

MOLEKULOVO-BIOLOGICKÉ METÓDY POUŽÍVANÉ PRI ANALÝZE KVASINIEK RODU *Malassezia*

ZUZANA SIHELSKÁ a EVA ČONKOVÁ

Katedra farmakológie a toxikológie, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice
zuzana.sihelska@uvlf.sk

Došlo 25.11.15, prijaté 8.12.15.

Kľúčové slová: *Malassezia*, DNA, gén, molekulo-biologická analýza, identifikácia

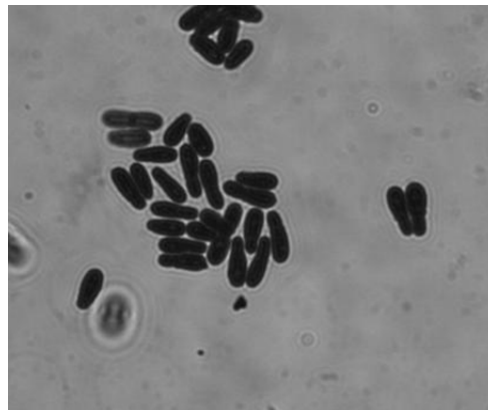
Obsah

1. Úvod
2. rDNA génový komplex
3. Molekulo-biologické metódy
 - 3.1. DNA sekvenčné analýzy
 - 3.2. PCR analýzy
 - 3.3. Fingerprintingové metódy
 - 3.4. MALDI-TOF-MS
4. Záver

1. Úvod

Do rodu *Malassezia* patria lipofilné kvasinky, ktoré sú súčasťou bežnej mikroflóry kože a slizníc zvierat a ľudí. Za určitých podmienok sa môžu stať patogénnymi a spôsobiť prevažne ochorenia kože¹. Medzi predispozičné faktory, ktoré podmieňujú ich vznik, patrí: imunodeficiencia, zvýšený mazotok, vysoká teplota a vlhkosť prostredia, kortikosteroidná liečba, chronické ochorenia a iné². Ochorenia spôsobené zástupcami tohto rodu majú stúpajúcu tendenciu. *Malassezia* spp. je u ľudí spojená s kožnými ochoreniami ako pityriasis versicolor, seboroická dermatitída, atopický ekzém, folikulitída, a iné. Malassezie spôsobujú aj vážne septikémie u predčasne narodených novorodencov a imunodeficitných detí a pacientov, ktorým bola podaná parenterálna výživa s obsahom lipidov². U zvierat (hlavne u psov a mačiek) je najčastejšie zodpovedná za otitídy a dermatitídy, ktoré majú často zdĺhavý priebeh a môžu vyústiť až do chronických stavov³.

Do roku 1990 boli známe len tri druhy malassezií a až s rozvojom molekulo-biologických analýz boli postupne identifikované nové druhy. V súčasnosti je potvrdená existencia 14 druhov: *M. furfur* (obr. 1) *M. restricta*, *M. japonica*, *M. yamatoensis*, *M. dermatis*, *M. obtusa*, *M. sympodialis*, *M. globosa*, *M. slooffiae*, *M. pachydermatis*, *M. nana*, *M. caprae*, *M. equina* a *M. cuniculi*⁴.

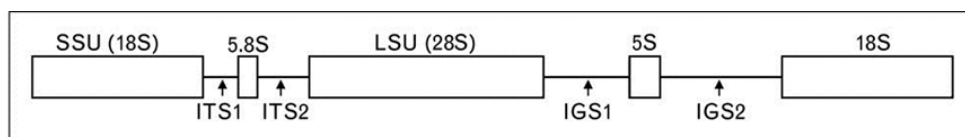


Obr. 1. Bunky *M. furfur* – typický tvar buniek kvasinky rodu *Malassezia* (Axio Observer Z.1, 1000 ×)

