-

czyło o przynależności do gatunku *C. parapsilosis* sensu stricto. Przy trzech miejscach cięcia, wskazywano na przynależność do gatunku *C. metapsilosis*. W zależności od otrzymanego wzoru restrykcyjnego określano przynależność do gatunku w obrębie kompleksu.

W obrębie tej grupy izolatów zidentyfikowano gatunki: *C. parapsilosis* sensu stricto, *C. metapsilosis* i *C. orthopsilosis*. Udział wyizolowanych gatunków w obrębie kompleksów *Candida glabrata* oraz *Candida parapsilosis* przedstawiono w Tabeli 1.

Tabela 1. Udział wyizolowanych gatunków w obrębie kompleksów *C. glabrata* oraz *C. parapsilosis*

Gatunek	Liczba szczepów
Kompleks <i>Candida glabrata</i>	455
<i>Candida glabrata</i> sensu stricto	431
<i>Candida nivariensis</i>	24
<i>Candida bracarensis</i>	0
Kompleks <i>Candida parapsilosis</i>	171
<i>Candida parapsilosis</i> sensu stricto	158
<i>Candida metapsilosis</i>	9
<i>Candida orthopsilosis</i>	4

Rycina 1. Nowe gatunki w obrębie kompleksów *Candida parapsilosis* i

DYSKUSJA

Drobnoustroje z grupy non-*albicans* *Candida* są coraz powszechniej izolowane z różnego rodzaju zakażeń. Według danych literaturowych odsetek zakażeń powodowanych przez *C. parapsilosis* na przestrzeni lat wzrósł w USA z 7 nawet do 37%, a w Europie z 0 do 21%. Obserwuje się również wzrost liczby kandydemii powodowanej przez *C. glabrata* (20). Czynnikiem sprzyjającym kandydemii o tej etiologii wśród pacjentów z Oddziałów Intensywnej Terapii, była wcześniejsza terapia flukonazolem (24). W Polsce *C. parapsilosis* stanowiła trzeci co do częstości (13,14%) po *C. albicans* i *C. glabrata* drożdżak izolowany z przypadków kandydemii (19). Dużo niższą częstość izolacji (4%) *C. parapsilosis* z potwierdzonych inwazyjnych zakażeń grzybiczych otrzymano w badaniu Gołaś i wsp. (11).

Należy podkreślić, że istnieje bardzo niewiele doniesień dotyczących izolacji nowo odkrytych gatunków z kompleksów *C. parapsilosis*: *C. metapsilosis* i *C. orthopsilosis*

oraz *C. glabrata*: *C. nivariensis* i *C. bracarensis*. Większość informacji opiera się przede wszystkim o badania retrospektywne, a wykrywanie poszczególnych gatunków należących do kompleksów jest ciągle niewystarczające.

W literaturze światowej mało jest informacji na temat izolacji gatunków *C. nivariensis* oraz *C. bracarensis*. Szacuje się, że procentowy udział tych gatunków w kompleksie wynosi od 0,2-4,0% (16). W naszym badaniu częstość izolacji *C. nivariensis* była wyższa i stanowiła 5,7% (24 szczepy). Jedną z nielicznych prac angielskiego laboratorium referencyjnego pod kierunkiem Borman'a (6) wykazała obecność 16 klinicznych izolatów *C. nivariensis*. Badania przeprowadzone przez Sharma i wsp. (22) na 100 izolatach kompleksu *C. glabrata* wykazały obecność 5 izolatów należących do gatunku *C. nivariensis*. Chowdhary i wsp. (8) po przeanalizowaniu 366 szczepów kompleksu *C. glabrata* wykazali obecność 2 szczepów należących do gatunku *C. nivariensis*. Natomiast w badaniach Li i wsp. (14) częstość występowania *C. nivariensis* oszacowano na 2,33% (7 izolatów).

Według danych światowych *C. parapsilosis* sensu stricto jest przyczyną ok. 90% zakażeń o etiologii *C. parapsilosis*, a gatunki *C. metapsilosis* i *C. orthopsilosis* stanowią ok. 10% wszystkich izolatów *C. parapsilosis* sensu lato (12, 23, 26). Częstość izolacji *C. orthopsilosis* jest różna i waha się od 2.37% do 25.9% (5, 25).

