

# Wewnątrzgatunkowe różnicowanie szczepów *Malassezia pachydermatis* z wykorzystaniem PCR-REA

ANETA NOWAKIEWICZ, GRAŻYNA ZIÓŁKOWSKA

Zakład Mikrobiologii Weterynaryjnej Instytutu Biologicznych Podstaw Chorób Zwierząt  
Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UP, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin

Nowakiewicz A., Ziółkowska G.

## Intraspecies differentiation of *Malassezia pachydermatis* strains with PCR-REA technique

### Summary

The aim of the study was to make an attempt at showing the intraspecies heterogeneity of *Malassezia pachydermatis* strains with regards to their origin (strains isolated from healthy dogs and with otitis externa symptoms).

The study included 41 strains of *Malassezia pachydermatis* species isolated in a pure culture from dogs with clinical otitis externa symptoms ( $n = 20$ ), clinically healthy dogs ( $n = 20$ ) and a reference strain, *M. pachydermatis* (CBS7925). In order to isolate the genetic material from the fungal cells, the following four procedures were selected: mechanical, enzymatic, thermal and chemical. Considering the yield and repeatability of a method for the genomic DNA extraction, a mechanical method was applied. The genetic material research of each strain was performed according to PCR-REA technique with the amplification of three genome regions: ITS, LSU rRNA and a gene encoding beta-tubuline. The ITS and LSU rRNA regions were amplified employing the standard PCR reagents, whereas the region coding beta-tubuline with the so called touch down. The obtained amplification products were subjected to restrictive analysis by means of the following enzymes: EcoRI, NcoI, HinfI, AluI, and Eco881 (AvaI). The performed investigations made it possible to reveal the genotypic differentiation within *M. pachydermatis* species as well as some correlation between a genotypic profile and the origin of a strain (from healthy animals or with otitis externa symptoms), which may imply the existence of genetic conditioning of the *Malassezia* strains' pathogenicity.

**Keywords:** *Malassezia pachydermatis*, PCR-REA, otitis externa

Grzyby z rodzaju *Malassezia* zaliczane są do fizjologicznej flory skóry i błon śluzowych ludzi i zwierząt (1, 2). Mogą być również odpowiedzialne za różnego typu powierzchniowe infekcje skóry oraz, znacznie rzadziej, za grzybice systemowe (13), a nawet fungemie (19). Wprowadzenie technik biologii molekularnej do badań mikologicznych pozwoliło, w połączeniu z charakterystyką morfologiczną, ultrastrukturalną i fizjologiczną grzybów (10), na reklasyfikację rodzaju *Malassezia* i ustanowienie jedenastu odrębnych gatunków: *M. pachydermatis*, *M. globosa*, *M. furfur*, *M. sympodialis*, *M. slooffiae*, *M. obtusa*, *M. restricta*, *M. dermatis*, *M. nana*, *M. japonica* i *M. yamatoensis*. Badania na poziomie genomu pozwoliły, w obrębie rodzaju *Malassezia*, nie tylko na wyodrębnienie poszczególnych jednostek taksonomicznych, ale również wykazały różnice pomiędzy poszczególnymi szczepami tego samego gatunku (7, 21). Wyniki wewnątrzgatunkowego typowania zależały przede wszystkim od badanego regionu DNA, co, jak należy przypuszczać, tłumaczy rozbieżności uzyskiwanych wyników (14).

Ustalone genotypy szczepów *Malassezia* związane były na ogół z gatunkiem gospodarza (22), nie wykazywały jednak korelacji ani z miejscem izolacji, ani z patogennością szczepu (7).

Wysoki stopień heterogenności fenotypowej obserwowany w obrębie gatunku *M. pachydermatis* (16), a także niemożność wyodrębnienia, mimo szeroko prowadzonych badań w tym zakresie, „markerów patogenności”, których obecność wskazywałaby na chorobotwórczość szczepu, skłania do poszukiwania różnic na poziomie genomu.

Celem badań było podjęcie próby wykazania wewnątrzgatunkowej heterogenności szczepów *Malassezia pachydermatis* w aspekcie ich pochodzenia (szczepy izolowane od zwierząt zdrowych i z klinicznymi objawami *otitis externa*). Genotypizacja szczepów została przeprowadzona z zastosowaniem metody PCR-REA, po uprzednim wyselekcjonowaniu lub opracowaniu optymalnej, cechującej się wysoką wydajnością i powtarzalnością procedury uzyskiwania DNA z komórek grzyba.

## Materiał i metody

Badaniami objęto 41 szczepów, należących do gatunku *M. pachydermatis*. Szczepy wytypowane do badań były izolowane w czystej kulturze od psów z klinicznymi objawami zapalenia zewnętrznego kanału słuchowego (n = 20), od psów zdrowych klinicznie (n = 20) oraz referencyjny szczep *M. pachydermatis* (CBS7925).

