

Dr n. med. Tomasz Jagielski

Zakład Mikrobiologii Stosowanej, Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski

Streszczenie

Zastosowanie metod molekularnych w diagnostyce wybranych grzybic człowieka

Współczesna epidemiologia zakażeń grzybiczych coraz częściej korzysta z metod biologii molekularnej. Obejmują one zarówno metody diagnostyczne umożliwiające identyfikację czynnika chorobotwórczego na poziomie gatunku, jak i różnicowanie wewnątrzgatunkowe (typowanie szczepów). W przeciwieństwie do klasycznych metod identyfikacji, opartych na analizie cech fenotypowych (gł. morfologicznych, a w mniejszym stopniu także biochemicznych i serologicznych), metody molekularne badają różnorodność szczepów w oparciu o analizę ich materiału genetycznego. O istotnej przewadze metod genotypowych nad klasycznymi stanowi fakt, że materiał genetyczny jest unikalny i względnie stały dla każdego organizmu, podczas gdy fenotyp poddany presji środowiska ulega ciągłym zmianom. U grzybów, wobec złożonego cyklu życiowego i dużej plastyczności adaptacyjnej do środowiska, zjawisko zmienności fenotypowej widać niezwykle wyraźnie.

Typowanie genetyczne (genotypowanie) posługując się różnego rodzaju znacznikami (markerami) molekularnymi wykrywa, w zakresie rodzaju (gatunku lub szczepu), polimorfizm organizacji i struktury materiału genetycznego, przy czym źródłem wewnątrzgatunkowego polimorfizmu mogą być zarówno rekombinacje genetyczne, jak i mutacje zachodzące podczas replikacji.

Obecnie większość stosowanych metod genotypowych opartych jest na amplifikacji DNA techniką PCR. Wśród najczęściej stosowanych technik są analiza polimorfizmu losowo amplifikowanych fragmentów DNA (ang. *Random Amplification of Polymorphic DNA, RAPD*), analiza polimorfizmu fragmentów restrykcyjnych (ang. *Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP*), zagnieżdżona reakcja PCR (ang. *nested PCR*), PCR w czasie rzeczywistym (ang. *Real-Time PCR, RT-PCR*) oraz analiza sekwencyjna produktów amplifikacji (ang. *PCR-sequencing*).

Zastosowanie metod molekularnych (typowania genetycznego) w epidemiologii zakażeń grzybiczych poszerzyło nie tylko jej warsztat metodyczny, ale przede wszystkim zakres przedmiotowy badań. Metody te nie tylko pozwalają prawidłowo przeprowadzić identyfikację czynnika zakaźnego ale także są niezastąpione w szczegółowych dochodzeniach epidemiologicznych. Pozwalają m.in. na odróżnienie stanu kolonizacji od infekcji grzybiczej, zakażenia zewnętrznego (egzogenne) od wewnątrzpochodnego (endogenne); umożliwiają rozpoznanie, czy trwające zakażenie wywołane jest przez jeden szczep czy przez wiele szczepów współistniejących oraz czy ten sam szczep jest źródłem zakażenia pierwotnego i reinfekcji. Badania molekularne uzupełnione o szczegółowy wywiad epidemiologiczny pozwalają na wiarygodne ustalenie źródeł i dróg szerzenia się zakażeń grzybiczych

w różnych zbiorowiskach ludzkich. Wyniki tych ustaleń mają kluczowe znaczenie dla weryfikacji dotychczasowych względnie wdrożenia nowych strategii o charakterze zapobiegawczo-leczniczym.

Application of molecular methods in diagnosis of selected mycoses in humans

As the number of immunocompromised patients has increased substantially over recent years, the incidence and variety of fungal infections have emerged and escalated across the world. The growing mycological crisis has considerably stimulated the development of rapid, robust, and accurate identification methods. The need for such methods is even more pressing since currently available commercial identification kits do not contain many of the newer, emerging pathogenic species in their repertoires. Historically, identification of fungal species relied upon phenotype-based criteria, including morphology, physiology, and, if possible, mating. These conventional, phenotypic systems, however, often suffer from poor reproducibility, laborious and time-consuming procedures, and, above all, limited discriminatory capacity. This is due to the exceptional diversity of fungi, a high tendency to pleomorphism or inconsistent production of structures by which they can be identified. Therefore, the identification of species and strains of pathogenic fungi has become more and more dependent on molecular approaches which exploit the tremendous variety of fungal DNA. These molecular typing (genotyping) methods target DNA polymorphisms at various loci within the fungal genome and are used as markers for species determination. Not only does genotyping distinguish between different genera and species, but also allows to assess the extent of intra-species heterogeneity. The strain-level differentiation might be helpful in disclosing the sources of infection, elucidating its potential routes of transmission, determining whether the infection involves one strain or a group of strains, and whether recurrence of fungal infection is attributable to the persistence of the original strain or is due to reinfection with a new strain. Furthermore, strain typing can be used to study the molecular mechanisms that mediate host-pathogen interactions or to identify the genotype-specific differences in the phenotypic characteristics, such as virulence, sensitivity to antifungal agents, tropism for a particular body site, transmissibility, etc.

A wide array of different molecular methods has been introduced, over the last decade, into the diagnosis of mycotic diseases and subsequent characterization of the causative agents. Most of these methods follow the same general pattern, which can be summarized as follows: extraction of genomic DNA (i), PCR-based amplification of a selected region of the genome (ii), and analysis of the resulting PCR product (iii). For a PCR-based system to be accurate and

discriminative, the choice of a suitable target region or genetic marker is of utmost importance. The marker should ideally be variable (polymorphic) enough to allow discrimination between even closely related species, while showing sufficient conservation so that strains of the same species would not be split into different clusters. For the purpose of identification at the strain-level, significant sequence variation should exist within a species. There is no molecular marker perfect for every organism and for delivering solution to every epidemiological question. The choice of an appropriate marker should depend on the objectives of the study. Some markers may work better at discriminating individual strains, while the others – at separating species or higher taxa. For some purposes, markers should be more subject to evolutionary changes being influenced by natural selection, whereas in other situations neutral markers, resistant to selective pressure are preferred.

One of the most widely studied genetic marker for the identification of fungal pathogens has been the ribosomal operon, and its three major components: the large subunit (LSU; 26-28S) with two divergent domains (D1, D2) (i), the small subunit (SSU; 18S) (ii), and two internal transcribed spacers (ITS) between the sequences of 18S and 5.8S (ITS1), and 5.8S and 28S rDNAs (ITS2) (iii). The ITS region has recently been proposed as the prime fungal barcode or the default region for species identification. An exception are the yeasts for which LSU has been selected as the standard for identification. However, both the ITS and ribosomal RNA genes often display insufficient variation to unequivocally identify species. Furthermore, they are too highly conserved within species to allow inter-strain comparisons. Therefore, other alternative markers have been sought. These include protein-encoding genes such as *EF1 α* , *TUB*, *CHS-1*, *COX1*, *RPB1* and *RPB2* coding for elongation factor 1- α , β -tubulin, chitin synthase 1, cytochrome c oxidase subunit 1, and two RNA polymerase II subunits, respectively. The well-established, PCR-based, methods for species identification and strain typing of medically important fungi include Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) method, PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) analysis, nested PCR, real-time (RT) PCR, and PCR direct sequencing. All these techniques have successfully been applied to diagnosis of infections caused by the most prevalent fungal species, representatives of three genera: *Trichophyton*, *Candida*, and *Aspergillus*. Currently, a method preferably chosen is PCR-sequencing, involving multiple loci, whose results provide highest resolution and credibility. Still, at least two limitations exist for sequence-based approaches. First is the paucity of sequence databases and contamination of the existing databases with sequencing errors, making the identification either impossible or doubtful. Second, there is no a reliable and objective cutoff of nucleotide identity for species demarcation. In other words, there still

remains controversy as to what extent the sequences of two strains have to differ before they can be considered as belonging to separate species.

Of further concern is whether a DNA-based identification method is culture-dependent or applicable also to clinical specimens. Developing assays of direct detection is particularly challenging since fungal pathogens can exist as multiple species complexes or at very low concentrations in clinical samples. The ideal method should allow unambiguous species identification at the level of clinical specimen, without the need for culturing.

Molecular methods, despite their pitfalls, provide a powerful diagnostic tool in medical mycology. They have now become an integral part of the clinical mycology laboratory, and by this they play a pivotal role in disease surveillance and implementation disease management strategies.