W pracy Goncalves i wsp. (12) wśród 141 szczepów *C. parapsilosis*, 88% zidentyfikowano jako *C. parapsilosis* sensu stricto, 9% jako *C. orthopsilosis* i 3% jako *C. metapsilosis*. W badaniach Bonfietti i wsp. (4) zidentyfikowano niższy odsetek (0.7%) szczepów *C. metapsilosis*. Zespół Blanco-Blanco i wsp. (3) wyizolował *C. orthopsilosis* z połowy przypadków zakażeń, a *C. parapsilosis* sensu stricto tylko z 23% przypadków. Toro i wsp. (9) po przeanalizowaniu 122 szczepów *C. parapsilosis*, zidentyfikowali 91% szczepów jako *C. parapsilosis* sensu stricto, 8.2% *C. orthopsilosis* i 0.8% *C. metapsilosis*. Podobne wyniki otrzymali w swoich badaniach Lockhart i wsp. (16) oraz Silva i wsp. (23). Nowe gatunki, *C. metapsilosis* i *C. orthopsilosis* w analizowanej przez nas puli szczepów *C. parapsilosis* sensu lato stanowiły 7%. Odsetek poszczególnych gatunków wynosił 5% dla *C. metapsilosis* i 2% dla *C. orthopsilosis*. Wartości te są niższe niż zaobserwowane przez innych autorów. W przeciwieństwie do wyników naszej pracy, z danych literaturowych wynika, że szczepy *C. orthopsilosis* są częściej izolowane (ok. 10%), niż *C. metapsilosis* (ok. 6%) (25).

Badanie prevalencji kryptogatunków oraz ich właściwa identyfikacja jest istotna ze względu na możliwe różnice w ich lekowrażliwości w stosunku do gatunków macierzystych.

Szczepy *C. parapsilosis* wykazują wrażliwość na większość ogólnoustrojowych leków przeciwgrzybiczych w tym azole (flukonazol, ketokonazol, itraconazol, worykonazol i posakonazol) i polieny (amfoterycynę B) (18). Według danych literaturowych, gatunki *C. orthopsilosis* i *C. metapsilosis* są bardziej wrażliwe na echinokandyny w porównaniu do szczepów *C. parapsilosis* sensu stricto (5, 7).

Podobnie wygląda sytuacja z informacjami dotyczącymi lekowrażliwości nowych gatunków w obrębie kompleksu *C. glabrata*. Ze względu na bardzo małą liczbę zidentyfikowanych szczepów należących do gatunków *C. nivariensis* oraz *C. bracarensis* na świecie, dane co do ich profilu lekowrażliwości są mocno ograniczone (14). Dostępne dane literaturowe wskazują, że wartości MIC dla echinokandyn szczepów z gatunków *C. nivariensis* oraz *C. bracarensis* są niskie. Do tej pory nie opisano przypadków wystąpienia oporności szczepów tych gatunków na tą grupę leków (2).

Niedawno opisane kryptogatunki z kompleksów *C. parapsilosis* oraz *C. glabrata* wykazują wiele cech wspólnych z gatunkami macierzystymi. Wiadome jest, że nowe gatunki występują rzadziej w materiałach klinicznych od *C. parapsilosis* sensu stricto oraz *C. glabrata* sensu stricto. Wciąż jednak potrzebne jest dokładne oszacowanie częstości ich występowania. Mimo coraz częstszych doniesień na temat izolacji tych gatunków, wiedza na temat ich lekowrażliwości i znaczenia klinicznego jest wciąż mocno ograniczona i wymaga dalszych badań.

Praca finansowana ze środków Narodowego Centrum Nauki: Grant nr NN401042738. Kierownik projektu dr hab. Ewa Swoboda-Kopeć.