**Izolacja genomowego DNA.** Zawiesinę grzyba o gęstości  $2 \times 10^9$  cfu ml<sup>-1</sup> (0,5 ml) inokulowano na stałe podłoże Sabourauda i inkubowano w temperaturze 37°C przez trzy dni. Uzyskane hodowle zbierano i zawieszano w jałowym płynie fizjologicznym, następnie wirowano trzykrotnie po 10 min. ( $8 \times 1000$  g). Supernatant usuwano, a komórki poddawano dalszym procesom izolacji DNA z wykorzystaniem następujących metod: metody chemicznej (11), termicznej (14), mechanicznej (15, 16) i enzymatycznej (23), w której jako czynnika lizującego użyto litykazy (Yeast Lytic Enzyme, Arthro-bacter Species ImmunO), w stężeniu 8 U/500 µl buforu lizującego. Proces ekstrakcji, precypitacji i suszenia materiału przeprowadzono według powszechnie stosowanej procedury izolacji DNA (17). Próbkę uzyskaną po zastosowaniu poszczególnych metod oceniono wstępnie na obecność DNA (elektroforeza w 1% żelu agarozowym), a następnie przechowywano w temperaturze -20°C do momentu wykorzystania.

**Amplifikacja wytypowanych regionów genomu.** Amplifikacji poddano trzy regiony genomu *Malassezia spp.*: ITS, LSU rRNA i gen kodujący β-tubulinę (11, 16).

Reakcję przeprowadzano w 50 µl mieszaniny, o składzie: matryca DNA, startery (2 µl/50 µl mieszaniny), mieszanina 2 mM deoksynukleotydów (5 µl/50 µl mieszaniny), termostabilna polimeraza DNA delta2, bufor reakcyjny i jony magnezu (DNA Gdańsk). Standaryzowano ilość matrycy DNA, stężenie termostabilnej polimerazy i jonów magnezu. Do reakcji stosowano wstępnie próbkę materiału (matrycy DNA) objętości 0,5, 1 lub 2 µl oraz próbkę rozcieńczoną w buforze TE w stosunku 1 : 10, również w ilości 0,5, 1 lub 2 µl, stężenie jonów magnezu w ilości 2, 3 lub 4 mM (50 mM MgCl<sub>2</sub>)/50 µl mieszaniny reakcyjnej, optymalne stężenie termostabilnej polimerazy określono w zakresie 1-0,6 U (2 U/µl)/50 µl mieszaniny reakcyjnej.

Reakcję PCR-REA przeprowadzono w warunkach uprzednio wystandaryzowanych (15).

Analizę restrykcyjną przeprowadzono z zastosowaniem enzymów EcoRI, NcoI, HinfI, AluI, Eco881(AvaI). Proces przeprowadzono zgodnie z instrukcją producenta. Produkty trawienia poddano elektroforezie w 2% żelu agarozowym. Analizę wyników i dokumentację żeli przeprowadzono z zastosowaniem Gel Doc 2000 (Bio-Rad).

## Wyniki i omówienie

Stosowane dotychczas metody fenotypowej klasyfikacji drobnoustrojów, obok trudności przy identyfikacji poszczególnych gatunków, wymagają wysokiego nakładu pracy, są czasochłonne i kosztowne. W chwili obecnej istotną rolę w identyfikacji oraz różnicowaniu grzybów z rodzaju *Malassezia*, podobnie jak innych drobnoustrojów, spełniają różnego typu analizy DNA (6).

Analizę genomu grzybów z rodzaju *Malassezia* w celach ich klasyfikacji gatunkowej zapoczątkowali Simmons i Gueho (20), identyfikując na podstawie różnic w zawartości G+C (%mol) oraz stopnia reasocjacji DNA/DNA w różnych izolatach, nowy gatunek *M. sympodialis*, a w latach następnych *M. globosa*, *M. restricta* i *M. obtusa* (9). Wyniki te zostały potwierdzone przy zastosowaniu takich metod, jak kariotypizacja (18), RFLP (24) czy sekwencjonowanie określonych regionów (21).

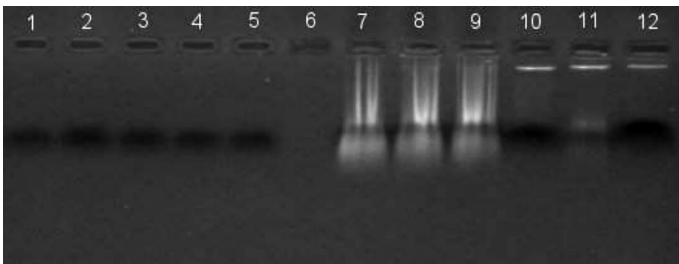
Bez względu jednak na rodzaj użytej techniki molekularnej, jednym z najważniejszych warunków jej powodzenia jest dobór odpowiedniej procedury izolacji DNA z komórki. W diagnostyce mikologicznej stanowi to bardzo istotny problem, ze względu na grubą, często trudną do dezintegracji (zarówno mechanicznie, jak i enzymatycznie), wielowarstwową, strukturę ściany komórkowej, a także obecność dodatkowych warstw zewnętrznych (np. otoczka *Cryptococcus neoformans*). Ponadto komórki niektórych grzybów w trakcie procesu ekstrakcji uwalniają pewne związki, takie jak np. polisacharydy, związki polifenolowe, terpenoidowe, antrachinony, jony jodu lub wapnia, które poprzez wiązanie kwasu nukleinowego mogą spowodować zablokowanie jego funkcji biologicznych (4). Podobne działanie mogą wykazywać również niektóre detergenty, np. siarczan dodecylu sodu, wykorzystywane w procesie izolacji DNA (4).

W badaniach własnych doboru optymalnej procedury izolacji DNA dokonano spośród czterech metod: chemicznej, termicznej, mechanicznej i enzymatycznej.

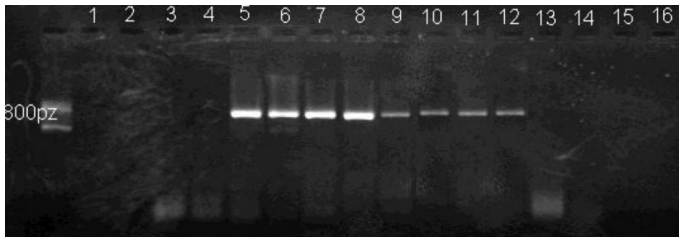
Ocenę poszczególnych metod przeprowadzono na wzorcowym szczepie *M. pachydermatis* (CBS 7925) oraz trzech wybranych losowo izolatach tego samego gatunku pochodzących z kolekcji Zakładu Mikrobiologii Weterynaryjnej. Wstępna ocena uzyskanego materiału (elektroforeza próbek w 1% żelu agarozowym) wykazała obecność materiału genetycznego w próbkach uzyskanych metodą mechaniczną i enzymatyczną (ryc. 1), natomiast próbki uzyskane dwoma pozostawionymi metodami (chemiczną i termiczną) nie wykazywały obecności materiału genetycznego.

**Tab. 1.** Wzorzec identyfikacji gatunkowej dla rodzaju *Malassezia* (metoda PCR-REA)

Nr szczepu	Gatunek	Kod sekwencji				
		ITS	EcoRI	NcoI	Ava	Bt
7925CBS	<i>M. pachydermatis</i>	A 800 pz	C 350 i 450 pz	F 350 i 450 pz	K 600 pz	M -
7019CBS	<i>M. furfur</i>	A 800 pz	C 350 i 450 pz	F 350 i 450 pz	I 400 pz	L 550 pz
7222CBS	<i>M. sympodialis</i>	B 700 pz	E 400 pz	H 350 pz	I 400 pz	L 550 pz
7959CBS	<i>M. slooffiae</i>	A 800 pz	C' 450 i 550 pz	G 800 pz	I 400 pz	L 550 pz
7966CBS	<i>M. globosa</i>	A 800 pz	D 350 pz	G 800 pz	K 600 pz	M -
7877CBS	<i>M. restricta</i>	A 800 pz	D 350 pz	G 800 pz	K 600 pz	L 550 pz
7876CBS	<i>M. obtusa</i>	A 800 pz	C 350 i 450 pz	G 800 pz	K 600 pz	M -



Ryc. 1. Elektroforeza próbek materiału genetycznego uzyskanych przy pomocy metod: chemicznej (1-3), termicznej (4-6), enzymatycznej (7-9) i mechanicznej (10-12)



Ryc. 2. Amplifikacja matrycy DNA uzyskanych przy pomocy metod: termicznej (1-4), mechanicznej (5-8), enzymatycznej (9-12), chemicznej (13-14)

stałymi metodami nie wykazywały obecności DNA w żadnym z wariantów przeprowadzonej inkubacji (3, 12 i 24 godziny w metodzie chemicznej oraz 5, 30 i 60 minut w metodzie termicznej).

Celem weryfikacji wyników uzyskanych w ocenie wstępnej, próbki uzyskane przy pomocy przedstawionych metod poddano równolegle procesowi amplifikacji. W pierwszym etapie wystandaryzowano mieszaninę reakcyjną oraz warunki reakcji PCR dla poszczególnych amplifikowanych regionów genomu. Brak skuteczności metody chemicznej i termicznej został potwierdzony również wynikami reakcji amplifikacji; w żadnym z testowanych wariantów nie uzyskano amplikonu (ryc. 2).

W przypadku metody mechanicznej powtarzalność wyników uzyskano przy zastosowaniu matrycy rozcieńczonej w stosunku 1 : 10 w TE i użytej w ilości 1 lub 2  $\mu$ l na 50  $\mu$ l mieszaniny reakcyjnej; wprowadzenie do reakcji nie rozcieńczonej matrycy hamowało powstawanie produktu. Optymalny skład mieszaniny reakcyjnej ustalono jako: 5  $\mu$ l buforu reakcyjnego, 5  $\mu$ l deoksynukleotydów (2 mM), 2  $\mu$ l  $MgCl_2$  (50 mM), 2  $\mu$ l każdego ze starterów oraz 0,3  $\mu$ l (0,6 U/50  $\mu$ l) termostabilnej polimerazy.

Stężenie matrycy DNA uzyskanego metodą enzymatycznej lizy komórki ustalono na 2  $\mu$ l (matryca nie wymagała rozcieńczenia). Natomiast w mieszaninie reakcyjnej dwukrotnie podwyższono stężenie jonów  $MgCl_2$ , dodając 4  $\mu$ l na 50  $\mu$ l końcowej objętości; stężenie pozostałych składników mieszaniny było takie, jak w reakcji z matrycą uzyskaną przez mechaniczną dezintegrację komórki.

Celem optymalizacji warunków reakcji PCR wystandaryzowano temperaturę przyłączania starterów oraz ilość powtarzanych cykli reakcji (15). Dla starterów Bt zastosowano tzw. touch dawn, ze względu na powstawanie niespecyficznych produktów amplifikacji w warunkach standardowych (11, 15). Wyniki uzyskane dla

poszczególnych metod izolacji przedstawia ryc. 2. W pierwszej z metod wykorzystano bufor lizujący, którego głównym składnikiem był mocznik charakteryzujący się silnymi właściwościami denaturującymi w stosunku do białek (destrukcja ściany komórkowej grzyba). Mimo pozytywnych wyników, uzyskiwanych przez innych autorów, (11) w badaniach własnych nie otrzymano wizualizacji DNA bezpośrednio po izolacji, jak i po amplifikacji próbek przy udziale starterów ITS i 26S. W metodzie termicznej komórki poddano działaniu wysokiej temperatury, a następnie szybko schłodzono, co powinno wywołać zniszczenie struktur powierzchniowych i uwolnienie materiału genetycznego (14). Zastosowanie tej metody w badaniach własnych również nie przyniosło pozytywnego rezultatu; brak amplifikacji próbki w przeprowadzonych badaniach wykluczył ją jako przydatną w uzyskiwaniu genomowego DNA. Być może, połączenie metody termicznej z chemiczną mogłoby przynieść zadowalające rezultaty, jednakże metody stosowane oddzielnie, prawdopodobnie ze względu na strukturę ściany komórki *Malassezia* (3) nie dały pozytywnego wyniku.

Metoda mechaniczna polegała na mechanicznej dezintegracji komórek grzyba w homogenizerze orbitalnym; wszystkie etapy izolacji przeprowadzano w temperaturze około 4°C, co zapobiegało ewentualnej aktywacji enzymów uszkadzających DNA (DNA-azy). Natomiast w metodzie enzymatycznej wykorzystano właściwości lityczne enzymu  $\beta$ -glukanazy, wobec jednego z głównych składników ściany komórkowej. W wyniku hydrolyzy enzymatycznej powstają sferoplasty, pozbawione bariery osmotycznej, jaką stanowi ściana komórkowa, co w konsekwencji ułatwia uwolnienie DNA z komórki (23).

Ekstrakcja DNA przy udziale lizy enzymatycznej zabierała nieco więcej czasu (3-godzinna inkubacja materiału w temperaturze 37°C), ponadto podczas etapu inkubacji mogło dochodzić do aktywacji DNAaz, uwalnianych w trakcie lizy komórki, co znacznie obniżało wydajność metody (17).

Jako kryteria doboru metody brano pod uwagę wydajność, jakość materiału genetycznego, powtarzalność uzyskiwanych wyników oraz czas potrzebny na izolację DNA. Biorąc pod uwagę fakt, iż metoda mechaniczna cechowała się najwyższą wydajnością (z jednej 50  $\mu$ l próbki można wykonać ponad 200 reakcji amplifikacji), powtarzalnością (wszystkie badane próbki dawały spodziewany produkt reakcji przy trzykrotnym powtarzaniu procedury izolacji w różnym czasie), zastosowano ją w badaniach własnych.

W drugim etapie pracy do badania materiału genetycznego pochodzącego z terenowych szczepów *M. pachydermatis* zastosowano test PCR-REA. Do zalet tej techniki należy zaliczyć wysoką powtarzalność uzyskiwanych wyników, związaną ze standaryzacją specyfiki działania enzymów restrykcyjnych oraz skuteczność w klasyfikacji grzybów na poziomie gatunku (8, 11). Gupta i wsp. (11) stosując tę metodę, wyodrębnili w ramach gatunków *M. sympodialis* i *M. furfur* niezależne genotypy.

Tab. 2. Cechy genotypowe szczepów *M. pachydermatis* izolowanych od zwierząt zdrowych i z objawami *otitis externa*

Nr szczepu	ITS	ITS					26S	26S					Bt
		EcoRI	NcoI	Ava	Hinf	Alu		Ava	EcoRI	NcoI	Hinf	Alu	
14A*	A	C	F	T	N	R	K	K	K	Z	W	U	M
16A	A	C	F	T	N	R	K	K	K	Z	W	U	M
23A	A	C	F	T	N	R	K	K	K	Z	W	U	L
26*	A	C''	F	T	N	R	K	K	K	Z	W	U	L
26A	A	C	F	T	N	R	K	K	K	Z	W	U	M
27	A	C	F	T	N	R	K	K	K	Z	W	U	L
28*	A	C''	F	T	N	R	K	K	K	Z	W	U	L
32*	A	C''	F	T	N	R	K	K	K	Z	W	U	M
36*	A	C''	F	T	N	R	K	K	K	Z	W	U	L
37*	A	C	F	T	N	R	K	K	K	Z	W	U	L
38*	A	C''	F	T	N	R	K	K	K	Z	W	U	L
40	A	C	F	T	N	R	K	K	K	Z	W	U	M
43*	A	C	F	T	N	R	K	K	K	Z	W	U	L
44	A	C	F	T	N	R	K	K	K	Z	W	U	M
46*	A	C	F	T	N	R	K	K	K	Z	W	U	L
47A*	A	C''	F	T	N	R	K	K	K	Z	W	U	L
55*	A	C	F	T	N	R	K	K	K	Z	W	U	M
59	A	C	F	T	N	R	K	K	K	Z	W	U	M
63	A	C''	F	T	N	R	K	K	K	Z	W	U	L
64	A	C	F	T	N	R	K	K	K	Z	W	U	M
65	A	C''	F	T	N	R	K	K	K	Z	W	U	M
66	A	C''	F	T	N	R	K	K	K	Z	W	U	L
73	A	C''	F	T	N	R	K	K	K	Z	W	U	M
74*	A	C''	F	T	N	R	K	K	K	Z	W	U	L
75	A	C	F	T	N	R	K	K	K	Z	W	U	M
76	A	C	F	T	N	R	K	K	K	Z	W	U	M
77*	A	C''	F	T	N	R	K	K	K	Z	W	U	M
78*	A	C''	F	T	N	R	K	K	K	Z	W	U	L
81*	A	C	F	T	N	R	K	K	K	Z	W	U	M
86	A	C''	F	T	N	R	K	K	K	Z	W	U	L
89*	A	C''	F	T	N	R	K	K	K	Z	W	U	L
90	A	C	F	T	N	R	K	K	K	Z	W	U	L
94	A	C	F	T	N	R	K	K	K	Z	W	U	M
103*	A	C''	F	T	N	R	K	K	K	Z	W	U	M
104*	A	C''	F	T	N	R	K	K	K	Z	W	U	L
124	A	C	F	T	N	R	K	K	K	Z	W	U	L
133*	A	C''	F	T	N	R	K	K	K	Z	W	U	L
138	A	C	F	T	N	R	K	K	K	Z	W	U	M
141	A	C	F	T	N	R	K	K	K	Z	W	U	M
147*	A	C''	F	T	N	R	K	K	K	Z	W	U	L
7925**	A	C	F	T	N	R	K	K	K	Z	W	U	M

Objaśnienia: \* – szczepy izolowane od chorych zwierząt; \*\* – 7925 referencyjny szczep *M. pachydermatis*. Oznaczenia wielkości produktów amplifikacji i analizy restrykcyjnej regionów ITS, 26S LSU rRNA oraz regionu kodującego  $\beta$ -tubulinę: A – 800 pz, C – 450, 350 pz, C'' – 800, 450, 350 pz, F – 450, 350 pz, T – 800 pz, N – 500, 300 – pz, R – 700 pz, K – 600 pz, Z – 450, 350 pz, W – 200 pz, U – 400 pz, L – 550 pz, M – brak amplikonu

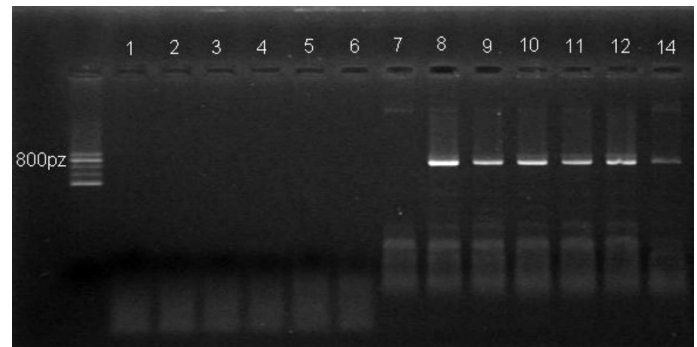
Bardzo dużą przydatność metody PCR-REA wykazano również w badaniach własnych do klasyfikacji gatunkowej i weryfikacji klasycznej identyfikacji mikologicznej lipidozależnych izolatów *Malassezia spp.* (25). Celem uzyskania wyższej wartości dyskryminującej metody PCR-REA w obecnych badaniach, jako enzymy restrykcyjne zastosowano, obok EcoRI, NcoI i Eco881, enzymy dodatkowe: HinfI i AluI. Otrzymane wyniki ilustruje tab. 2. Jak wykazano, badane szczepy charakteryzuje identyczny profil w zakresie produktów amplifikacji regionów ITS i LSU rRNA oraz produktów analizy restrykcyjnej dla enzymów NcoI, Eco881, Hinf i Alu dla regionu ITS oraz Eco881, EcoRI, NcoI, Hinf i Alu dla regionu 26S. Genotypowe zróżnicowanie odnotowano dla produktów amplifikacji regionu ITS, poddanych restrykcji enzymem EcoRI (tab. 2, ryc. 4 i 5).