Identifikácia jednotlivých druhov malassezií je náročná a súvisí s ich zložitou kultiváciou a izoláciou. Na diagnostiku sa využívajú laboratórne metódy založené na sledovaní fenotypových vlastností (morfologická, biochemická a fyziologická charakteristika) alebo molekulo-biologické analýzy (DNA sekvenčné analýzy, reštrikčné analýzy a iné). Po roku 1995 sa začali pri určovaní kvasiniek rodu *Malassezia* používať genotypové metódy, ktorými bola identifikovaná väčšina nových druhov⁵. Napr. v roku 2007 boli pomocou molekulo-biologických analýz objavené druhy – *M. caprae* a *M. equina*, a to z izolátov pôvodne považovaných za *M. sympodialis*⁶. Presná identifikácia malassezií fenotypovými metódami nie je možná, pretože ju komplikujú značné rozdiely v hodnotení a popise biochemických vlastností malassezií rozličnými autormi^{5,7,8}. Genotypovým overením 46 klinických izolátov, ktoré boli fenotypovo vyhodnotené ako *M. furfur* bolo zistené, že až 22 izolátov z nich bolo v skutočnosti *M. sympodialis* a päť izolátov *M. slooffiae*⁹. Aj výskyt kmeňov s atypickými fyziologickými a biochemickými vlastnosťami^{10–12} potvrdzuje dôležitosť využitia metód identifikácie malassezií na génovej úrovni. Molekulo-biologické metódy sa okrem identifikácie malassezií využívajú aj pri určovaní subtypov a genotypov a pri skúmaní fylogenetických a epidemiologických vzťahov malassezií.

2. rDNA génový komplex

Pri analýze a identifikácii kvasiniek je veľmi často využívaný tzv. rDNA génový komplex (obr. 2). Používa sa aj označenie rRNA génový komplex, ktorý na rozdiel

Obr. 2. rDNA génový komplex¹⁴

od rDNA komplexu nezahŕňa IGS región (Intergenic Spacer Region). Fungálny génový komplex pozostáva z mnohonásobných kópií génových oblastí: 18S, 5.8S, 26(28)S a 5S. 18S predstavuje malú podjednotku (Small Subunit – SSU) a 28S je označený ako veľká podjednotka (Large Subunit – LSU). Medzi podjednotkami sú vložené dva regióny, a to ITS1 a ITS2 región (Internal Transcribed Spacer Region) a IGS1 a IGS2 región. Génové oblasti u jednotlivých druhov *Malassezia* majú viac alebo menej konštantnú dĺžku: SSU – 1800 bp (bázových párov), 5.8S – 160 bp, LSU – 3500 bp a 5S – 120 bp. rDNA génový komplex slúži aj na porovnávanie medzi fylogeneticky vzdialenými druhmi rodu *Malassezia*. Fylogeneticky blízke druhy sú porovnávané vďaka viac variabilným úsekom, a to ITS a IGS regiónom¹³.

3. Molekulovo-biologické metódy

3.1. DNA sekvenačné analýzy

Pre identifikáciu sekvenáciou je potrebné zvoliť taký génový úsek, ktorý obsahuje viacero génových variácií, a tým umožní diferenciáciu jednotlivých druhov. V rámci druhu by daný génový úsek nemal vykazovať žiadne rozdielnosti, prípadne môžu byť prítomné len minimálne génové variácie. Pri identifikácii druhov a kmeňov rodu *Malassezia* sekvenáciou sa najčastejšie využíva LSU oblasť, ITS1 a ITS2 región¹⁵. Sekvenačná analýza IGS1 regiónu nie je využívaná na druhové zatriedenie, pretože sa vyznačuje veľkou vnútrodruhovou sekvenačnou rôznorodosťou.

