

Różnicowanie izolatów *Malassezia pachydermatis* metodą RAPD*

RAPD differentiation of yeast like fungi *Malassezia pachydermatis*

Michał Leśniak i Bożena Dworecka-Kaszak

Pracownia Mikologii, Katedra Nauk Przedklinicznych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej SGGW, ul. Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa

Adres do korespondencji: Michał Leśniak, Katedra Nauk Przedklinicznych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, SGGW, ul. Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa; E-mail: michal220@wp.pl.

ABSTRACT. The aim of the work was analyzing of genomic DNA of *Malassezia pachydermatis* isolates from clinical cases *otitis externa* from dogs using RAPD method with arbitrary primers Eric1R, Eric2, BG2 and FM1. **Materials and methods.** 47 strains of *M. pachydermatis* isolates from clinical cases *otitis externa* from dogs were tested. Isolation of genomic DNA was provided according with MasterPure™ Yeast DNA Purification Kit EPICENTRE procedure. The quality of isolated genomic DNA was determined electrophoretically. For differentiation the following primers were used: Eric1R, Eric2, BG2 and FM1. Primers Eric 1R and Eric 2 were used together in one reaction or amplified separately. Obtained products were analyzed electrophoretically in 1.5% agarose gel. For determination of phylogenetic tree Quantity one VersaDoc (BioRad) and Statgraphics plus 4.1 programs were used. **Results.** High degree of heterogeneity of DNA among investigated isolates of *M. pachydermatis* was shown using FM1 primer. Dendrograms were prepared by calculation euclid's distance of different parameters (size and count of RAPD products) by nearest neighbor method. Basing on phylogenetic tree four main types (phylogenetic groups) of *M. pachydermatis* isolates were shown. The other five groups non-count was shown also.

Key words: dermatitis, *M. pachydermatis*, *otitis externa*, RAPD.

Wstęp

Grzyby z rodzaju *Malassezia* mają istotne znaczenie medyczne. Mogą one stanowić jeden ze składników ontocenozy normalnej skóry u ludzi i zwierząt, szczególnie w okolicach gruczołów łojowych, ale również jako typowi oportuniści — w pewnych warunkach (np. przy osłabieniu odporności organizmu) mogą być czynnikiem etiologicznym dermatoz lub nawet groźnych grzybic systemowych [1].

Już w 1846 r. Eichstedt uznał łupież pstry (*pityriasis versicolor*), którego czynnikiem etiologicznym są grzyby z rodzaju *Malassezia*, za chorobę za-

każną, ale rodzaj *Malassezia* utworzony został dopiero pół wieku później przez Baillon [2]. W obrębie rodzaju *Malassezia* aktualnie wyróżnia się dziewięć gatunków: *M. furfur*, *M. sympodialis*, *M. globosa*, *M. obtusa*, *M. restricta*, *M. slooffiae* i jeden gatunek lipidoniezależny *M. pachydermatis*, oraz nowo opisane *M. dermatitis*, *M. japonica*, które nie rosną na klasycznych podłożach mikologicznych [2–4]. *Malassezia pachydermatis* to gatunek głównie zoofilny, izolowany ze skóry zdrowych ssaków i ptaków, w tym także egzotycznych, ale również w bardzo wysokim odsetku (pow. 70%) izolowany z klinicznych przypadków *otitis externa* i *dermatitis*

*Badania realizowano w ramach Grantu KBN Nr 2 51102340022

od zwierząt domowych [5]. Najczęściej zakażenia *Malassezia* współtowarzyszą zakażeniom bakteryjnym (np. *Staphylococcus* sp.) lub pasożytniczym (np. *Demodex canis*), ale równie często izolowane są jako jedyny czynnik etiologiczny. Zwrócono uwagę, że *M. pachydermatis*, podobnie jak *M. furfur*, mogą być powodem grzybicy uogólnionej i zakażeń szpitalnych u ludzi z immunosupresją. Źródłem zakażenia są zwierzęta domowe personelu medycznego. Grzyby te izolowane są z przypadków klinicznych zmian skórnych praktycznie w każdej strefie klimatycznej na całym świecie. Olbrzymia jest też różnorodność gatunków żywicieli, u których grzyby te mogą bytować. Tym bardziej zastanawia fakt, że zróżnicowane gatunkowo zwierzęta zasiedlane są przez ten sam homogeny gatunek grzybów. Wielu badaczy zwraca uwagę na bardzo duże zróżnicowanie fenotypowe szczepów w obrębie gatunku. Jak do tej pory nie powiodły się próby zestawienia różnic fenotypowych z odpowiednimi cechami biochemicznymi, które mogłyby być podstawą wydzielenia nowego gatunku. Badania genetyczne potwierdziły wyjątkowy status lipidoniezależnych drożdżaków *Malassezia*. Na podstawie badań rDNA stwierdzono, że u gatunków lipidoniezależnych szczepów izolowanych od różnych gatunków zwierząt zawartość G+C wynosi 53,5–55,1 mol%, a odsetek reasocjacji DNA-DNA przekracza 85%. Należą one zatem do jednego gatunku. Dalsze badania w obrębie gatunku *M. pachydermatis* pozwoliły na wyodrębnienie siedmiu różnych typów sekwencji (technika partial LSU rRNA) Ia-Ig, nazywanych sekwencjami (ang. sequevars) [6]. Niektóre z tych wariantów wydają się być specyficzne względem żywiciela. Analizując całe DNA komórkowe techniką RFLP (restriction fragment length polymorphism) oraz DNA chromosomalne za pomocą RAPD (random amplified polymorphic DNA) również wykazano obecność subpopulacji w ramach tego gatunku.

Wyodrębnienie ośmiu opisanych powyżej gatunków możliwe było dzięki technice elektroforezy pulsacyjnej w zmiennym polu elektrycznym (PFGE), którą analizowano chromosomalny DNA grzybów i wykazano, że kariotypy różnych gatunków *Malassezia* różnią się znacznie między sobą i są jednorodne dla gatunku [1, 7]. Analiza genetycznych wariacji w obrębie gatunku przy użyciu RAPD wykazała istotne wewnątrzgatunkowe różnice chromosomalnego DNA. Metoda PFGE okazała się przydatna do różnicowania w obrębie rodzaju *Malassezia*, a metoda RAPD wydaje się być uży-

teczna w ocenie heterogenności w obrębie gatunku [8-15].

Cel pracy

Celem podjętych badań była analiza genomowego DNA izolatów *M. pachydermatis* pochodzących z klinicznych przypadków *otitis externa* u psów za pomocą metody RAPD przy użyciu arbitralnych starterów Eric1R, Eric2, BG2 i FM1

Materiały i metody

Szczepy

Badaniem objęto 47 szczepów *M. pachydermatis* wyizolowanych z materiału dostarczanego do laboratorium usługowego Pracowni Mikologii (Wydz. Med. Wet. SGGW). Wszystkie wymazy pochodziły z przypadków *otitis externa* lub *dermatitis* od psów. Hodowlę prowadzono na podłożu Sabouraud (SGA) bez dodatków kwasów tłuszczowych (wyeliminowano tym samym możliwość wzrostu gatunków lipidozależnych) w 30°C przez 4–7 dni.

Izolacja DNA

Izolację genomowego DNA wykonano wg. instrukcji producenta MasterPure™ Yeast DNA Purification Kit firmy EPICENTRE.

Jakość wyizolowanego DNA oceniano elektroforetycznie w 0,8% żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyny w obecności standardu wielkości λ Eco130J (Fermentas).