PIŚMIENNICTWO

1. Aguilar G, Delgado C, Corrales I i inni. Epidemiology of invasive candidiasis in a surgical intensive care unit: an observational study. BMC Res Notes 2015; 8: 491.
2. Angoulvant A, Guitard J, Hennequin C. Old and new pathogenic *Nakaseomyces* species: epidemiology, biology, identification, pathogenicity and antifungal resistance. FEMS Yeast Res 2016; 16: 114.
3. Blanco-Blanco MT. *Candida orthopsilosis* fungemias in a Spanish tertiary care hospital: incidence, epidemiology and antifungal susceptibility. Rev Iberoam Micol 2014; 31: 145-8.
4. Bonfietti LX, Martins Mdos A, Szesz MW i inni. Prevalence, distribution and antifungal susceptibility profiles of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* bloodstream isolates. J Med Microbiol 2012; 61: 1003-8.
5. Borghi E, Sciota R, Iatta R i inni. Characterization of *Candida parapsilosis* complex strains isolated from invasive fungal infections. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2011; 30: 1437-41.
6. Borman AM, Petch R, Linton CJ i inni. *Candida nivariensis*, an emerging pathogenic fungus with multidrug resistance to antifungal agents. J Clin Microbiol 2008; 46: 933-8.
7. Cantón E, Pemán J, Quindós G i inni. Prospective multicenter study of the epidemiology, molecular identification, and antifungal susceptibility of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* isolated from patients with candidemia. Antimicrob Agents Chemother 2011; 55: 5590-6.
8. Chowdhary A, Randhawa HS, Khan ZU i inni. First isolations in India of *Candida nivariensis*, a globally emerging opportunistic pathogen. Med Mycol 2010; 48: 416-20.
9. De Toro M, Torres MJ, Maite R i inni. Characterization of *Candida parapsilosis* complex isolates. Clin Microbiol Infect 2011; 17: 418-24.
10. Gabaldón T, Carreté L. The birth of a deadly yeast: tracing the evolutionary emergence of virulence traits in *Candida glabrata*. FEMS Yeast Res 2016; 16: 110-9.
11. Golaś M, Netsvyetayeva I, Sikora M i inni. E Trends in antifungal susceptibility of *Candida* species - one year observation. Polish Journal of Microbiology 2014; 63: 217-22.
12. Goncalves SS, Amorim CS, Nucci M i inni. Prevalence rates and antifungal susceptibility profiles of the *Candida parapsilosis* species complex: results from a nationwide surveillance of Candidaemia in Brazil. Clin Microbiol Infect 2010; 16: 885-7.

13. Kurtzman CP, Robnett CJ. Phylogenetic relationships among yeasts of the *Saccharomyces* complex determined from multigene sequence analyses. *FEMS Yeast Res* 3, 2003, 4: 417-32.
14. Li J, Shan Y, Fan S i inni. Prevalence of *Candida nivariensis* and *Candida bracarensis* in vulvovaginal Candidiasis. *Mycopathologia* 2014; 178: 279-83.
15. Lockhart SR, Iqbal N, Cleveland AA i inni. Species identification and antifungal susceptibility testing of *Candida* bloodstream isolates from population-based surveillance studies in two US cities from 2008 to 2011. *J Clin Microbiol* 2012; 50: 3435-42.
16. Lockhart SR, Messer SA, Gherna M i inni. Identification of *Candida nivariensis* and *Candida bracarensis* in a large global collection of *Candida glabrata* isolates: comparison to the literature. *J Clin Microbiol* 2009; 47: 1216-7.
17. Miranda-Zapico I, Eraso E, Hernández-Almaraz JL. Prevalence and antifungal susceptibility patterns of new cryptic species inside the species complexes *Candida parapsilosis* and *Candida glabrata* among blood isolates from a Spanish tertiary hospital. *J Antimicrob Chemother* 2011; 66: 2315 – 22.
18. Nakamura T, Takahashi H. Epidemiological study of *Candida* infections in blood: susceptibilities of *Candida* spp to antifungal agents, and clinical features associated with the candidemia. *J Infect Chemother* 2006; 12: 132–8.
19. Nawrot U, Pajęczkowska M, Fleischer M i inni. *Candidaemia* in Polish hospitals - a multicentre survey. *Mycoses* 2013; 56: 576-81.
20. Quindós G Epidemiology of *Candidaemia* and invasive candidiasis. *Mycologic Forum* 2014; 31: 42–8.
21. Rodloff AC, Koch D, Schauman R Epidemiology and antifungal resistance in invasive candidiasis. *Eur J Med Res* 2011; 16: 187–95.
22. Sharma C, Wankhede S, Muralidhar S i inni. *Candida nivariensis* as an etiologic agent of vulvovaginal candidiasis in a tertiary care hospital of New Delhi, India. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2013; 76: 46-50.
23. Silva S, Henriques M, Oliveira R i inni. Characterization of *Candida parapsilosis* infection of an in vitro reconstituted human oral epithelium. *Eur J Oral Sci* 2009; 117: 669–75.
24. Tapia GG, Razonable RR, Eckel-Passow JE i inni. A scoring model of factors associated with *Candida glabrata* candidemia among critically ill patients. *Mycoses* 2012; 55: 228-36.
25. Tavanti A, Davidson AD, Gow NA i inni. *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp nov to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 284-92.
26. Tavanti A, Hensgens LA, Ghelardi E i inni Genotyping of *Candida orthopsilosis* clinical isolates by amplification fragment length polymorphism reveals genetic diversity among independent isolates and strain maintenance within patients. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 1455-62.
27. Trofa D, Gácsér A, Nosanchuk JD. *Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen. *Clin Microbiol Rev* 2008; 21: 606-25.

Otrzymano: 18 II 2019 r.

Adres Autora: 02-004 Warszawa, ul. Chałubińskiego 5, Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego