

ФАКТОРЫ ПАТОГЕННОСТИ *CANDIDA ALBICANS* И ИХ ПЦР-ИДЕНТИФИКАЦИЯ

Гаффарова А.С., Хайтович А.Б.

Медицинская академия им. С.И. Георгиевского «Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского», Симферополь, Россия

Род *Candida* включает несколько условно-патогенных видов, вызывающие грибковые инфекции у лиц со сниженным иммунитетом [1]. Наибольшее практическое значение имеет вид *Candida albicans*, который относится к представителям нормальной микрофлоры человека. К заболеваниям, вызванным представителями *C. albicans* относится инвазивный кандидоз (ИК), который является самым распространенным внутрибольничным микозом. Ежегодно в мире регистрируется более 400 000 случаев ИК. Среднегодовая распространенность ИК составляет от 2,4 до 29 случаев на 100 тыс. населения. Частота ИК в стационарах различных стран варьирует от 0,33 до 24 случаев на 1000 госпитализированных [2, 3]. Широкое распространение, заболеваний вызываемых *C. albicans*, связано с разными факторами патогенности: морфологическая трансформация, адгезия, инвазия, тигмотропизм, формирование биопленок, секреция гидролаз и т.д., которые детерминированы в геноме микроба. Для оказания своевременной и эффективной противогрибковой терапии, а также для эпидемической оценки внутрибольничных оппортунистических инфекций, вызванных *C. albicans* необходима идентификация возбудителя. В настоящее время полимеразная цепная реакция (ПЦР) используется в лабораториях для видовой идентификации грибов и изучения их антибиотикорезистентности [4].

Установлено, что ген ДНК-топоизомеразы II присутствует у всех эукариот, нуклеотидная последовательность которого состоит из высоко консервативных областей, разделенных видоспецифическими областями [5], поэтому определение нуклеотидной последовательности грибкового гена ДНК-топоизомеразы II может использоваться для видовой ПЦР-идентификации патогенных видов *Candida* spp.

Установлено филогенетическое родство и свойства представителей рода *Candida* на основе их нуклеотидных последовательностей [6]. В ходе ПЦР-идентификации был установлен генотип гена ДНК-топоизомеразы II для *C. albicans* [4]. Исследованы специфические праймеры ДНК топоизомеразы II генов 10 видов *Candida* (12 прай-

меров) и показано их клиническое значение. Выяснено, что ПЦР с использованием специфических пар праймеров и их смесей возможно использовать для обнаружения и идентификации *C. albicans*.

В задачу исследования входило определение факторов патогенности *C. albicans*, способствующие разделению инфекционного процесса и их генных детерминант с помощью ПЦР-диагностики.

Для решения поставленных задач проведен анализ современной информации, посвященной факторам патогенности *C. albicans* и генам, которые их кодируют. По данным Genbank (интернет-ресурс <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) изучена нуклеотидная последовательность различных генов, которые могут быть использованы в качестве мишени для быстрой ПЦР-идентификации *C. albicans*.

В патогенезе патологических процессов, вызванные *C. albicans* наиболее существенное значение имеют факторы патогенности:

(1) адгезия опосредует прикрепление *C. albicans* к клеткам организма хозяина. Существуют неспецифические (гидрофобные контакты) и специфические (лиганд-рецепторные взаимодействия) механизмы адгезии. Процесс обеспечивается генами группы ALS, наибольшее значение среди которых имеет ген ALS 3. Установлены нуклеотидные последовательности генов ALS 2, ALS 4, ALS 5, ALS 6 и ALS 7 [7];

(2) инвазия, обеспечивающая проникновение в клетки-хозяина, основана на двух взаимодополняющих механизмах: индуцированном эндоцитозе (опосредованного белками-инвазинами, экспрессируемыми генами ALS 3 и SSA 1) и активном проникновении (механизм недостаточно изучен) [8];

(3) диморфизм – трансформация из дрожжевой формы в гифальную. Факторы: голодание, присутствие сыворотки, N-ацетилглюкозамина, температура 37 °С, pH 7,0, обеспечивают морфологическую трансформацию из дрожжевой в гифальную форму, при этом гифы непосредственно способствуют инвазии, а дрожжевые формы участвуют в диссеминации [9]. К генам, детерминирующим образование гиф, относятся Hwp1, Als3, Sap4, Sap5 и Sap6 [10];

(4) формирование биопленок происходит на абиотических или биотических поверхностях. Биопленки более устойчивы к антимикробным агентам и иммунным факторам хозяина в связи со сложной архитектурой матрикса, повышенной экспрессии эффлюжного насосного аппарата и метаболической пластичности. Ген Hsp90 является ключевым регулятором дисперсии биопленок *C. albicans* и резистентности против антимикотических препаратов [11];

(5) тигмотропизм – направленный рост гиф, который обеспечивается внеклеточным захватом кальция через кальциевые каналы, кодируемые генами *Cch1*, *Mid1* и *Fig1*;

(6) секреция гидролаз содействует активному проникновению в клетки хозяина и повышению эффективности получения внеклеточных питательных веществ [12]. Известно три класса секретируемых гидролаз, продуцируемых *C. albicans*: секретируемые аспарагиновые протеазы (*SAP 1-10*), фосфолипазы (*PLB1-5*) и липазы (*Lip8*).

На основе геномных нуклеотидных последовательностей *C. albicans*, *C. glabrata*, *A. nidulans* и *S. cerevisiae* разработаны два вырожденных праймера, обозначенные *CDF28* (прямой праймер) и *CDR148* (обратный праймер). Нуклеотидные последовательности этих праймеров известны. Используя нуклеотидные последовательности генов ДНК-топоизомеразы II *C. kefyri* (AB049138), *C. krusei* (AB049139), *C. tropicalis* (AB049140 и AB049141), *C. dubliniensis* (AB049142), *C. parapsilosis* (AB049143 и AB049144), *C. guilliermondii* (AB049145) и *C. lusitaniae* (AB049146) и другие нуклеотидные последовательности *C. albicans* (Y10377) и *C. glabrata* (AB010644), полученные из базы данных GenBank / EMBL / DDB, произведена идентификация *C. albicans* на видовом уровне, для чего разработаны специфические: прямой и два обратных праймера.

Одним из основных методов изучение роли в патологии различных микроорганизмов, в том числе и грибов *C. albicans* является выделение чистой культуры и ее идентификация (микологический метод). Однако при идентификации очень редко выявляются свойства микробов, которые определяют патогенез патологического процесса. Поэтому важным является определение факторов патогенности, которые кодируются в геноме микробов, и использование результатов для определения потенциального риска развития патологических процессов.

Это актуально для всех микробов, но особенно – для оппортунистических инфекций, к которым относится *C. albicans*. Наличие или отсутствие генов, детерминирующих факторы патогенности у возбудителя кандидоза, открывает возможность установить не только вид микроба, который вызывает патологический процесс в организме, но и доказать его роль в патологии, оценить характеристику каждого штамма и определить риск в развитии заболевания людей. ПЦР-диагностика с использованием праймеров, кодирующих гены ДНК-топоизомеразы II, эффективна и высокоспецифична для идентификации разных видов патогенных *Candida* spp., что может быть использовано в качестве видовой экспресс-диагностики.

ки. В дальнейшем предполагается проведение изучения факторов патогенности у чистых культур *C. albicans* и других представителей рода *Candida*, а также в исследуемом материале с помощью ПЦР для установления их роли в различных патологических процессах, вызванных *C. albicans*.

Список литературы

1. Fridkin SK, Jarvis WR. Epidemiology of nosocomial fungal infections. Clin Microbiol Rev. 1996. 9: 499-511
2. François L. Mayer, Duncan Wilson, Bernhard Hube. Candida albicans pathogenicity mechanisms. 1996. doi:10.4161/viru.22913.
3. Hurley R, De Louvois J. Candida vaginitis. Postgrad Med J. 1979; 55: 645-7. DOI: 10.1136/pgmj.55.647.645.
4. Emma EMJ, Carroll NM, Choudhury S et al. Rapid detection and identification of Candida, Aspergillus and Fusarium species in ocular samples using nested PCR. J ClinMicrobiol. 2000; 38: 2902-8.
5. Keller BA, Patel S, Fisher LM. Molecular cloning and expression of the Candida albicans TOP2 gene allows study of fungal DNA topoisomerase II inhibitors in yeast. Biochem J. 1997; 324: 329-39.
6. Kato M, Ozeki M, Kikuchi A, Kanbe T. Phylogenetic relationship and mode of evolution of yeast DNA topoisomerase II gene in the pathogenic Candida species. Gene 2001. 272: 275-81. O'Sullivan JM, Jenkinson HF, Cannon RD. (2000). Adhesion of Candida albicans to oral streptococci is promoted by selective adsorption of salivary proteins to the streptococcal cell surface. Microbiology, 146(1), 41-8. doi:10.1099/00221287-146-1-41.
7. Garcia MC, Lee JT, Ramsook CB et al. A role for amyloid in cell aggregation and biofilm formation. PLoS One. 2011; 6:e17632. DOI: 10.1371/journal.pone.0017632.
8. Zakikhany K, Naglik JR, Schmidt-Westhausen A et al. In vivo transcript profiling of Candida albicans identifies a gene essential for interepithelial dissemination. Cell Microbiol. 2007; 9: 2938-54. DOI: 10.1111/j.1462-5822.2007.01009.x.
9. Odds FC. Secreted proteinases and Candida albicans virulence. Microbiology. 2008; 154(11), 3245-6. doi:10.1099/mic.0.2008/023671-0.
10. Phan, Q. T. N-cadherin mediates endocytosis of Candida albicans by Endothelial Cells. J Biol Chem. 2005; 280(11): 10455-61. DOI:10.1074/jbc.m412592200.
11. Sudbery PE. Growth of Candida albicans hyphae. Nat Rev Microbiol. 2011; 9: 737-48. DOI: 10.1038/nrmicro2636.
12. Zheng X, Wang Y, Wang Y. Hgc1, a novel hypha-specific G1 cyclin-related protein regulates Candida albicans hyphal morphogenesis. EMBO J. 2004;23:1845-56. doi: 10.1038/sj.emboj.7600195.