

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ В ДИАГНОСТИКЕ МАЛАССЕЗИОЗОВ

Т.В. Частий¹, А.П. Белозоров¹, В.В. Минухин²

¹ГУ «Институт дерматологии и венерологии НАМН Украины»

²Харьковский национальный медицинский университет

Резюме. В статье представлены ПЦР - методы обнаружения ДНК грибов рода *Malassezia*. Были обследованы пациенты с дерматозами и здоровые люди. ДНК экстрагировали из соскобов кожи и амплифицировали с специфическими праймерами. ДНК *Malassezia* была обнаружена в $(63,8 \pm 0,9)$ % у больных с дерматозами. Используя секвенирование внутренних транскрибируемых спейсеров рибосомальной РНК была проведена видовая идентификация *Malassezia*. Были идентифицированы *M.furfur*, *M. sympodialis* и *M. globosa*. ПЦР-диагностика и секвенирование являются альтернативными методами выделения и идентификации грибов рода *Malassezia*, которые дополняют традиционные культуральные методы диагностики грибковых инфекций.

Ключевые слова: *Malassezia spp.*, выделение ДНК, ПЦР, дерматозы.

ВВЕДЕНИЕ

Одним из важных факторов, влияющих на течение многих заболеваний кожи и внутренних органов, является грибковая инфекция, в последние десятилетия ее роль значительно повысилась в связи со снижением иммунной реактивности у многих больных и широким применением антибиотиков [6]. Условно-патогенные грибы, находящиеся на коже у многих практически здоровых лиц, при нарушении барьерной функции кожи могут служить возбудителями кожных заболеваний, а при некоторых условиях являются источником аллергенов, сенсibilизирующих организм и вызывающих тяжелые аллергические заболевания [1, 4]. Особое внимание исследователей привлекают условно-патогенные грибы рода *Malassezia*, которые относятся к дрожжеподобным грибам и являются частью

нормальной микрофлоры кожи человека. Однако, при определенных условиях эти грибы могут вызывать различные кожные заболевания, получившие название «малассезиозы», к которым относятся разноцветный лишай, перхоть, себорейный дерматит, малассезиозный фолликулит и др.[9, 13]. Показана роль *Malassezia spp.* в развитии атопического дерматита и псориаза [8, 9].

Для диагностики малассезиозной инфекции в большинстве лабораторий применяют прямую микроскопию патологического материала [2], однако этот метод обладает низкой чувствительностью. Применение культуральных методов диагностики является достаточно трудоемким процессом, для выращивания этих липофильных грибов необходимы селективные, богатые липидами многокомпонентные среды, а также длительное культивирование [3, 7]. Значи-

тельными преимуществами по сравнению с этими методами обладают молекулярно-генетические методы, которые имеют более высокую чувствительность, что дает возможность повысить эффективность диагностики данной инфекции у пациентов с различной кожной патологией. Используя анализ полиморфизма длины рестриционных фрагментов и секвенирование внутренних транскрибированных спейсеров гена рибосомальной РНК определяют первичную структуру фрагментов генома и определяют видовую принадлежность возбудителя [11, 15]. Так в Японии были идентифицированы новые виды грибов *Malassezia* – *M. dermatis* и *M. japonica* у больных с атопическим дерматитом и *M. yamatoensis* у больных с себорейным дерматитом [10, 12, 14]. Постоянно проводятся исследования по изучению видового состава *Malassezia* у больных с малассезиозами и у здоровых лиц в различных популяциях [11].

Цель исследования - используя молекулярно-генетические методы выявить ДНК грибов рода *Malassezia* у больных дерматозами и провести видовую идентификацию клинических изолятов *Malassezia* spp. методом секвенирования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования были смывы и соскобы с кожи пациентов, находившихся на лечении в ГУ «Институт дерматологии и венерологии НАМН Украины». Всего было обследовано 69 больных (28 - с атопическим дерматитом, 21 - с разноцветным лишаем, 11 – с себорейным дерматитом, 9 - с экземой) и 14 здоровых доноров.

