

МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ МИКРОМИЦЕТОВ В СОСКОБАХ КОЖИ

Руденкова Т. В., Костюк С. А., Шиманская И. Г., Милькото Н. А.

Государственное учреждение образования «Белорусская медицинская академия последипломного образования»,
г. Минск, Республика Беларусь

Реферат. Разработан метод, позволяющий проводить выявление ДНК *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Malassezia furfur*, *Malassezia globosa*, *Malassezia sympodialis* в соскобах с пораженной кожи пациентов с atopическим дерматитом и экземой с использованием ПЦР в режиме реального времени. Применение разработанного метода позволит объективно оценивать структуру микробного пейзажа в очагах поражений у пациентов с atopическим дерматитом и экземой.

Ключевые слова: ПЦР, *Candida*, *Epidermophyton*, *Malassezia*, *Trichophyton*, atopический дерматит, экзема.

Введение. Atopический дерматит (далее — АД) — хроническое воспалительное заболевание кожи, возникающее чаще в раннем детском возрасте у лиц с наследственной предрасположенностью к другим atopическим, чаще респираторным заболеваниям, имеющее рецидивирующее течение с возрастными особенностями локализации и морфологии очагов воспаления, характеризующееся кожным зудом и обусловленное гиперчувствительностью как к специфическим (аллергенным), так и неспецифическим раздражителям [1].

Микробный пейзаж кожи у пациентов с АД существенно отличается от микрофлоры здоровых людей. У здоровых людей количество и видовой состав микроорганизмов аутофлоры относительно постоянны. Даже небольшие отклонения в состоянии здоровья изменяют это равновесие вследствие угнетения защитных факторов. При этом количество микроорганизмов увеличивается, а состав флоры изменяется. Эти изменения могут происходить даже при отсутствии клинических признаков поражения кожи [1, 2].

Пациенты с АД подвержены развитию инфекционных поражений кожных покровов (контагиозный моллюск, герпесвирусная инфекция, грибковые поражения). Доказана высокая частота выявления на коже пациентов с АД грибов родов *Malassezia* и *Candida*. При этом у пациентов с АД данные микроорганизмы выступают в роли источника постоянной антигенной стимуляции, что усугубляет течение заболевания [2–4].

Для изучения влияния дерматофитов, дрожжеподобных грибов, маласейзий на течение АД, установления возможной ассоциации между клиническими характеристиками заболевания и составом микрофлоры кожных покровов пациентов необходимо разработать точный и быстрый метод идентификации данных микроорганизмов.

Цель работы — разработка метода выявления ДНК дерматофитов, дрожжеподобных грибов, маласейзий в соскобах кожи с использованием метода ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ).

Материалы и методы. Объектами исследования явились пациенты 3-х групп, которые были сформированы в соответствии с нозологическими формами заболеваний: 1-я группа — пациенты с дерматитом ($n = 18$); 2-я группа — пациенты с экземой ($n = 15$). В 3-ю группу (группа контроля) были включены практически здоровые лица ($n = 10$).

В качестве биологического материала использовали соскобы поверхностного эпителия с пораженных участков кожи пациентов. Для получения соскобов использовали ложку Фолькмана. Полученный материал помещали в пробирку типа эппендорф объемом 1,5 мл, содержащую 200 мкл транспортной среды («ВекторБест», РФ). Пробирки замораживали и оставляли для хранения при температуре $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$.

В ходе оптимизации метода выделения микробной ДНК из соскобов с пораженных участков кожи пациентов с АД и экземой были использованы наборы для выделения нуклеиновых кислот «Проба-НК» («ДНК-технология», РФ), «Экстракция-100» («ВекторБест», РФ), «ДНК-сорб-В» («АмплиСенс», РФ) и метод классической фенол-хлороформной экстракции.

Для определения концентрации и степени чистоты выделенной ДНК проводили спектрофотометрические исследования (NanoDrop 1000, Thermo Scientific, США), при этом определяли отношение поглощения на длинах волн 260 и 280 нм ($A_{260/280}$).