Analiza RAPD

Do losowej amplifikacji — jako matrycy — używano genomowego DNA (30-70 ng) wyizolowanego z komórek *M. pachydermatis*. Skład mieszaniny reakcyjnej o objętości końcowej 25 μ l był następujący: 10 mM Tris-HCl (pH 9,0), 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂ (Fermentas), 250 μ M dNTPs (Fermentas), 2,5 U polimeraza Taq (Fermentas), 0,8 μ g/ μ l BSA (Sigma). Do różnicowania wykorzystano następujące startery:

ERIC IR (5'ATGTAAGCTCCTGGGGATT-CAC 3'),

ERIC2 (5'AAGTAAGTGACTGGGGTGA-GCG 3'),

BG2 (5'TACATTCGAGGACCCCTAAGTG 3')
oraz

FM1 (5'AGCCGCCTCCATGGCCCCAGG 3')

Startery używano razem (ERIC IR + ERIC2) w jednej reakcji lub amplifikowane oddzielnie. Wstępna denaturacja była przeprowadzona w 94°C przez 4 min. Program amplifikacji składał

się z 44 cykli złożonych z etapów: denaturacja DNA 1 min w 94°C, wiązanie starterów przez 1 min w 25°C, wydłużanie DNA przez 2 min w 72°C. Końcowe wydłużanie zachodziło w 72°C przez 4 min. Otrzymane produkty analizowano elektroforetycznie w 1,5% żelu agarozowym wybarwionym bromkiem etydy w buforze 0,5X TBE w świetle UV. Poprawność PCR sprawdzano w stosunku do kontroli ujemnej bez matrycy DNA.

Analiza filogenetyczna

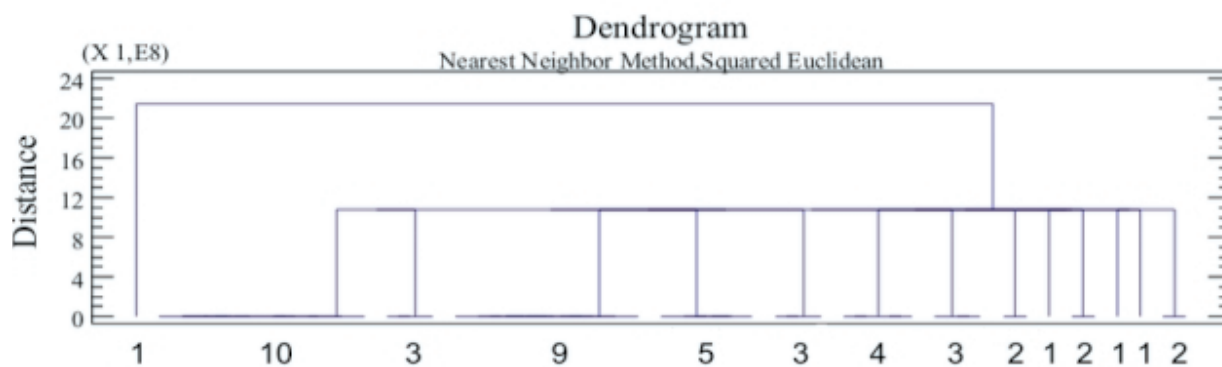
Do określenia pokrewieństwa filogenetycznego (dendrogram) wykorzystano program Quantity one VersaDoc (BioRad) i Statgraphics plus 4.1.

Wyniki i omówienie

Wszystkie przebadane izolaty pogrupowano na

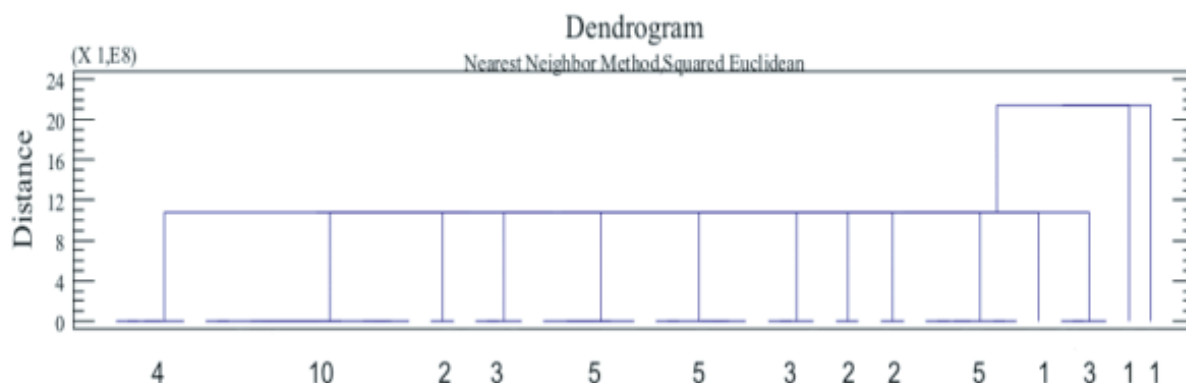
podstawie profilu genetycznego uzyskanego z wykorzystaniem arbitralnych starterów w reakcji RAPD. Początkowe badania z użyciem arbitralnego startera BG2 wykazały, iż nie jest przydatny do różnicowania *M. pachydermatis*, jakkolwiek istnieją dane literaturowe opisujące jego przydatność do różnicowania innych gatunków grzybów. Widoczne na żelu produkty PCR startera BG2 były jednorodne. Zbyt mało fragmentów DNA ulegało również powielaniu (dane pominięte w pracy). Początkowo zastosowano startery ERIC IR i ERIC2 w oddzielnych reakcjach RAPD. Pomimo, iż powstawało dużo produktów po amplifikacji DNA, to nie były one dobrą podstawą do wykazania zróżnicowania (w dendrogramie otrzymano dużo grup mało licznych) (Rys.1, 2).

W przypadku zastosowania mieszanki starterów ERIC IR i ERIC2 w jednej reakcji RAPD, (Rys.



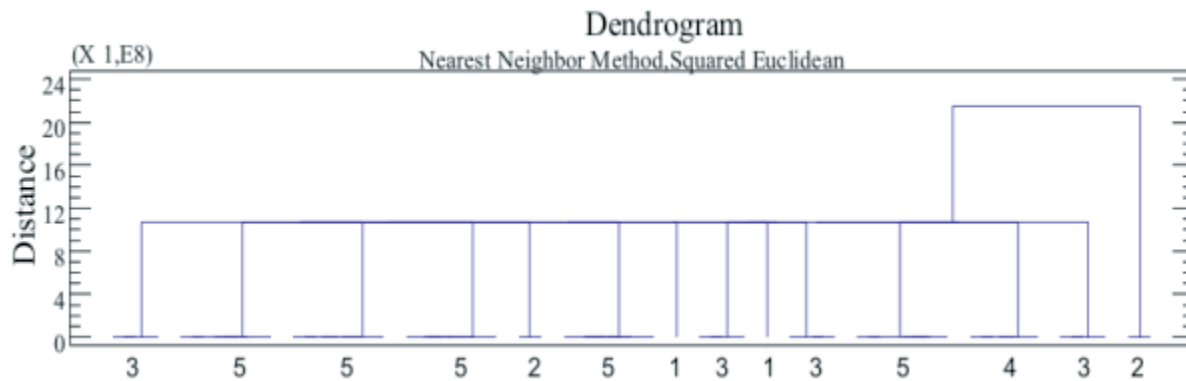
Rys. 1. Drzewo filogenetyczne izolatów *M. pachydermatis* obrazujące podobieństwo względem startera Eric1R. Wykres sporządzono na podstawie oceny odległości euklidesowej metodą najbliższego sąsiedztwa. Na osi rzędnych zaznaczono odległości euklidesowe, a na osi odciętych odłożono liczby izolatów *M. pachydermatis* przypadających do danej gałęzi (grupy filogenetycznej).

Fig. 1. Phylogenetic tree of *M. pachydermatis* isolates. Eric1R primer was used. Euclidean's distance was estimated by the Nearest Neighbour method.



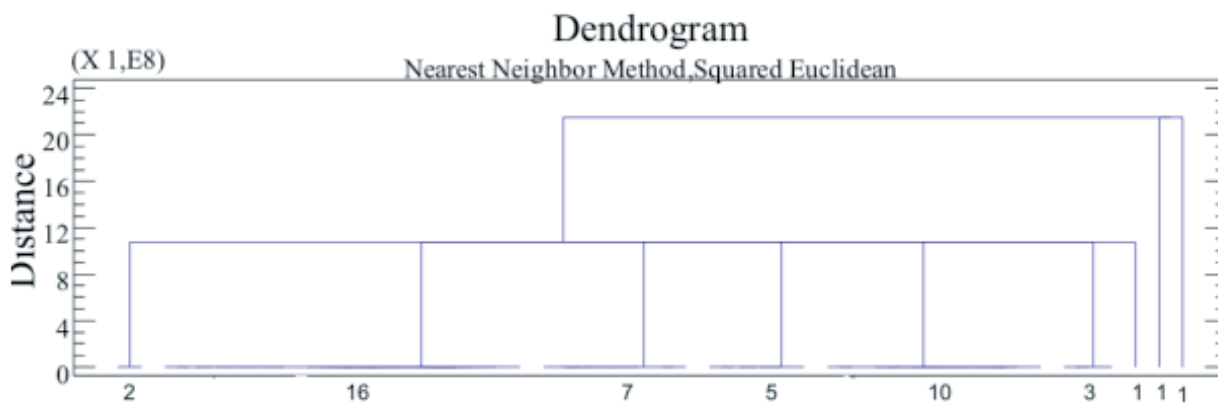
Rys. 2. Drzewo filogenetyczne izolatów *M. pachydermatis* obrazujące podobieństwo względem startera Eric2. Wykres sporządzono na podstawie oceny odległości euklidesowej metodą najbliższego sąsiedztwa.

Fig. 2. Phylogenetic tree of *M. pachydermatis* isolates. Eric2 primer was used. Euclidean's distance was estimated by the Nearest Neighbour method.



Rys. 3. Drzewo filogenetyczne izolatów *M. pachydermatis* obrazujące podobieństwo względem mieszaniny starterów Eric1R i Eric2 użytych w jednej reakcji. Wykres sporządzono na podstawie oceny odległości euklidesowej metodą najbliższego sąsiedztwa

Fig. 3. Phylogenetic tree of *M. pachydermatis* isolates. Eric1R and Eric2 primers were used together. Euclidean's distance was estimated by the Nearest Neighbour method.



Rys. 4. Drzewo filogenetyczne izolatów *M. pachydermatis* obrazujące podobieństwo względem startera FM1. Wykres sporządzono na podstawie oceny odległości euklidesowej metodą najbliższego sąsiedztwa

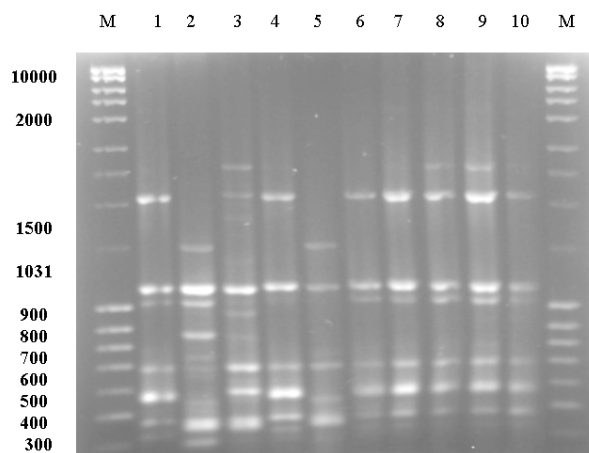
Fig. 4. Phylogenetic tree of *M. pachydermatis* isolates. FM1 primer was used. Euclidean's distance was estimated by the Nearest Neighbour method

3), otrzymano w dendrogramie również dużo grup, ale w stosunku do dendrogramów 1 i 2 (wykreślonych na podstawie wyników otrzymanych z wykorzystaniem arbitralnych starterów ERIC IR i ERIC2 w oddzielnych reakcjach RAPD) było znacznie mniej grup bardzo mało licznych, złożonych z 1-2 izolatów *M. pachydermatis*. Sugeruje to, iż zastosowanie starterów ERIC IR i ERIC2 razem daje lepsze możliwości różnicowania niż stosowanie ich oddzielnie.

Wysoki stopień różnorodności DNA wśród badanych izolatów *M. pachydermatis* ujawniono dopiero przy użyciu startera FM1. Dendrogramy sporządzono przez obliczanie odległości euklidesowej zmiennych wartości (wielkości i ilości otrzymanych produktów RAPD) i metodą najbliższego sąsiedztwa

(ang. nearest neighbor), (Rys. 4). Na podstawie drzewa filogenetycznego wykazano istnienie czterech głównych typów (grup filogenetycznych) izolatów *M. pachydermatis*. Poniżej przedstawiono wykaz izolatów *M. pachydermatis* przydzielonych do w/w czterech głównych grup: I) 16, II) 7, III) 5 i IV) 10 izolatów *M. pachydermatis*. Wyróżniono także 5 grup mało licznych, w tym: 3 grupy złożone tylko z jednego izolatu, jedna grupa złożona z dwóch izolatów oraz jedna grupa złożona z trzech izolatów *M. pachydermatis*.

Rozdział elektroforetyczny namnożonych fragmentów DNA przy użyciu startera FM1 i mieszaniny starterów ERIC IR i ERIC2 w jednej reakcji RAPD przedstawia Fot. 1 i Fot. 2.



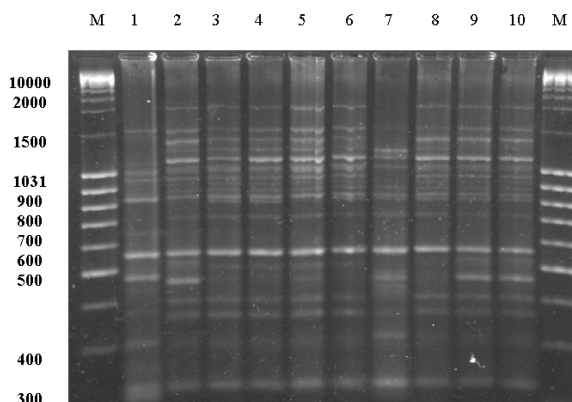
Fot. 1. Przykładowy rozdział elektroforetyczny fragmentów DNA uzyskanych w reakcji RAPD przy użyciu startera FM1. M — marker masy SMO 403. Ścieżki 1-10 — badane izolaty *M. pachydermatis*

Phot. 1. Gel electrophoresis of DNA fragments of *M. pachydermatis* isolates. In this RAPD reaction FM1 primer was used. M — SMO 403 marker. Lines 1-10 — tested *M. pachydermatis* isolates

Dyskusja

W przeszłości podejmowano próby różnicowania *M. pachydermatis* na serotypy, jednakże skorelowanie określonego serotypu z właściwościami biochemicznymi lub gatunkiem typowego żywiciela okazało się niezwykle trudne [6–16]. Wydaje się, że jeden gatunek żywiciela może być zasiedlany przez więcej niż jeden „typ” *M. pachydermatis*. Zastosowanie metody RAPD wydaje się właściwą metodą do typowania w obrębie gatunku *M. pachydermatis*, pod warunkiem dobrania odpowiedniego arbitralnego startera lub mieszaniny starterów. Wykazane różnice w obrębie gatunku *M. pachydermatis* izolatów pochodzących od psów sugerują istnienie subpopulacji. Mimo, że analizowano genomowe DNA 47 szczepów grzybów izolowanych wyłącznie od psów z klinicznych przypadków *otitis externa* i jedynie z terenu Warszawy, to nawet w tym układzie gatunek *M. pachydermatis* wydaje się być niehomogeny genetycznie. W celu uzyskania większego wglądu w różnorodność sekwencji nukleotydowych w obrębie gatunku *Malassezia* wydaje się konieczne przeanalizowanie większej liczby izolatów, najlepiej pochodzących od różnych zwierząt i o różnym pochodzeniu geograficznym.

Dane z piśmiennictwa wskazują, iż zastosowanie mieszaniny starterów w reakcji RAPD jest bardzo przydatne w różnicowaniu gatunku *M. pachyderma-*



Fot. 2. Przykładowy rozdział elektroforetyczny fragmentów DNA uzyskanych w reakcji RAPD z dwoma starterami Eric1R i Eric2 użytymi jednocześnie.

M — marker masy. Ścieżki 1-10 — badane izolaty *M. pachydermatis*

Phot. 2. Gel electrophoresis of DNA fragments of *M. pachydermatis* isolates. In this RAPD reaction two primers Eric1R and Eric2 were used together. M — SMO 403 marker. Lines 1-10 — tested *M. pachydermatis* isolates

tis [17]. Uzyskane wyniki analizy badanych izolatów metodą RAPD przy użyciu startera FM1 wskazują na istnienie dziewięciu różnych grup filogenetycznych, jednakże istnienie pięciu spośród nich jest słabo udokumentowane gdyż trzy grupy reprezentowane są przez tylko niewielką liczbę izolatów (1–3) *M. pachydermatis*. Konieczna wydaje się zatem dalsza analiza izolatów grzybów *Malassezia pachydermatis* za pomocą innych technik, weryfikujących uzyskane obecnie rezultaty.

Grzyby *M. pachydermatis* mogą bytować na zdrowej skórze, dlatego, mimo że spełniają postulaty Kocha, trudno określić je jednoznacznie jako czynnik patogenny. W dostępnym piśmiennictwie stosunkowo mało jest badań poświęconych mechanizmom patogenyzy *M. pachydermatis*. U zwierząt zakażeniom wywoływanych przez *M. pachydermatis* towarzyszy z reguły silny świąd i odczyn zapalny z przewagą procesów wysiękowych. Śródskórne podanie ekstraktu *Malassezia* psom z atopowym zapaleniem skóry, u których izolowano te drożdżaki, powodowało reakcję typową dla nadwrażliwości na te alergeny, czego nie obserwowano u psów zdrowych. Różnicowanie szczepów w obrębie rodzaju na gatunki, a następnie — o ile to możliwe — na populacje lub subpopulacje, jest bardzo istotne z epidemiologicznego punktu widzenia. Korelacja przynależności do grupy genetycznej i nasilenia obja-

wów klinicznych może rzucić nowe światło na mechanizmy patogenezы zakażeń grzybami *M. pachydermatis*. Szczepy, które oceniano w niniejszych badaniach pochodziły głównie z terenu Warszawy, lub jej najbliższych okolic. Duże zróżnicowanie genetyczne świadczyć może o braku endemicznego występowania określonego profilu, charakterystycznego dla populacji. Brak jest również danych na temat izolacji tego samego szczepu z nawracających zakażeń, a z przeglądu piśmiennictwa wiadomo, że określenie dokładnego profilu genetycznego subpopulacji umożliwi analizę częstości zakażeń nawracających u tego samego pacjenta i ocenę skuteczności podjętego leczenia. Poza różnicami genetycznymi, do tej pory nie opisywano wyraźnie zróżnicowania cech biochemicznych i fizjologicznych w obrębie tego gatunku.

Wnioski

(1) Metoda RAPD wydaje się być przydatna do różnicowania grzybów w obrębie gatunku *Malassezia pachydermatis*.

(2) Gatunek *Malassezia pachydermatis* nie jest jednorodny genetycznie względem użytych arbitralnych starterów.

(3) Dalsze badania powinny iść w kierunku określenia roli poszczególnych typów (grup filogenetycznych) grzybów *M. pachydermatis* w chorobotwórczości jednostek chorobowych takich jak *otitis externa* i *dermatitis*.

