



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **93898** (13) **C2**  
(51) **МПК**  
**C12N 1/20 (2011.01)**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ**ОПИС**  
**ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД****(54) ШТАМ МАЛАССЕЗІЙ MALASSEZIA SYMPODIALIS 97**

1

**(21)** a200811427**(22)** 22.09.2008**(24)** 25.03.2011**(46)** 25.03.2011, Бюл.№ 6, 2011 р.**(72)** МАВРОВ ІВАН ІВАНОВИЧ, БІЛОЗОРОВ ОЛЕКСІЙ ПАВЛОВИЧ, ВАСИЛЬЧЕНКО ВАЛЕРІЙ МИКОЛАЙОВИЧ, БЕЗРУЧЕНКО ІЗАІТА АНТОНІВНА, ЧАСТІЙ ТЕТЯНА ВОЛОДИМИРІВНА**(73)** ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ ДЕРМАТОЛОГІЇ ТА ВЕНЕРОЛОГІЇ" АМНУ**(56)** UA U 30701, 11.03.2008.

Aditya K Gupta et al.: "Molecular differentiation of Seven Malassezia species", Journal of clinical microbiology, May 2000, Vol. 38, No. 5, p. 1869-1875.  
Aristea Velegraki et al.: "Use of fatty acid RPMI 1640 media for testing susceptibilities of eight Malassezia species to the new triazole posaconazole and to six established antifungal agents by a modified NCCLS M27-A2 microdilution method and etest", Journal of clinical microbiology, Aug. 2004, Vol. 42, No. 8, p. 3589-3593.

Monica Vilhelmsson et al.: "Crystallization and preliminary crystallographic study of the yeast malassezia sympodialis allergen Mala s 1", Acta Cryst. (2006). F62, 97-99, ISSN: 1744-3091.

Koichi Makimura et al.: "Species identification and strain typing of Malassezia species stock strains and

2

clinical isolates based on the DNA sequences of nuclear ribosomal internal transcribed spacer 1 regions", J. Med. Microbiol. – Vol. 49 (2000), 29-35, ISSN: 0022-2615.

F. J. Cabanes et al.: "Molecular analysis of Malassezia sympodialis-related strains from domestic animals", Journal of clinical microbiology, Jan. 2005, Vol. 43, No. 1, p. 277-283.

George Gaitanis et al.: "Detection and mutation screening of malassezia sympodialis sequences coding for the mal s1 allergen implicated in atopic dermatitis", Letter to the editor, Journal of investigative dermatology (2003) 121, 1559-1560.

Aspiroz C. et al.: "Isolation of Malassezia globosa and M. Sympodialis from patient with pityriasis versicolor in Spain", Mycopathologia, 2002, Vol. 154, Issue: 3, pages info: 111-7, ISSN: 0301-486X, ISSN: 1573-0832 (ABSTRACT).

KR B1 100846356, 15.07.2008 (ABSTRACT).

KR B1 100852204, 13.08.2008 (ABSTRACT).

**(57)** Штам малассезій *Malassezia sympodialis* 97, депонований в Музеї патогенних для людини мікроорганізмів ДУ "Інститут епідеміології та інфекційних хвороб" АМН України під реєстраційним номером МПМ №27-Д, що використовується для діагностики атопічного дерматиту.

Винахід відноситься до мікробіології і може знайти своє застосування у мікробіологічній промисловості для одержання специфічного антигену *Malassezia*, відповідної імунної сироватки та в медицині для діагностики атопічного дерматиту.

Атопічний дерматит (АД) є хронічне запалювання шкіри з широкою варіацією клінічних проявів. За останні 30 років захворюваність АД в розвинутих країнах зросла удвічі, а деяких - майже втричі. На цю хворобу страждає від 2 до 10% всього дорослого населення та 15-30% дітей. Серед багаточисленних патогенетичних факторів, відповідальних за розвиток АД, особливу роль відіграють мікроорганізми у переважній більшості ліпофільні гриби *Malassezia* spp. та грампозитивні коки *Staphylococcus aureus* [Bieber T. Atopic dermatitis // New Engl. J. Med. - 2008. - Vol.358, №4. - p.1483-1494]. Ідентифікація виду мікроорганізму як пато-