Выбор последовательности праймеров для идентификации дерматофитов, дрожжеподобных грибов, маласейзий был проведен с использованием программного обеспечения Vector NTI (Ivrogen).

Полученную ДНК использовали для постановки TaqMan ПЦР-РВ с применением Quick-Load Taq 2X Master Mix (Праймтех, РФ) и специально подобранных пар праймеров для каждого микроорганизма. В качестве внутреннего контроля использовали house-keeping ген человека (GAPDH — glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase). Амплификацию проводили на термоциклере «Rotor-Gene-6000» («Corbett research», Австралия).

Статистическую обработку данных проводили с использованием статистической программы SPSS, версия 15.

Результаты и их обсуждение. После выделения ДНК из образцов биологического материала с использованием различных наборов реагентов было проведено сравнение значений показателя $A_{260/280}$. Метод выделения с помощью фенол-хлороформной экстракции был взят в качестве референсного. Полученные результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1. — Значения $A_{260/280}$, полученные при использовании различных наборов реагентов ($Me (Q_{25}/Q_{75})$)

Название набора	$A_{260/280}$
«Проба-НК»	1,57 (1,51/1,66)
«Экстракция-100»	1,71 (1,68/1,78)
«ДНК-сорб-В»	1,34 (1,13/1,61)
Метод классической фенол-хлороформной экстракции	1,74 (1,71/1,79)

Для чистого препарата ДНК с отсутствием примесей белка и других ингибиторов значение $A_{260/280}$ составляет 1,8. Достоверно более высокие значения $A_{260/280}$, близкие к показателям референсного метода (метод фенол-хлороформной экстракции), были установлены при использовании набора реагентов «Экстракция-100» (критерий Манна–Уитни, $p < 0,05$).

После анализа полученных данных был сделан вывод, что для дальнейших исследований по молекулярно-генетической идентификации микробного пейзажа пораженных участков кожи пациентов с атопическим дерматитом и экземой оптимальным является использование набора реагентов «Экстракция-100» («ВекторБест», РФ).

На следующем этапе с использованием программного обеспечения Vector NTI и базы данных нуклеотидных последовательностей NCBI BLAST были подобраны пары праймеров (прямой (forward) и обратный (reverse)) и зонды (probe) для выявления методом ПЦР-РВ микроорганизмов: *Candida albicans* (*C. albicans*), *Candida glabrata* (*C. glabrata*), *Candida parapsilosis* (*C. parapsilosis*), *Epidermophyton floccosum* (*E. floccosum*), *Malassezia furfur* (*M. furfur*), *Malassezia restricta* (*M. restricta*), *Malassezia obtusa* (*M. obtusa*), *Malassezia globosa* (*M. globosa*), *Malassezia sympodialis* (*M. sympodialis*), *Malassezia pachydermatis* (*M. pachydermatis*), *Trichophyton rubrum* (*T. rubrum*), *Trichophyton interdigitale* (*T. interdigitale*).

Подобранные последовательности праймеров и зондов представлены в таблице 2.

Таблица 2. — Последовательности праймеров и зондов для идентификации дерматофитов, дрожжеподобных грибов, маласезий

Название микроорганизма	Последовательность праймера
<i>C. albicans</i> 1-forward	CTGTTTGAGCGTCGTTTCTCCCT
<i>C. albicans</i> 1-reverse	AAAGCGATCCCGCCTTACCA
<i>C. albicans</i> 1-probe	AACCGCTGGGTTTGGTGTTGAG
<i>C. albicans</i> 2-forward	CATGCCTGTTTGAGCGTCGTTT
<i>C. albicans</i> 2-reverse	CGCCTTACCCTACCCTCTTTCAA
<i>C. albicans</i> 2-probe	AACCGCTGGGTTTGGTGTTGAG
<i>C. glabrata</i> -forward	TAGCCGGTCTGCTACGTTTATTCG
<i>C. glabrata</i> -reverse	CCCGGTGTTTCACAGAACAAAGGT
<i>C. glabrata</i> -probe	CTGTGATTTGTCTAGTGTAACCTC
<i>C. parapsilosis</i> -forward	TATGGGGCCTGCCAGAGATTAAC
<i>C. parapsilosis</i> -reverse	GCGAGAACCAAGAGATCCGTTGTT
<i>C. parapsilosis</i> -probe	GTCAACCGATTATTTAATAGTCA
<i>E. floccosum</i> -forward	ATGATCACTCCCAAGTTGCCGTTG
<i>E. floccosum</i> -reverse	GCCGCTGACTATATTGAAAGCACG
<i>E. floccosum</i> -probe	GTGATCTACGCTTGGGCCAGAT
<i>M. furfur</i> -forward	GGATCATTAGTGAAAGCAAGGGCC
<i>M. furfur</i> -reverse	GCACACGGGTTTGTGGATATTGTG
<i>M. furfur</i> -probe	TACGGACGGCGCTACTCGCGTA
<i>T. interdigitale</i> -forward	CCGACTTATGCCACCTTCGAGTT
<i>T. interdigitale</i> -reverse	CCGACTTATGCCACCTTCGAGTT
<i>T. interdigitale</i> -probe	TGACTAAGTCCGCGTTTGTCTGTG
<i>M. restricta</i> -forward	AACCCGTGTGCACTGTCTTGGA
<i>M. restricta</i> -reverse	GGTCCAACCAAGTTCCACGTTTCA
<i>M. restricta</i> -probe	GAGAAAGGCTTCAGAGAAGT
<i>M. globosa</i> -forward	TTAGTGAAGATTCAAGGGCCAGCC
<i>M. globosa</i> -reverse	TCCTACAACCTGTGCACACGGGTT
<i>M. globosa</i> -probe	ATACAGACGTACAATAAGTGT
<i>M. sympodialis</i> -forward	CATTAGTGAAAGTTTCGGGCCTGC
<i>M. sympodialis</i> -reverse	TTCGTCATCACAGTGCACAGGG
<i>M. sympodialis</i> -probe	GCAAACACGTCTCTGGCGCCCAT
<i>M. pachydermatis</i> -forward	CCGTGTGCACTTGTGTTGCTTTG
<i>M. pachydermatis</i> -reverse	CCAGTGACGGTCCAACGTTTACAA
<i>M. pachydermatis</i> -probe	TGTATGGGCGAGCGCACGCATTC

Продолжение таблицы 2

Название микроорганизма	Последовательность праймера
<i>T. rubrum</i> 1-forward	AGCCCACTTTCGACTGGACCCATA
<i>T. rubrum</i> 1-reverse	GGTCTGTTCAAGCGATTTGCA
<i>T. rubrum</i> 1-probe	ACAAAATTTGTGCAAGCCCAGTG
<i>T. rubrum</i> 2-forward	AAGCAGATCACTCCTCAAATGGCC
<i>T. rubrum</i> 2-reverse	GGGTCGGGCGTAATCATTACTCAA
<i>T. rubrum</i> 2-probe	CTTACAATCTTTAGGAACATCTC
<i>M. obtusa</i> -forward	TCAATAGTGAAAGCAAGGGCCTGC
<i>M. obtusa</i> -reverse	GCACACGGGTTTGTGGATATTGGT
<i>M. obtusa</i> -probe	TGCCATACGGACGGCGCCTACTC

Для *C. albicans* и *T. rubrum* были выбраны по две пары праймеров и зондов с целью найти оптимальные последовательности для достижения наилучшего результата при амплификации.

В качестве флуоресцентной метки для зондов при идентификации дерматофитов, дрожжеподобных грибов, маласейзий с применением TaqMan ПЦР-РВ использовали флуорофор FAM, в качестве гасителя — BHQ1. Детекцию проводили по каналу «Green».

Для выбора гена, который будет использоваться в качестве внутреннего контроля, провели количественный анализ и расчет коэффициента вариации для house-keeping генов человека: *NAGK*, *GAPDH*, *HGUS*, β -актин. House-keeping гены человека присутствуют во всех клетках. Использование данных генов в качестве внутреннего контроля позволяет судить как о правильности проведения всех этапов ПЦР, так и о наличии в пробе клеток человека, т. е. о качестве взятия биологического материала.

Для оценки концентрации house-keeping генов человека использовали плазмидный стандарт, а затем рассчитывали коэффициент вариации (CV) исходя из полученных концентраций house-keeping генов [5].

Амплификацию всех проб проводили в дублях, для расчета коэффициента вариации использовали средние значения концентраций, полученные в ходе исследования.

В результате анализа полученных данных в качестве внутреннего контроля был выбран ген человека *GAPDH*, т. к. именно для него было установлено самое низкое значение коэффициента вариации — 4,2 %. Для генов *NAGK*, *HGUS* и β -актин рассчитанные значения коэффициентов вариации находились на уровне 7,6, 11,2 и 9,1 % соответственно.

Для амплификации гена *GAPDH* использовали: *GAPDH*-forward — GCCATCAATGACCCCTTCAT, *GAPDH*-reverse — GCCGTGGAATTTGCCGT; *GAPDH*-probe — CTCAACTACATGGTCTACATGTTCCA GTATGATTTCCA [6]. В качестве метки для зонда использовали флуорофор JOE, в качестве гасителя — BHQ2. Детекцию данного гена проводили по каналу «Yellow».

В ходе оптимизации состава амплификационной смеси были протестированы различные объемы внесения праймеров (от 1 до 2 мкл), ДНК (от 3 до 10 мкл) и воды.

По результатам исследований был выбран оптимальный состав амплификационной смеси, в который были включены: 15,0 мкл 2X Quick-Load Taq Master Mix; 1,5 мкл смеси эквивалентных концентраций праймеров (прямого и обратного) и зонда для идентификации исследуемого микроорганизма; 1,1 мкл смеси эквивалентных концентраций праймеров (прямого и обратного) и зонда для гена *GAPDH*; 4,5 мкл воды и 8 мкл ДНК.

При оптимизации программы амплификации варьировали длительность горячего старта (от 5 до 15 мин); длительность этапа денатурации (от 10 до 20 с); длительность (от 30 до 60 с) и температура (от 58 до 63 °С) этапа отжига; количество циклов амплификации (от 35 до 50). По результатам проведенных исследований был выбран оптимальный вариант программы амплификации: 1 цикл — 95 °С, 5 мин; 45 циклов — 95 °С; 20 с, 60 °С, 40 с.

Для анализа возможности использования подобранных праймеров и зондов, оптимизированного состава амплификационной смеси и программы амплификации при идентификации дерматофитов, дрожжеподобных грибов, маласейзий проводили ПЦР-РВ. Пробы ставили в дублях. Результаты, полученные в ходе выполнения данного этапа, представлены в таблице 3.

Результат выявления микроорганизма считался положительным при условии, что по каналу «Yellow» для гена *GAPDH* значение порогового цикла находилось в пределах 20–36, а по каналу «Green» значение порогового цикла для специфического участка гена идентифицируемого микроорганизма находилось в пределах 20–40.

Таблица 3. — Результаты выявления дерматофитов, дрожжеподобных грибов, маласейзий в биологическом материале обследованных групп пациентов

Название микроорганизма	Частота выявления, % (n)		
	группа 1 (n = 18)	группа 2 (n = 15)	группа 3 (n = 10)
<i>C. albicans</i> 1	55,56 (10)	66,67 (10)	50,0 (5)
<i>C. albicans</i> 2	55,56 (10)	66,67 (10)	50,0 (5)
<i>C. glabrata</i>	38,89 (7)	33,33 (5)	20,0 (2)
<i>C. parapsilosis</i>	16,67 (3)	20,0 (3)	0
<i>E. floccosum</i>	0	0	0
<i>M. furfur</i>	33,33 (6)	40,0 (6)	30,0 (3)
<i>M. restricta</i>	0	0	0
<i>M. obtusa</i>	0	0	0
<i>M. globosa</i>	22,22 (4)	26,66 (4)	20,0 (2)
<i>M. sympodialis</i>	44,44 (8)	46,67 (7)	10,0 (1)
<i>M. pachydermatis</i>	0	0	0
<i>T. rubrum</i> 1	0	0	0
<i>T. rubrum</i> 2	0	0	0
<i>T. interdigitale</i>	0	0	0

Результат выявления микроорганизма считался отрицательным при условии, что по каналу «Yellow» для гена GAPDH значение порогового цикла находилось в пределах 20–36, а по каналу «Green» значение порогового цикла для специфического участка гена идентифицируемого микроорганизма находилось в пределах 0–19 или 41–45.