Spośród terenowych szczepów *M. pachydermatis* 21 dawało produkt wielkości 450 i 350 pz, zgodnie z wzorcem szczepu referencyjnego, podczas gdy 19 szczepów charakteryzował produkt wielkości 800, 450 i 350 pz (tab. 2). Na uwagę zasługuje fakt, że wśród tych szczepów, 14 pochodziło od zwierząt z objawami *otitis externa*.

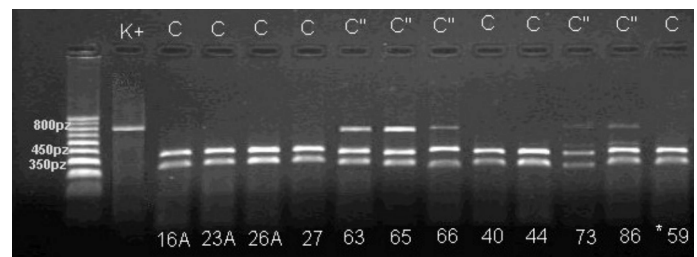
Drugim regionem w genomie *M. pachydermatis*, charakteryzującym się zmiennością, był gen kodujący  $\beta$ -tubulinę. W tym przypadku 18 szczepów na 40 badanych, wykazało zgodność profilu ze szczepem referencyjnym (brak produktu amplifikacji), pozostałe izolaty amplifikowały powyższy region, dając produkt wielkości 550 pz (tab. 2, ryc. 6 i 7). Ponadto część szczepów wykazywała niejednoznaczny obraz wizualizacji produktów reakcji, cechujący się licznymi, słabo wyrażonymi prążkami umiejscowionymi od wysokości 600 do 100 pz (ryc. 6).

Analiza uzyskanych wyników pozwala przypuszczać, że badane szczepy *M. pachydermatis* można sklasyfikować w następujących grupach: typ I charakteryzuje się brakiem amplifikacji genu  $\beta$ -tubuliny oraz produktem restrykcji EcoRI: 450 i 350 pz, typ II wykazuje amplifikację regionu  $\beta$ -tubuliny i daje produkt restrykcji EcoRI 450 i 350 pz, typ III nie wykazuje amplifikacji genu  $\beta$ -tubuliny, a produkt restrykcji EcoRI typu C'' wynosi 800, 450 i 350 pz, typ IV charakteryzuje amplifikacja regionu  $\beta$ -tubuliny (550 pz), a produkt restrykcji EcoRI charakteryzuje się 800, 450 i 350 pz. Uwzględniając równocześnie genotyp szczepu oraz jego pochodzenie (od zwierząt zdrowych lub z objawami *otitis externa*) należy stwierdzić, że genotyp IV grupuje na ogół szczepy patogene, genotyp I szczepy komensaliczne (w większości), a genotyp II i III ma zróżnicowany rozkład szczepów *M. pachydermatis* (tab. 3).

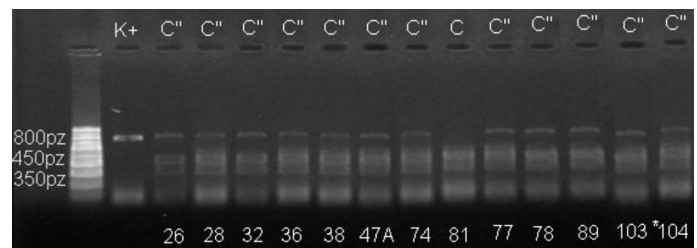
Uzyskane wyniki świadczą, że pomimo stosunkowo wysokiej wiarygodności metod klasycznych, techniki biologii molekularnej znajdują zastosowanie jako metody rozstrzygające, głównie w dochodzeniu epidemiologicznym, ponadto znacznie skracają czas niezbędny do identyfikacji poszczególnych izolatów. Wobec zróżnicowanego i labilnego profilu biochemicznego szczepów *M. pachydermatis* (lipidozależne szczepy) wprowadzenie wysoce precyzyjnych i specyficznych metod biologii molekularnej do diagnostyki mikologicznej wydaje się konieczne (8).



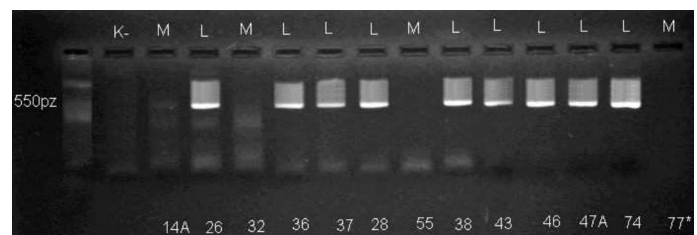
Ryc. 3. Standaryzacja temperatury przyłączania (annelingu) starterów ITS; ścieżki oznaczone numerami od 1 do 14 obrazują reakcję przy spadającej temperaturze przyłączania od 45 do 55,4°C