Literatura

- [1] Dworecka-Kaszak B. 2000. Zakażenia *Malassezia pachydermatis* u psów i kotów. *Magazyn Weterynaryjny, Suplement „Koty”*: 36–39.
- [2] Nakabayashi A., Sie Y., Guillot J. 2000. Identification of *Malassezia* species isolated from patients with seborrhoeic dermatitis, atopic dermatitis, pityriasis versicolor and normal subjects. *Medical Mycology* 38: 337–341.
- [3] Gupta A., Kohli Y., Summerbell R. 2000. Molecular differentiation of seven *Malassezia* species. *Journal of Clinical Microbiology* 38: 1869–1875.
- [4] Sugita T., Takashima M., Kodama M., Tsuboi R., Nishikawa A. 2003. Description of a new yeast species, *Malassezia japonica*, and its detection in patients with atopic dermatitis and healthy subjects. *Journal of Clinical Microbiology* 41: 4695–4699.
- [5] Aizawa T., Kano R., Nakamura Y., Watanabe S., Hasegawa A. 2001. The genetic diversity of clinical isolates of *Malassezia pachydermatis* from dogs and cats. *Medical Mycology* 39: 329–334.
- [6] Guillot J., Gueho E. 1995. The diversity of *Malassezia* yeasts confirmed by rRNA sequence and nuclear DNA comparisons. *Antonie van Leeuwenhoek* 67: 297–314.
- [7] Kiuchi A., Takaraguchi S., Hanizawa R., Hara M., Ikeda T., Tabuci K. 1992. Chromosome sized DNA of *Malassezia pachydermatis* by pulsed-field gel electrophoresis. *Journal of Medical Veterinary Sciences* 54: 1219–1220.
- [8] Boekhout T., Kamp M., Gueho E. 1998. Molecular typing of *Malassezia* species with PFGE and RAPD. *Medical Mycology* 36: 365–372.
- [9] Boekhout T., Bosboom R.W. 1994. Karyotyping of *Malassezia* yeast: taxonomic and epidemiological implications. *Systematic and Applied Microbiology* 17: 146–153.
- [10] Anthony R.M., Howell S.A., Pinters L. 1994. Application of DNA typing methods to the study of the epidemiology of *Malassezia pachydermatis*. *Microbial Ecology in Health and Diseases* 7: 161–168.
- [11] Senczek D., Siesenop U., Bohm K.H. 1999. Characterization of *Malassezia* species by means of phenotypic characteristics and detection of electrophoretic karyotypes by pulsed-field gel electrophoresis. *Mycoses* 42: 409–414.
- [12] Theelen B., Silvestri M., Gueno E., Belkum A., Boekhout T. 2001. Identification and typing of *Malassezia* yeasts using amplified fragment length polymorphism (AFLP(tm)), random amplified polymorphic DNA (RAPD) and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). *FEMS Yeast Research* 1: 79–86.
- [13] Gzyl A., Augustynowicz E. 1999. Technical Aspects of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) technique in genotyping of bacterial strains. *Acta Microbiologica Polonica* 3: 243–259.
- [14] Belkum A. 1994. DNA fingerprinting of medically important microorganisms by use of PCR. *Clinical Microbiology Reviews* 7: 174–184.
- [15] Welsh J., McClelland M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research* 18: 7213–7218.
- [16] Guillot J., Gueho E., Chevrier G., Chermette R. 1997. Epidemiological analysis of *Malassezia pachydermatis* isolates by partial sequencing of the large subunit ribosomal RNA. *Research in Veterinary Science* 62: 22–25.
- [17] Belkum A., Boekhout T., Bosboom R. 1994. Monitoring spread of *Malassezia* infections in a neonatal intensive care unit by PCR-mediated genetic typing. *Journal of Clinical Microbiology* 32: 2528–2532.

Wpłynęło 10 lipca 2006

Zaakceptowano 30 sierpnia 2006