Для забора материала к коже прикладывали стерильное пластиковое кольцо диаметром 5 см и делали смыв 2 мл стерильного 0,1% фосфатно - солевого буфера с твин 20. Затем получали осадок, центрифугируя смыв 10 мин при 3000 об/мин. Из осадка выделяли ДНК с помощью метода, который обеспечивает эффективное освобождение ДНК

из клеток грибов и ее очищение от веществ, которые мешают проведению амплификации, а именно экстракцию фенол-хлороформ-изоамиловым спиртом. Определение ДНК грибов рода *Malassezia* проводили разработанным ранее нами методом [5]. Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили в 25 мкл реакционной смеси с праймерами следующего состава: прямой F 992 5' - ctaaataatcggggagagaccga -3' и обратный R 1279 5' - gtgtgaaggtgtccgaagacc -3'. Амплификацию проводили на термоциклере «Терцик» («Биокон», Россия) по следующей программе: первый цикл - денатурация - 95°C, 2 мин., отжиг 54°C, 2 мин., элонгация 70°C, 2 мин. . Затем 39 циклов в следующем режиме: денатурация - 94°C, 30 сек., отжиг 54 °C, 30 сек., элонгация 70°C, 30 сек. Детекцию продуктов амплификации проводили электрофорезом в 1,8% агарозном геле в триацетатном буфере, рН 8,3 с окрашиванием 0,5 mM этидиумом бромидом в течении 15 мин. и анализировали на трансиллюминаторе с длиной волны 310 нм.

Для проведения видовой идентификации выделенных штаммов использовали секвенирование. ДНК грибов выделяли из изолированных колоний, выросших на питательной среде Лиминга–Нотмана [3, 7]. Для амплификации с последующим секвенированием фрагмента гена рибосомальной РНК, находящегося между 18S и 28S субъединицами рибосом и включающих внутренний транскрибированный спейсер ITS 1, 5,8 субъединицу рибосом и внутренний спейсер ITS 2 (18 S---ITS-1---5,8S---ITS-2---28S) использовали следующие праймеры: прямой - ITS 4 (5' - tcctccgcttattgatac-3') и обратный ITS 5 (5' - ggaagtaaaagtcgtaacaagg-3'). Условия амплификации с этими праймерами следующие: после начальной денатурации 95°C, 3 мин, проводили 30 циклов в следующем режиме: денатурация - 95°C, 15 сек., отжиг 50 °C, 10 сек., элонгация 60°C, 4 мин. После проведения амплификации образцы из 10 пробирок объединяли и методом электрофореза проверяли наличие ампликона и

неспецифических продуктов реакции. Продукты ПЦР не содержали большого количества неспецифических продуктов и ампликонов очищали от трифосфатов и Taq-полимеразы осаждением этанолом. Далее определяли концентрацию ДНК спектрофотометрическим методом при $\lambda = 260\text{ нм}$. Секвенирование было проведено фирмой «Пинни» (РФ, Москва) на секвенаторе ABI Prism Genetic Analyzer 3100 фирмы Applied Biosystems.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенных исследований с родоспецифическими праймерами ДНК грибов рода *Malassezia* была выявлена в 53 из 83 исследованных образцов, что составило $(63,8 \pm 0,9) \%$. Положительные образцы на электрофореграмме соответствовали ампликону размером 308 п.н. На рис.1 представлены результаты электрофореза.

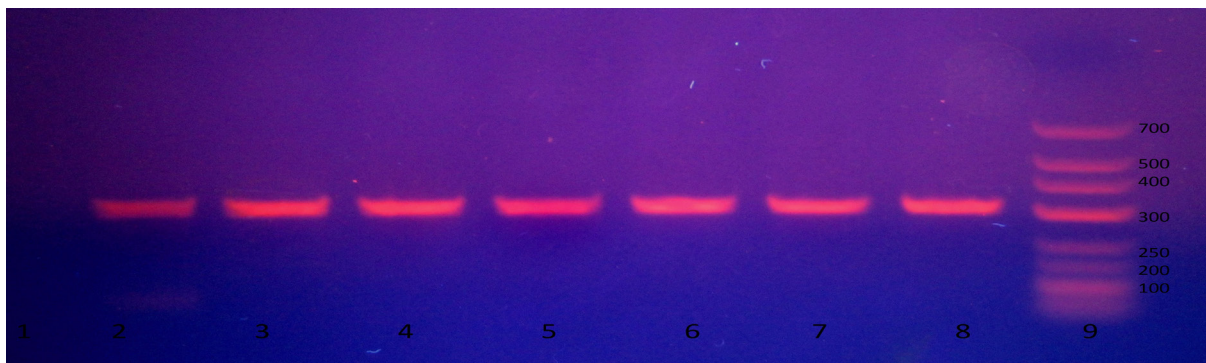


Рисунок 1. Электрофореграмма результатов амплификации ДНК грибов рода *Malassezia* в 1,8 % агарозном геле.

Примечание: 1 лунка – отрицательный контроль, 2-8 лунки – положительные образцы ДНК, 9 лунка – маркер молекулярной массы SM1191 (диапазон 700-25 п.н.)

Наиболее высокая выявляемость ДНК *Malassezia* была отмечена у больных себорейным дерматитом и разноцветным лишаем, что составило $(90,9 \pm 2,9) \%$ и $(90,5 \pm 1,5) \%$ соответственно. Эти результаты являются прямым подтверждением того, что именно грибы *Malassezia* являются основным этиологическим и патогенетическим фактором в развитии этих дерматозов. При разноцветном (отрубевидном) лишае именно эти липофильные грибы являются основным патогенным фактором и под влиянием различных условий грибы начинают трансформироваться из дрожжевой фазы в мицелиарную, которая повреждает роговой слой кожного покрова. У больных с атопическим дерматитом и экземой ДНК грибов *Malassezia* была обнаружена в $(53,6 \pm 3,3) \%$ и $(44,4 \pm 5,5) \%$ случаев соответственно.

Полученные результаты свидетельствуют о достаточно высокой частоте

обнаружения грибов рода *Malassezia* на коже больных с атопическим дерматитом, что является причиной сенсибилизации больных антигенами гриба и поддержания воспалительной гиперергической реакции в коже, которая составляет основной компонент клинических проявлений атопического дерматита. В контрольной группе ДНК грибов *Malassezia* были выявлены в $(35,7 \pm 9,6) \%$ случаев.

Следующим этапом исследований было проведение видовой идентификации грибов рода *Malassezia*. Для этого смывы с кожи пациентов были посеяны на модифицированный агар Лиминга-Нотмана и культивировались при 34°C в течение 4-7 суток.[7] ДНК выделяли из изолированных колоний и амплифицировали с праймерами ITS 4 и ITS 5. Амплифицированные фрагменты соответствовали фрагменту ~ 700 пн. Наличие ДНК *Malassezia* проверяли на электрофорезе (рис.2).

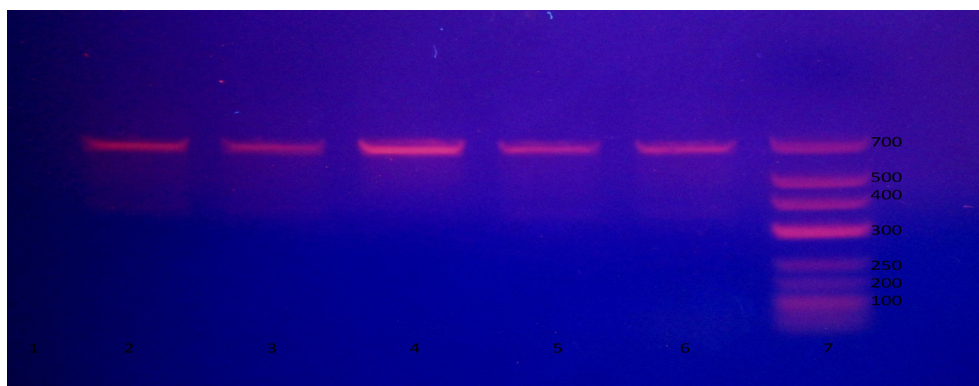


Рисунок 2. Электрофореграмма результатов амплификации ДНК изолятов грибов рода *Malassezia* в 1,8 % агарозном геле

Примечание: 1 лунка – отрицательный контроль, 2-6 лунки – клинические изоляты грибов, 7 лунка – маркер молекулярной массы SM1191).

После очистки ампликонов осаждением этанолом определяли концентрацию ДНК, которая составила 3 нг/мкл. Результаты секвенирования - нуклеотидная последовательность исследуемых ДНК - была анализируется при помощи программы BLAST на сайте NCBI [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>]. В результате сравнения с базой данных NCBI были идентифицированы следующие виды *Malassezia* – *Malassezia furfur* – 2 штамма, *Malassezia sympodialis* – 2 штамма, *Malassezia globosa* – 1 штамм. (рис. 3).

Следует отметить, что секвенирование имеет преимущества перед другими методами видовой идентификации, особенно при исследовании атипичных изолятов, что дает

возможность получить достаточно быстрый ответ и не требует длительных изучений биохимических свойств культуры.

Из данных мировой научной литературы известно, что именно эти виды *Malassezia* преобладают в европейской популяции [9]. *M.furfur* и *M. globosa* являются причиной развития разноцветного лишая и себорейного дерматита, а *M. sympodialis* благодаря разнообразной антигенной структуре, обладает высокой иммуногенной активностью и тем самым способна экспрессировать антигены, индуцирующие выработку Ig-E антител, что является одним из факторов патогенеза в развитии атопического дерматита [4, 9].

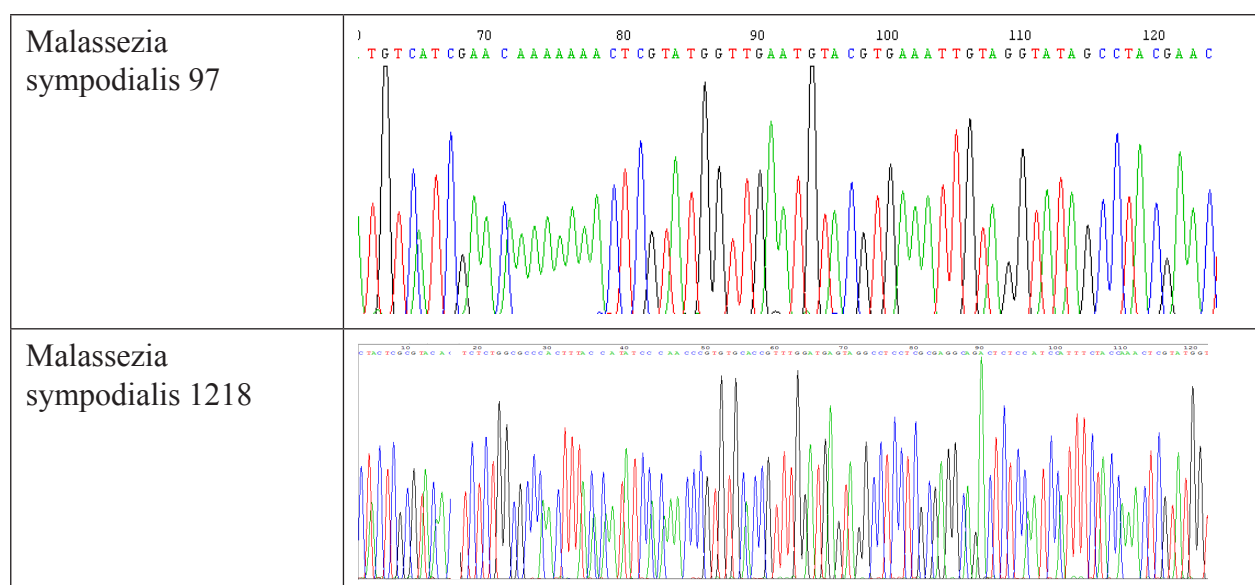




Рисунок 3 Фрагменты секвенограмм

ВЫВОДЫ

1. Методом ПЦР были обнаружены грибы рода *Malassezia* у (63,8±0,9) % больных дерматозами.

2. Наиболее часто ДНК *Malassezia* была выявлена у больных себорейным дерматитом (90,9±2,9) % и разноцветным лишаем (90,5±1,5) %.

3. Используя секвенирование внутренних транскрибированных спейсеров гена рибо-

сомальной ДНК 18 S---ITS-1---5,8S---ITS-2--
-28S была проведена видовая идентификация грибов *Malassezia* и идентифицировано 5 штаммов исследуемых грибов: *M.furfur* – 2 штамма, *M. sympodialis* – 2 штамма, *M. globosa* – 1 штамм.

4. ПЦР диагностика и секвенирование являются эффективными методами выделения и идентификации грибов рода *Malassezia* существенно дополняющие традиционные методы диагностики грибковых инфекций.

ЛИТЕРАТУРА

1. Аак О.В. Аллергены грибов. Особенности микогенной сенсибилизации (обзор) / О.В. Аак // Проблемы медицинской микологии. – 2005. – Т.7, №2. – С.12-16.

2. Горбунцов В.В. Диагностика малассезиоза кожи / В.В. Горбунцов // Дерматовенерол. Косметолог. Сексопатолог. – 2002. – №3-4(5). – С. 6-9.

REFERENCES

1. Aak O.V. Allergy gribov. Osobennosti mikogennoj sensibilizacii (obzor) // Problemy medicinskoj mikologii. – 2005. – T.7, № 2. –S.12-16.(Russian)

2. Gorbuntsov V.V. Diagnostika malassezioza kozhi // Dermatovenerol. Kosmetolog. Seksopatolog. – 2002. – №3-4(5). – S. 6-9. (Russian)

3. Виділення, культивування, типування ліпофільних грибів роду *Malassezia* та визначення їх чутливості до антимікотиків / І.І. Мавров, Т.В. Частій, Ж.Е. В'ялих [та ін.] // Методичні рекомендації. – Київ: Знання України. – 2009. – 24 с.

4. Мокроносова М.А. Значение дрожжеподобных грибов в патогенезе atopического дерматита / М.А. Мокроносова // Аллергология. – 2005. – № 4. – С.24-29.

5. Пат. 30701 UA, МПК G01N 33/00 (2006) u200711932 Спосіб детекції грибів роду *Malassezia* в клінічних зразках / І.І. Мавров, О.П. Білозоров, О.А. Сокол, І.А. Безрученко, О.Й. Мілютина, О.О. Білозорова, М.І. Зуєва, В.М. Васильченко; заявник Інститут дерматології та венерології АМН України. – № u 200711932; заявл. 29.10.2007; опубл. 11.03.2008, Бюл. № 5, 2006 р.

6. Сергеев А.Ю. Грибковые инфекции. Руководство для врачей / А.Ю. Сергеев, Ю.В. Сергеев. – М.: Бинум, 2008. – 480 с.

7. Цыганенко А.Я. Микробиологические особенности выделения и идентификации грибов рода *Malassezia* / А.Я. Цыганенко, Т.В. Частий // Теоретична і експериментальна медицина. – 2011. – №4(53). – С.5-8.

8. Beiber T. Atopic dermatitis (review article) // *New Engl.J. Med.* – 2008. – Vol. 358, №14. – P.1483-1494.

9. Boekhout T. *Malassezia* and the Skin: Science and Clinical Practice / T.Boekhout, E.Gueho, P.Mauser // Springer –Verlag Berlin Heidelberg, 2010. – 319 p.

10. Description of a new yeast species, *Malassezia japonica*, and its detection in patients with atopic dermatitis. / T. Sugita, M. Takashima, M. Kodama [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* – 2003. – Vol. 41, №. 10. – P. 4695-4699.

11. Distribution of *Malassezia* species on the skin of patients with atopic dermatitis, psoriasis, and healthy volunteers assessed by conventional and molecular identification methods / T. Jagielski, E. Rup, A. Ziółkowska [et al.] // *BMC Dermatology.* – 2014. – Vol.14. – P.3

12. New yeast *Malassezia yamatoensis*, isolated from a patient with seborrhoea dermatitis, and its distribution in patient and healthy sub-

3. Mavrov I.I., Chastiy T.V., V'yalih Zh.E. [ta in.] Vidilennya, kultivuvannya, tipuvannya lipofilnih gribov rodu *Malassezia* ta viznachen-nya yih chutlivosti do antimikotikiv // Metod-ichni rekomendatsii. – Kiyiv: Znannya Ukrayini. – 2009. – 24 s.(Ukrainian)

4. Mokronosova M.A. Znachenie drozhzhepodobnyh gribov v patogeneze atopicheskogo dermatit // *Allergologiya.* –2005. – № 4. –S.24-29. (Russian)

5. Pat. 30701 UA, MPK G01N 33/00 (2006) u200711932 Sposib detektsii gribov rodu *Malassezia* v klinichnuh zrazkah / I.I. Mavrov, O.P. Bilozorov, O.A. Sokol, I.A. Bezrutchenko, O.I. Milyutina, O.O. Bilozorova, M.I. Zueva, V.M. Vasilchenko; zayavnik Institut dermatologii i venerologii AMN Ukraine. – № u 200711932; zayavl. 29.10.2007; opubl. 11.03.2008, Byul. № 5, 2006.

6. Sergeev A.Yu., Sergeev Yu.V. Gribkovyye infektsii. Rukovodstvo dlya vrachey // М.: Binom, 2008. – 480 s. (Russian)

7. Tsyiganenko A.Ya., Chastiy T.V. Mikrobiologicheskie osobennosti vyideleniya i identifikatsii gribov rodu *Malassezia* // Теоретична і експериментальна медицина. –2011. – №4 (53). –S.5-8. (Russian)

8. Beiber T. Atopic dermatitis (review article) // *New Engl.J. Med.*, 2008. –Vol. 358, №14. – P.1483-1494.

9. Boekhout T., Gueho E., Mauser P., Vel-graki A. *Malassezia* and the Skin: Science and Clinical Practice // Springer – Verlag Berlin Heidelberg, 2010. – 319 p.

10. Sugita T., Takashima M., Kodama M. [et al.] Description of a new yeast species, *Malassezia japonica*, and its detection in patients with atopic dermatitis. // *J. Clin. Microbiol.* —2003. – Vol. 41, №. 10. – P. 4695-4699

11. Jagielski, T., Rup E., Ziółkowska A. [et al.] Distribution of *Malassezia* species on the skin of patients with atopic dermatitis, psoriasis, and healthy volunteers assessed by conventional and molecular identification methods // *BMC Dermatology.* –2014. –Vol.14. – P. 3

12. Sugita T., Tajima M., Takashima M. [et al.] New yeast *Malassezia yamatoensis*, isolated from a patient with seborrhoea dermatitis, and

jects / T., Sugita M. Tajima, M. Takashima [et al.] // Microbiol. Jmmunol. – 2004. – Vol.48, №.8. – P.579-583.

13. Recent advances in research on Malassezia microbiota in humans./ T. Sugita, E. Zhang, T. Tanaka, [et al.] // Med Mycol J. – 2013. – Vol.4, №.1. – P.39-44.

14. Sugita T. New yeast species, Malassezia dermatis, isolated from patients with atopic dermatitis / T. Sugita, M. Takashima, T. Shinoda, H. Suto // J. Clin. Microbiol. – 2002. – Vol. 40. – P. 1363-1367.

15. Quantitative analysis of the cutaneous Malassezia microbiota in 770 healthy Japanese by and gender using a real – time PCR assay. / T. Sugita, M. Suzuki, S. Goto [et al.] // Med Mycol. – 2010. – Vol. 48, № 2. – P. 229-233.

its distribution in patient and healthy subjects // Microbiol. Jmmunol. –2004. –Vol.48, №8. –P.579-583.

13. Sugita T., Zhang E., Tanaka T. [et al.] Recent advances in research on Malassezia microbiota in humans. // Med Mycol J. –2013. –Vol.4, №.1. –P.39-44.

14. Sugita T. , Takashima M., Shinoda T., Suto H. New yeast species, Malassezia dermatis, isolated from patients with atopic dermatitis // J. Clin. Microbiol. –2002. – Vol. 40. – P. 1363-1367.

15. Sugita T., Suzuki M., Goto S. [et al.] Quantitative analysis of the cutaneous Malassezia microbiota in 770 healthy Japanese by and gender using a real-time PCR assay // Med Mycol. –2010. –Vol. 48, № 2. – P. 229-233.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНІ МЕТОДИ В ДІАГНОСТИЦІ МАЛАССЕЗІОЗІВ

**Частій Т.В.¹,
Білозоров О.П.¹,
Мінухін В.В.²**

¹ГУ «Інститут дерматології та венерології НАМН України»

²Харьковській національний медичний університет

Резюме. У статті наведено ПЛР - методи виявлення ДНК грибів роду *Malassezia*. Були обстежені пацієнти з дерматозами і здорові люди. ДНК екстрагували з зішкрябів шкіри і ампліфікували з специфічними праймерами. ДНК *Malassezia* була виявлена в $(63,8 \pm 0,9) \%$ у хворих з дерматозами. Використовуючи секвенування внутрішніх транскрибованих спейсерів гену рибосомальної РНК була проведена видова ідентифікація *Malassezia*. Були ідентифіковані *M.furfur*, *M. sympodialis* і *M. globosa*. ПЛР-діагностика і секвенування є

MOLECULAR GENETIC METHODS IN THE DIAGNOSIS OF MALASSEZIASIS

**Chastiy T.V.¹,
Belozorov A.P.¹,
Minukhin V.V.²**

¹SE «Institute of Dermatology and Venereology of NAMS of Ukraine»

²Kharkiv National Medical University

Abstract. The article presents the PCR - methods of detection of *Malassezia*. Patients with dermatoses and healthy people were examined. DNA was extracted from skin samples and amplified with specific primers. DNA was detected in $(63,8 \pm 0,9) \%$ in patients with skin diseases. Using the sequence of internal transcribed spacers of ribosomal RNA was performed *Malassezia* species identified. Was identified *M.furfur*, *M. sympodialis* and *M. globosa*. PCR diagnostics and sequence are effective methods of isolation and identification of fungi of the genus *Malassezia* and com-

*ефективними методами виділення та ідентифікації грибів роду *Malassezia*, які доповнюють традиційні культуральні методи діагностики грибкових інфекцій.*

plement traditional methods of diagnosis of fungal infections.

Key words: *Malassezia spp., detection of DNA, PCR, skin diseases.*

Ключові слова: *Malassezia spp., виділення ДНК, ПЛР, дерматози.*

Об авторах:

Частий Татьяна Владимировна – младший научный сотрудник лаборатории иммунологии, патоморфологии и молекулярной генетики ГУ «Институт дерматологии и венерологии НАМН Украины», tchastij@rambler.ru

Белозоров Алексей Павлович – доктор мед. наук, заведующий лаборатории иммунологии, патоморфологии и молекулярной генетики ГУ «Институт дерматологии и венерологии НАМН Украины».

Минухин Валерий Владимирович – доктор мед. наук, профессор, заведующий кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии Харьковского национального медицинского университета.