Если по каналу «Yellow» для гена GAPDH значение порогового цикла не определялось, образец подвергался повторному анализу начиная с этапа выделения ДНК.

В ходе проведения исследований в биологическом материале пациентов была выявлена (хотя бы в одном из образцов) ДНК следующих микроорганизмов: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *M. furfur*, *M. globosa*, *M. sympodialis*.

ДНК *M. restricta*, *E. floccosum*, *M. obtusa*, *M. pachydermatis*, *T. interdigitale*, *T. rubrum* не была выявлена ни в одном из образцов, что может являться следствием либо отсутствия данных возбудителей в биологическом материале обследованных пациентов, либо неверным выбором праймеров и зонда для идентификации микроорганизма. Вне зависимости от причины данные микроорганизмы были исключены из дальнейших исследований.

Для оценки уровня амплификации неспецифических фрагментов ДНК дополнительно был проведен электрофоретический анализ полученных ампликонов. На электрофореграмме присутствовали четкие полосы на уровне детекции специфических фрагментов ДНК гена GAPDH и специфических фрагментов генов идентифицируемых микроорганизмов во всех проанализированных образцах.

После проведения электрофореза из геля вырезали фрагменты, содержащие ДНК идентифицируемых микроорганизмов. Затем ДНК извлекали из геля с использованием набора реагентов QIAquick Gel extraction kit (Qiagen, Германия) для проведения секвенирования с целью анализа нуклеотидной последовательности полученных фрагментов ДНК, для оценки аналитической специфичности разработанной методики.

Сиквенс-анализ проводили с использованием набора реагентов BigDye Terminator Cycle Sequencing kit v3.1 («Applied Biosystems», США) и forward-праймера для каждого гена. Отсеквенированные фрагменты ДНК подвергались очистке с использованием DyeEx 2.0 Spin kit («Qiagen», Германия) и последующему электрофоретическому анализу на генетическом анализаторе ABI Prism 310 («Applied Biosystems», США).

Полученные данные о нуклеотидной последовательности образцов сравнивали с зарегистрированными последовательностями генов идентифицируемых микроорганизмов в on-line поисковой системе BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/bl2.html) для идентификации принадлежности той или иной последовательности определенному микроорганизму [7]. Для всех проанализированных образцов совпадение нуклеотидных последовательностей с зарегистрированными находилось на уровне 100 %, что позволило сделать вывод о высокой аналитической специфичности разработанного метода (100 %) [5].

Таким образом, подобранные пары праймеров и зонды можно использовать для идентификации *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *M. furfur*, *M. globosa*, *M. sympodialis*.

По результатам анализа кривых амплификации были выбраны по два образца с высокой концентрацией одного из микроорганизмов (значения пороговых циклов амплификации для данного микроорганизма в данных образцах были самыми низкими) для оценки эффективности протекания ПЦР-РВ.

Для оценки эффективности протекания ПЦР проводили амплификацию 10-кратных разведений образцов ДНК с целью построения стандартной кривой. Концентрацию ДНК в неразведенном образце условно принимали за 100 и делали 2 разведения (10, 1). Амплификацию проб проводили в дублях.

При анализе результатов амплификации проводили построение стандартной кривой корреляции между значениями пороговых циклов C_t и \log_{10} условной концентрации ДНК.

Значения корреляции (R^2) между значениями пороговых циклов C_t и \log_{10} условной концентрации ДНК в образцах составили от 0,989 до 0,999. Полученные значения эффективности ПЦР находились в пределах от 1,56 (для *C. albicans 1*) до 1,71 (для *C. parapsilosis*). Все полученные результаты представлены в таблице 4.