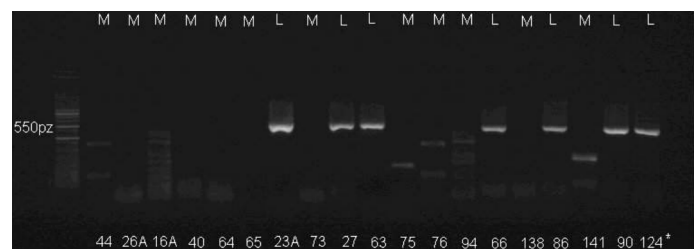
Ryc. 4. Analiza restrykcyjna fragmentu ITS enzymem EcoRI szczepów *M. pachydermatis* pochodzących od chorych zwierząt; C – 450 i 350 pz, C'' – 800, 450 i 350 pz



Ryc. 5. Analiza restrykcyjna fragmentu ITS enzymem EcoRI szczepów *M. pachydermatis* pochodzących od chorych zwierząt; C – 450 i 350 pz, C'' – 800, 450 i 350 pz



Ryc. 6. Amplifikacja regionu Bt szczepów *M. pachydermatis* izolowanych od chorych zwierząt; L – 550 pz, M – brak amplifikacji



Ryc. 7. Amplifikacja regionu Bt szczepów *M. pachydermatis* izolowanych od zdrowych zwierząt; L – 550 pz, M – brak amplifikacji

Tab. 3. Genotypy badanych szczepów *M. pachydermatis*

Genotyp	Szczepy należące do zwierząt	
	zdrowych	chorych
Typ I (C, M)	16A*, 40, 44, 59, 64, 75, 76, 94, 138, 141	14a, 55, 81
	** CBS7925	
Typ II (C, L)	23A, 27, 90, 124	37, 43, 46
Typ III (C <sup>n</sup> , M)	26A, 65, 73	32, 77, 103
Typ IV (C <sup>n</sup> , L)	63, 66, 86	26, 28, 36, 38, 47A, 74, 78, 89, 104, 133, 147

Objaśnienia: \* – nr szczepu; \*\* – szczep referencyjny

Równoczesne zastosowanie aż trzech regionów do genetycznej identyfikacji drożdżaków pozwoliło nie tylko na zróżnicowanie międzygatunkowe, co potwierdzają wyniki uzyskane w badaniach wcześniejszych (11), ale też dzięki wprowadzeniu dwóch dodatkowych enzymów (5) zwiększyło szansę na wykazanie różnic w obrębie heterogennego fenotypowo gatunku *M. pachydermatis*.

Badania molekularne gatunku *M. pachydermatis* potwierdziły do pewnego stopnia fenotypową heterogenność szczepów, charakterystyczną również dla innych gatunków *Malassezia* (11); wykazano zmienność dwóch cech w profilu genotypowym dotyczącą produktu trawienia enzymem EcoRI amplikonu ITS oraz zmienną amplifikację regionu kodującego  $\beta$ -tubulinę. Zaobserwowana prawidłowość rozkładu tych dwu cech w obrębie grup szczepów pochodzących od zdrowych i chorych psów (typ I i IV) pozwala przypuszczać, że może istnieć, podobnie jak w przypadku bakterii (12) genetyczne uwarunkowania patogenności szczepów *M. pachydermatis*. Prowadzone w tym zakresie badania nie przyniosły, jak dotąd, zadowalających wyników. Guillot (7), sekwencjonując fragment genu kodującego LSU rRNA, uzyskał jedynie podział tego gatunku na 7 typów, jednakże przynależność do nich z reguły wiązała się z gatunkiem gospodarza, od którego pochodził izolat, a nie z patogennością szczepu. Podobnie przy sekwencjonowaniu regionu IGS (intergenic spacer I region) nie zaobserwowano korelacji z wirulencją szczepu (22), chociaż w przypadku tego samego regionu u gatunku *M. globosa* wykazano różnice pomiędzy szczepami pochodzącymi ze zdrowej skóry a izolatami z przypadków chorobowych (21).

Wydaje się, że znalezienie genetycznych markerów patogenności wymaga bardzo rozległych i wnikliwych badań, dotyczących prawdopodobnie również innych regionów genomu i obejmujących większą pulę szczepów.

### Wnioski

1. Opracowana metodyka własna izolacji DNA z komórek *Malassezia spp.*, charakteryzująca się wysoką wydajnością i powtarzalnością, a przy tym prosta i szybka w wykonaniu, może znaleźć zastosowanie w badaniu materiału genetycznego grzybów.

2. Technika PCR-REA *multilocus*, ze względu na równoczesną analizę restrykcyjną trzech regionów genomowego DNA, umożliwia nie tylko wysoce specyficzną klasyfikację szczepów *Malassezia* na poziomie gatunku, ale również ich genotypowanie.