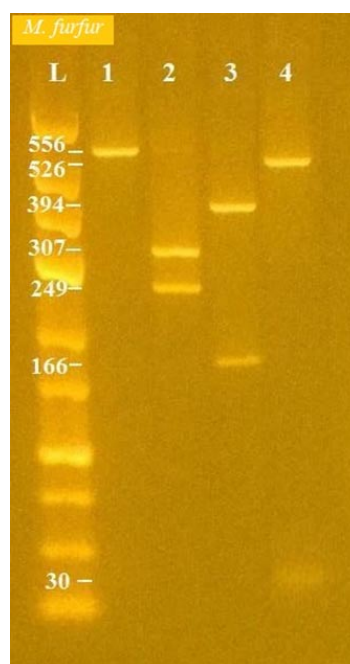
Z genetického a epidemiologického hľadiska zaujímavé informácie poskytuje analýza génu syntetizujúceho chitín. Táto metóda ešte nebola použitá pre štúdium *Malassezia* získaných od ľudí alebo zvierat iných ako od psov¹⁶. Castellá a spol.¹⁷ charakterizovali všetkých 14 druhov analýzou kombinácie dvoch proteín kódujúcich génov (gén syntetizujúci chitín a β -tubulín gén), pričom zistili, že táto metóda môže pomôcť hlavne pri identifikácii nových druhov.

3.2. PCR analýzy

PCR-RFLP – Metóda štiepenia PCR ampliconov reštrikčnými enzýmami

Jednou z často používaných a zároveň presných molekulovo-biologických metód je polymerázová reťazová

reakcia (PCR) s následnou reštrikčnou analýzou (RFLP). Princípom PCR reakcie je opakujúca sa enzymatická syntéza nových reťazcov vybraných úsekov DNA, ku ktorej prichádza po pripojení sa dvoch primerov, ktoré sa viažu na protiľahlé reťazce DNA tak, že ich 3' OH konce smerujú oproti sebe¹⁸. Po PCR nasleduje RFLP, pri ktorej dochádza k štiepeniu PCR ampliconov vybranými reštrikčnými endonukleázami. RFLP pre diagnostiku *Malassezia* bolo navrhnuté viacerými autormi (obr. 3). Autori¹⁹ pomocou PCR-RFLP diferencovali 11 druhov (*M. furfur*, *M. pachydermatis*, *M. sympodialis*, *M. obtusa*, *M. globosa*, *M. restricta*, *M. slooffiae*, *M. dermatis*, *M. nana*, *M. japonica* a *M. yamatoensis*), a to amplifikáciou 26S rDNA sekvencie s použitím dvoch reštrikčných enzýmov (*CfoI* a *BstFI*). Iní autori²⁰ odlišili tých istých 11 druhov, ale digesciou ITS2 regiónu pomocou enzýmov *AluI*, *BanI* a *MspAII*. V analýze nie je zahrnutá identifikácia animál-



Obr. 3. RFLP analýza terénneho izolátu *M. furfur* získaného od psa; L – GeneRuler Low Range DNA Ladder (bp), 1 – neštiepený PCR amplicon *M. furfur*, 2 – PCR amplicon *M. furfur* štiepený s *AluI*, 3 – PCR amplicon *M. furfur* štiepený s *BanI*, 4 – PCR amplicon *M. furfur* štiepený s *MspAII*

nych druhov *M. caprae*, *M. equina* a *M. cuniculi*, čo komplikuje diagnostiku malassezií u zvierat. Výhodami PCR-RFLP analýzy je menšia náročnosť oproti väčšine molekulovo-biologických metód, presnosť a menšie technické požiadavky na prístrojové vybavenie.

Multiplex PCR

Multiplex PCR je jednou z najnovších metód, ktoré sa použili na diagnostiku malassezií. Na identifikáciu postačuje jedna PCR s viacerými párami primerov. Bola navrhnutá pre určenie len 11 druhov vyskytujúcich sa u ľudí a identifikácia je možná aj bez predchádzajúcej kultivácie vzoriek, priamo z ľudských kožných buniek. Metóda je rýchla, dostatočne špecifická a nenáročná na prístrojové vybavenie. Druhy *M. equina*, *M. cuniculi* a *M. caprae* typické pre zvieratá sa touto metódou nedajú identifikovať, čo je hlavnou nevýhodou tejto metódy²¹.

Real-time PCR

Real-time PCR je varianta PCR, ktorá umožňuje priamu kvantifikáciu PCR produktu v priebehu reakcie (PCR v „reálnom čase“). Je dôležitá pri detailnom štúdiu gémovej exprese alebo diagnostike patogénov. Táto metóda sa začína častejšie využívať už aj vo výskume malassezií. Bola úspešne použitá pre identifikáciu malasseziiových druhov priamo vo vzorkách od ľudí²². Bola vytvorená aj multiplex real-time PCR, ktorá zvýšila účinnosť tejto metódy, pretože si vyžaduje menej DNA a zjednodušuje technickú realizáciu a analýzu dát²³.

tFLP – Polymorfizmus dĺžky terminálnych fragmentov

Metóda tFLP (terminal fragment length polymorphism) je menej a dávnejšie použitá metóda analýzy malassezií. Bola prevedená na 7 druhoch malassezií. Výhodou je, že touto metódou sa dá dokázať prítomnosť malassezií aj v zmiešaných vzorkách a vo vzorkách ľudských lupín aj bez predchádzajúcej kultivácie²⁴. Hlavnou nevýhodou ostáva, že metóda nebola prispôbená všetkým druhom rodu *Malassezia*.

3.3. Fingerprintingové metódy

PFGE – Pulzná gélová elektroforéza

Elektroforézny karyotyping využíva PFGE (pulsed field gel electrophoresis) na sledovanie chromozómovej heterogenity medzi jednotlivými druhmi malassezií²⁵. Pomocou PFGE bol určený počet chromozómov niektorých druhov: *M. pachydermatis* – 5/6/7, *M. globosa* – 8, *M. obtusa* – 6, *M. restricta* – 9, *M. slooffiae* – 7, *M. sympodialis* – 7, *M. furfur* typ I – 7/8, *M. furfur* typ II – 10/11 (cit.²⁶). Karyotyp ostatných druhov malassezií nebol preskúmaný. Ďalším významným faktom, ktorý bol zistený pomocou PFGE, je malá veľkosť genómu týchto kvasiniek (6,4 až 14 Mb)²⁷. Hoci je PFGE užitočná metóda, je časovo náročná a vyžaduje veľké množstvo genómovej DNA, a práve preto je menej vhodná na rutinnú diagnostiku malassezií¹⁶.

RAPD – Náhodná amplifikácia polymorfnej DNA

Metóda RAPD (randomly amplified polymorphic DNA) bola použitá vo viacerých štúdiách, či už na taxonomické zatriedenie malassezií, zistenie genetickej heterogenity alebo skúmanie epidemiologických vzťahov. Touto metódou bolo preskúmaných 7 druhov malassezií, ktoré sa dajú navzájom odlíšiť, aj keď je analýza sťažená prítomnosťou intragénových variácií¹³. Najväčšia homogenita bola zaznamenaná pri *M. sympodialis*²⁸. RAPD sa dá použiť aj pre charakteristiku a identifikáciu atypických kmeňov malassezií¹⁰.

V štúdiu izolátov *M. pachydermatis* autori charakterizovali až 4 genetické typy *M. pachydermatis*. Zistili, že rozličné genotypy tohto druhu sa môžu vyskytovať u jedného zvieratá alebo dokonca na jednotlivých častiach tela jedného zvieratá²⁹. Medzi najväčšie výhody RAPD patrí technická nenáročnosť a vysoká diferenciálna schopnosť. K uskutočneniu RAPD nie je potrebný vzor nukleotidovej sekvencie cieľovej DNA. Nízke percento omylu a vysoký stupeň špecifickosti potvrdzujú, že sa jedná o citlivú metódu vhodnú na odlišenie aj geneticky veľmi blízkych druhov³⁰.

AFLP – Dĺžkový polymorfizmus amplifikovaných fragmentov

Princíp AFLP (amplified fragment length polymorphism) je založený na selektívnej amplifikácii restriktčných fragmentov v rámci celého genómu. Je to všeobecne uznávaná DNA metóda, ktorá sa používa na zistenie genetických vzťahov medzi izolátmi malassezií⁶. Pomocou AFLP bolo analyzovaných 7 druhov malassezií, pričom pri *M. furfur* sa určili až 4 genetické subtypy. Spolu s RAPD je vhodná na subtypizáciu a diferenciáciu medzi malasseziiovými kmeňmi³¹. Táto metóda vyžaduje malé množstvo genómovej DNA, je dobre reprodukovateľná a vysoko citlivá. Častejšie sa ale využíva pri vedeckých štúdiách, pretože výsledky sú príliš komplikované na praktické využitie pri vzorkách od klinických pacientov¹⁹.

DGGE – Denaturujúca gradientná gélová elektroforéza

DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) je založená na rozdielnej pohyblivosti čiastočne denaturovanej dvojvláknovej DNA v denaturovanom akrylamidovom géli. Pomocou tejto metódy sa dajú odlíšiť PCR fragmenty s rovnakou veľkosťou, avšak s rozdielnou sekvenciou a patriace k odlišným druhom³². Táto metóda je vhodná na identifikáciu vzoriek *Malassezia* spp., avšak klinické použitie je obmedzené technickou náročnosťou metódy. Výhodou tejto metódy je možnosť identifikácie viacerých druhov malassezií v jednej vzorke, ale je časovo a technicky náročná³¹. Tak ako ostatné vyššie spomínané DNA metódy prispieva nielen k identifikácii jednotlivých druhov, ale aj k pochopeniu ich úloh v epidemiológii a patogenéze ochorení.

3.4. MALDI-TOF-MS

MALDI-TOF-MS (matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry) je ionizačná

technika používaná v hmotnostnej spektrometrii. Je jednou z najnovších metód použitých pri identifikácii malassezií. Potvrdilo sa, že je vhodná na detekciu všetkých 14 malasseziových druhov. Je rýchla a spoľahlivá, avšak tak ako pri väčšine molekulovo-biologických analýzach je potrebné pred samotnou identifikáciou previesť kultiváciu vzoriek. Je vhodná pre odlišenie jednotlivých druhov a je predpoklad, že môže mať potenciál pre typizáciu kmeňov. Toto tvrdenie je potrebné ďalej preskúmať. V prípade, že by kožné stery obsahovali dostatok genómovej DNA, bude možné v budúcnosti aj priame MALDI-TOF-MS vyšetrenie bez potrebnej predchádzajúcej kultivácie^{33,34}.

4. Záver

Za posledných 20 rokov pokroky v oblasti výskumu a technológie prispeli vo veľkej miere k objasneniu klinickej úlohy malassezií pri ochoreniach ľudí a zvierat. Metódy založené na hodnotení kultivačných, biochemických a fyziologických vlastností malassezií neumožňujú presnú identifikáciu jednotlivých druhov. Molekulárny prístup k malasseziám priniesol nové poznatky nielen v identifikácii a taxonómii, ale aj v epidemiológii a patogenéze týchto kvasiniek. Článok podáva prehľad o možnostiach využitia molekulovo-biologických metód pri analýze kvasiniek rodu *Malassezia*, o ich výhodách a limitoch. Väčšina genotypových metód je stále závislá na kultivácii vzoriek. Len pár analýz je schopných diagnostiky bez predchádzajúcej kultivácie (napr. tFLP), avšak to je podmienené dostatočným množstvom biologického materiálu, z ktorého sa získava DNA. Niektoré metódy sú časovo a technicky náročnejšie (napr. DGGE, PFGE, AFLP), ale v porovnaní s ostatnými poskytujú viac údajov. Pre samotnú identifikáciu druhu sa použije iná metóda, ako keď je potrebné bližšie špecifikovať napr. genotyp. Nedá sa jasne stanoviť, ktorá metóda je tá najlepšia, pretože z veľkej miery je to závislé od toho, čo je potrebné v rámci analýzy zistiť.

Práca bola podporená projektom APVV 0357-07.

Zoznam použitých skratiek

AFLP	dĺžkový polymorfizmus amplifikovaných fragmentov (amplified fragment length polymorphism)
bp	bázové páry
DGGE	denaturujúca gradientná gélová elektroforéza (denaturing gradient gel electrophoresis)
IGS	intergenic spacer region
ITS	internal transcribed spacer region
LSU	veľká podjednotka-28S (large subunit)
PCR	polymerázová reťazová reakcia (polymerase chain reaction)
PFGE	pulzná gélová elektroforéza (pulsed field gel electrophoresis)
RAPD	náhodná amplifikácia polymorfnej DNA (randomly amplified polymorphic DNA)

RFLP	dĺžkový polymorfizmus reštrikčných fragmentov (restriction fragment length polymorphism)
SSU	malá podjednotka-18S (small subunit)
tFLP	dĺžkový polymorfizmus terminálnych fragmentov (terminal fragment length polymorphism)

LITERATÚRA

- Guého E., Boekhout T., Ashbee H. R., Guillot J., Van Belkum A., Faergemann J.: *Med. Mycol.* 36, 220 (1998).
- Marcon M. J., Powell D. A.: *J. Clin. Microbiol.* 5, 101 (1992).
- Crespo M. J., Abarca M. L., Cabañes F. J.: *Med. Mycol.* 40, 115 (2002).
- Cabañes F. J., Vega S., Castellá G.: *Med. Mycol.* 49, 40 (2011).
- Guého E., Midgley G., Guillot J.: *Antonie van Leeuwenhoek* 69, 337 (1996).
- Cabañes F. J., Theelen B., Castellá G., Boekhout T.: *FEMS Yeast Res.* 7, 1064 (2007).
- Batra R., Boekhout T., Guého E., Cabañes F. J., Dawson T. L., Gupta A. K.: *FEMS Yeast Res.* 5, 1101 (2005).
- Kaneko J., Makimura K., Abe I., Shiota R., Nakamura Y., Kano R., Hasegawa A., Sugita T., Shibuya S., Watanabe S., Yamaguchi H., Abe S., Okamura N.: *J. Clin. Microbiol.* 45, 3737 (2007).
- Makimura K., Tamura Y., Kudo M., Uchida K., Saito H., Yamaguchi H.: *J. Med. Microbiol.* 49, 29 (2000).
- Duarte E. R., Resende J. C. P., Hamdan J. S.: *Arq. Inst. Biol.* 76, 157 (2009).
- González A., Sierra R., Cárdenas M. E., Grajales A., Restrepo S., Cepero de García M. C., Celis A.: *J. Clin. Microbiol.* 47, 48 (2009).
- Cafarchia C., Latrofa M. S., Figueredo L. A., da Silva Machado M. L., Ferreira L., Guillot J., Boekhout T., Otranto D.: *Med. Mycol.* 49, 365 (2011).
- Boekhout T., Mayser P., Guého-Kellermann E., Velegraki A.: *Malassezia and the Skin*. Springer, Berlin 2010.
- Innis M. A., Gelfand D. H., Sninsky J. J., White T. J., (ed.): *PCR protocols: A guide to methods and applications*. NY Academic Press, New York 1990.
- Makimura K., Tamura Y., Kudo M., Uchida K., Saito H., Yamaguchi H.: *J. Med. Microbiol.* 49, 29 (2000).
- Cafarchia C., Gasser R. B., Figueredo L. A., Latrofa M. S., Otranto D.: *Mol. Cell. Probes* 25, 1 (2011).
- Castellá G., Coutinho S. D., Cabañes F. J.: *Med. Mycol.* 52, 99 (2014).
- Brown T. A.: *Gene cloning and DNA analysis*. Blackwell Science, Oxford 2006.
- Mirhendi H., Makimura K., Zomorodian K., Yamada T., Sugita T., Yamaguchi H.: *J. Microbiol. Methods* 61, 281 (2005).
- Gaitanis G., Velegraki A.: *J. Dermatol. Sci.* 43, 214