Таблица 4. — Значения эффективности и корреляции при выявлении дерматофитов, дрожжеподобных грибов, маласезий

Название микроорганизма	№ образца	E	R^2
<i>C. albicans 1</i>	4	1,57	0,989
	17	1,56	0,989
<i>C. albicans 2</i>	22	1,63	0,997
	34	1,61	0,995
<i>C. glabrata</i>	2	1,71	0,999
	14	1,61	0,997
<i>C. parapsilosis</i>	5	1,71	0,998
	7	1,61	0,996
<i>M. furfur</i>	6	1,58	0,997
	36	1,69	0,994
<i>M. globosa</i>	16	1,61	0,989
	37	1,63	0,994
<i>M. sympodialis</i>	12	1,68	0,992
	31	1,58	0,995

Для выявления *C. albicans* оптимальное соотношение эффективности реакции и корреляции было установлено для последовательностей праймеров и зонда *C. albicans 2*. Именно эти последовательности были выбраны для проведения дальнейших исследований при выявлении соответствующих микроорганизмов.

Заключение. Анализ результатов, полученных в ходе оптимизации ПЦР-РВ, позволил сделать вывод, что подобранные пары праймеров и зонды, состав амплификационной смеси и программу амплификации можно использовать для идентификации *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *M. furfur*, *M. globosa*, *M. sympodialis*. Использование разработанного метода позволит проводить быструю и объективную оценку микробного пейзажа в соскобах кожи пациентов с атопическим дерматитом и экземой.

Литература

1. Зайнуллина, О. Н. Микробиоценоз кожи у детей с атопическим дерматитом / О. Н. Зайнуллина // Казан. мед. журнал. — 2017. — Т. 98, № 4. — С. 597–602.
2. Grice, E. A. The skin microbiome / E. A. Grice // Nat. Rev. Microbiol. — 2011. — Vol. 9, № 4. — P. 244–253.
3. Tognetti, L. Bacterial skin and soft tissue infections: review of the epidemiology, microbiology, aetiopathogenesis and treatment: a collaboration between dermatologists and infectivologists / L. Tognetti [et al.] // J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. — 2012. — Vol. 26, № 8. — P. 931–941.
4. Мокроносова, М. А. Аллергия на дрожжи рода *Malassezia* у больных атопическим дерматитом / М. А. Мокроносова // Леч. врач. — 2009. — № 4. — С. 18–21.
5. Организация системы контроля качества исследований методом полимеразной цепной реакции / Н. А. Бадыгина [и др.] // Лабораторная диагностика. Восточная Европа. — 2012. — № 1. — С. 28–38.
6. Quantitative real-time PCR for the measurement of feline cytokine mRNA / C. M. Leutenegger [et al.] // Vet. Immunol. Immunopath. — 1999. — № 71. — P. 291–305.
7. Руденкова, Т. В. Анализ нуклеотидных замен в генах, кодирующих белки цитоадгезии *Mycoplasma genitalium* / Т. В. Руденкова // Репродуктивное здоровье. Восточная Европа. — 2012. — № 5. — С. 185–188.

THE METHOD FOR IDENTIFICATION OF MICROMYCETES IN SKIN SWABS

Rudenkova T. V., Kostiuk S. A., Shimanskaya I. G., Milkoto N. A.

State Educational Institution "The Belarusian Medical Academy of Post-Graduate Education", Minsk, Republic of Belarus

The method which allows to identify *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Malassezia furfur*, *Malassezia globosa*, *Malassezia sympodialis* DNA in skin swabs of patients with atopic dermatitis and eczema by applying real-time PCR is working out. This method implication will offer an opportunity of objective microflora estimation in lesion area of patients with atopic dermatitis and eczema.

Keywords: PCR, *Candida*, *Epidermophyton*, *Malassezia*, *Trichophyton*, atopic dermatitis, eczema.

Поступила 16.07.2018