### Piśmiennictwo

1. Ashbee H. R., Evans E. G. V.: Immunology of diseases associated with *Malassezia* species. Clin. Microbiol. Rev. 2002, 15, 21-57.
2. Bond R., Howell S. A., Haywood P. J., Lloyd D. H.: Isolation of *Malassezia sympodialis* and *M. globosa* from healthy pet cats. Vet. Rec. 1997, 141, 200-201.
3. David M., Gabriel M., Kopecka M.: Unusual ultrastructural characteristic of yeast *Malassezia pachydermatis*. Scripta Medicina 2003, 76, 173-186.
4. Ekman S.: PCR optimization and troubleshooting with special reference to the amplification of ribosomal DNA in lichenized fungi. Lichenologist 1999, 31, 517-531.
5. Gaitanis G., Velegriaki A., Frangoulis E., Mitroussia A., Tsigonia A., Tzimogianni A., Katsambas A., Legakis N. J.: Identification of *Malassezia* species from patient skin scales by PCR-RFLP. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Inf. Dis. 2002, 8, 162-173.
6. Gil-Lamagniere C., Roilidies E., Hacher J., Muller F. M. C.: Molecular typing for fungi – a critical review of the possibilities and limitations of currently and future methods. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Inf. Dis. 2003, 9, 172-185.
7. Guillot J.: Epidemiological analysis of *Malassezia pachydermatis* isolates by partial sequencing of the large subunit ribosomal RNA. Res. Vet. Sci. 1997, 62, 22-25.
8. Guillot J., Deville M., Berthelemy M., Provost F., Gueho E.: A single PCR-restriction endonuclease analysis for rapid identification of *Malassezia* species. Lett. Appl. Microbiol. 2000, 31, 400-403.
9. Guillot J., Gueho E.: The diversity of *Malassezia* yeasts confirmed by rRNA sequence and nuclear DNA comparisons. Antonie van Leeuwenhoek. 1995, 67, 297-314.
10. Guillot J., Gueho E., Lesourd M., Midgley G., Chevrier G., Dupont B.: Identification of *Malassezia* species: A practical approach. J. Mycol. Med. 1996, 6, 133-110.
11. Gupta A. K., Kohli Y., Summerbell R. C.: Molecular differentiation of seven *Malassezia* species. J. Clin. Microbiol. 2000, 38, 1869-1875.
12. Gursharan S., Walker M. J., Yan H., Timnis K. N., Guzman C. A.: Temperature dependent expression of an acid phosphatase by *Bordetella bronchiseptica*: role in intracellular survival. Microb. Pathogenesis 1997, 22, 257-164.
13. Inamader A. C., Palit A.: The genus *Malassezia* and human disease. Indian J. Dermatol. 2003, 69, 265-270.
14. Makimura K., Tamura Y., Kudo M., Uchida K., Saito H., Yamaguchi H.: Species identification and strain typing of *Malassezia* species stock strains and clinical isolates based on the DNA sequences of nuclear ribosomal internal transcribed spacer 1 regions. J. Med. Microbiol. 2000, 49, 29-35.
15. Nowakiewicz A.: Współczesne metody różnicowania diagnostycznego szczepów z rodzaju *Malassezia* izolowanych z przypadków klinicznych. Rozprawa dokt. Wydz. Medycyny Weterynaryjnej, AR Lublin 2005.
16. Nowakiewicz A., Ziolkowska G.: Fenotypowy profil patogenności szczepów *Malassezia pachydermatis*. Medycyna Wet. 2007, 63, 721-727.
17. Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T.: Molecular Cloning (A laboratory manual). Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York 1989.
18. Senczek D., Siesenop U., Bohm K. H.: Characterization of *Malassezia* species by means of phenotypic characteristics and detection of electrophoretic karyotypes by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). Mycoses 1999, 42, 409-414.
19. Shattuck K. E., Cochran C. K., Zabrawsky R. J., Pasarell L., Davis J. C., Malloy M. H.: Colonization and infection associated with *Malassezia* and *Candida* species in a neonatal unit. J. Hosp. Infect. 1996, 34, 123-129.
20. Simmons R. B., Gueho E.: A new species of *Malassezia*. Mycol. Res. 1990, 94, 1146-1149.
21. Sugita T., Takashima M., Shinoda T., Suto H., Unno T., Tsuboi R., Ogawa H., Nishikawa A.: New yeast species, *Malassezia dermatis* isolated from patients with atopic dermatitis. J. Clin. Microbiol. 2002, 40, 1363-1367.
22. Sugita T., Takeo K., Hama K., Virtudazo E., Takashima M., Nishikawa A., Kucsera J., Dorogi J., Komori S., Nakagaki K., Vollekova A., Slavikova E., Farka F.: DNA sequence diversity of intergenic spacer I region in the non-lipid-dependent species *Malassezia pachydermatis* isolated from animals. Med. Mycol. 2005, 43, 21-26.
23. Van Burik J., Myerson D., Schreckhise R. W., Bowden R. A.: Panfungal PCR assay for detection of fungal infection in human blood specimens. J. Clin. Microbiol. 1998, 36, 1169-1175.
24. Velegriaki A., Kambouris M., Kostourou A., Chalevelakis G., Legakis N. J.: Rapid extraction of fungal DNA from clinical samples for PCR amplification. Med. Mycol. 1999, 37, 69-73.
25. Ziolkowska G., Nowakiewicz A.: Izolacja lipidozależnych szczepów *Malassezia* od psów i kotów. Medycyna Wet. 2006, 62, 913-917.

Adres autora: dr hab. Grażyna Ziolkowska prof. nadzw. UP, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin; e-mail: grazyna.ziolkowska@ar.lublin.pl