- (2006).
21. Vuran E., Karaarslan A., Karasartova D., Turegun B., Sahin F.: *Mycopathologia* 177, 41 (2014).
 22. Takahata Y., Sugita T., Hiruma M., Muto M.: *Br. J. Dermatol.* 157, 670 (2007).
 23. Paulino L. C., Tseng C. H., Blaser M. J.: *FEMS Yeast Res.* 8, 460 (2008).
 24. Gemmer C. M., DeAngelis Y. M., Theelen B., Boekhout T., Dawson T. L.: *J. Clin. Microbiol.* 40, 3350 (2002).
 25. Howell S. A., Quin C., Midgley G.: *Mycoses*, 36, 263 (1993).
 26. Boekhout T., Renting M., Scheffers W. A., Bosboom R.: *Antonie van Leeuwenhoek* 63, 157 (1993).
 27. Xu J., Saunders C. W., Hu P., Grant R. A., Boekhout T., Kuramae E. E., Kronstad J. W., Deangelis Y. M., Reeder N. L., Johnstone K. R., Leland M., Fieno A. M., Begley W. M., Sun Y., Lacey M. P., Chaudhary T., Keough T., Chu L., Sears R., Yuan B., Dawson T. L. Jr.: *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 18730 (2007).
 28. Celis A. M., Cepero de García M. C.: *Biomedica*, 25, 481 (2005).
 29. Castellá G., Hernández J. J., Cabañes F. L.: *Vet. Microbiol.* 108, 291 (2005).
 30. Gandra R. F., Simao R. C. G., Matsumoto F. E., Silva B. C. M., Ruiz L. S., Silva E. G., Gambale W., Paula C. R.: *Mycopathologia* 162, 273 (2006).
 31. Theelen B., Silverstri M., Guého E., Belkum A., Boekhout T.: *FEMS Yeast Res.* 1, 79 (2001).
 32. Muyzer G., Smalla K.: *Antonie van Leeuwenhoek* 73, 127 (1998).
 33. Kolečka A., Khayhan K., Arabatzis M., Velegraki A., Kostrzewa M., Andersson A., Scheynius A., Cafarchia C., Iatta R., Montagna M. T., Youngchim S., Cabañes F. J., Hoopman P., Kraak B., Groenewald M., Boekhout T.: *Br. J. Dermatol.* 170, 332 (2014).
 34. Yamamoto M., Umeda Y., Yo A., Yamaura M., Maki-mura K.: *Br. J. Dermatol.* 41, 117 (2014).

Z. Sihelská and E. Čonková (*Department of Pharmacology and Toxicology, University of Veterinary Medicine and Pharmacy in Košice, Košice*): **Molecular-Biological Methods Used in the Analysis of *Malassezia* Yeasts**

The genus *Malassezia* is composed of lipophilic basidiomycetous yeasts which have been isolated from human and animal skin as normal flora. Under the influence of some predisposing factors, the yeasts are aetiological agents of skin diseases or septicemia. The diagnostics of *Malassezia* comprises phenotypic and genotypic identification. The phenotypic examination is not sufficiently sensitive and therefore the genotypic diagnostics is necessary for exact identification. Molecular approaches have provided insights into the identification, taxonomy, as well as the genotyping and epidemiology of *Malassezia* species. The aim of this article is to make an overview of molecular methods used in the analysis of *Malassezia*.