генетичного фактору, який бере участь у появі та розвитку АД у хворого, є надзвичайно важливим в зв'язку з тим, що це визначає всю стратегію лікування хворого [Мокроносова М.А., Пыж В.В., Катаева О.В., Резников О.В. Терапевтический эффект активированного цинка пиритиона у больных с синдромов атоического дерматита/экземы с сенсбилизацией к дрожжеподобным грибам. // Рос. Аллергол. Журн. - 2004. - №3. - С.83-87; Мокроносова М.А., Максимова А.Е., Болтуро А.П., Кашаева О.В. Влияние различных методов наружной терапии на колонизацию кожи *St. aureus* и течение АД. // Рос. Аллерг. Журн. - 2004. - №16. - С.58-61]. На частку *Malassezia* spp. припадає від 30 до 80% всіх випадків АД [Sandstrom F.M.H., binder M.T., Johansson C, Bartosik J., Back O., Samhult T. et al. The prevalence o *Malassezia* yeasts in patients with atopic dermatitis, seborrhoeic dermatitis and healthy

(13) **C2**(11) **93898**(19) **UA**

controls. // Acta. Dermatol. Venereol. - 2005. - Vol.85, №1. - P.17-23].

*M. sympodialis* є представником роду *Malassezia* у хворих на АД, що найчастіше реєструється. Роль *Malassezia* spp. в розвитку АД визначається за допомогою детекції специфічних антитіл класів IgG, IgE, внутрішньошкірної проби та нашкірного апікаційного тесту, для постановки яких використовується екстракт із *M. sympodialis* [Casagrande B.F., Fluckiger S., Linder M.T., Jonansson C., Scheynins A., Cramer R., Schmid-Grendelmeier P. Sensitization to the yeast *Malassezia sympodialis* is specific for extrinsic and intrinsic atopic eczema // J. Infect. Dermat. - 2006. - Vol.126, №6. - P.2414-2421; Schmid-Grendelmeier P., Scheynius A., Cramer R. The role of sensitization to *Malassezia sympodialis* in atopic eczema in Allergy and Asthma in the in modern Society: The Scientific approach. Chem. Immunol. Allergy, Basel, Karger, ed. Cramer R. - 2006. - Vol.91. - P.98-109]. Однак відомо, що в кожному великому регіоні циркулюють штами мікроорганізмів одного виду, які суттєво відрізняються за своїми антигенними, імуногенними, алергенними та ін. властивостями, що визначає необхідність готувати біологічні препарати із мікроорганізмів, які виділяються в даному регіоні. Ці відмінності можуть бути настільки принциповими, що доводиться класифікувати такі мікроорганізми, як новий вид. Так, було встановлено, що в Японії циркулюють два нових види *Malassezia* - *M. dermatis* та *M. japonica*, які почали використовуватися для приготування діагностикумів (Sugita T., Takashima M., Shinoda T., Suto H., Unno T., Tsuboi R., Ogawa H., and Nishikawa A. New yeast species *Malassezia dermatis*, isolated from patients with atopic dermatitis // J. Clin. Microb. - 2002. - Vol. 40, №4. - p. 1363-1367; Sugita T., Takashima M., Kodama M., Tsuboi R., and Nishikawa A. Description of a new yeast species, *Malassezia japonica*, and its detection in patients with atopic dermatitis and healthy subjects // J. Clin. Microb. - 2003. - Vol. 41, №10. - p. 4695-4699).

Найбільш близьким за сукупністю ознак до того, що заявляється, є штам *Malassezia sympodialis* ATCC 42132, який використовується для детекції специфічних IgG та IgE антитіл до *Malassezia*, а також для внутрішньо-шкірних проб та нашкірних апікацій при діагностиці, перш за все, атопічного дерматиту. Фірма Pharmacia Diagnostics AB, Uppsala, Швеція, випускає діагностикум Immuno CAP "m70", який містить екстракт із культури *M. sympodialis* ATCC 42132.

В основу винаходу покладено задачу виділення штамів мікроорганізмів виду *M. sympodialis*, які циркулюють в даному регіоні та стабільно зберігають антигенні та імуногенні властивості.

Це дозволить одержати високоактивні імунні сироватки та специфічний антиген для виготовлення діагностичних тест-систем при діагностиці АД, що відповідає технічному результату, який досягається при використанні винаходу - штаму.

Новому штаму *Malassezia sympodialis* 97 задепонованому в ДУ "Інститут епідеміології та інфекційних хвороб АМН України" під реєстраційним

номером МПМ №27-Д, властиві такі ознаки, що відрізняють його від споріднених штамів.

Штам, який за сукупністю властивостей був ідентифікований як *M. sympodialis*, одержаний шляхом змиву зі шкіри за допомогою стерильного вологого мікробіологічного зонду зі скла, гомогенізації у 0,5 мл стерильного 0,05% розчину Тритону X-100 у фізіологічному розчині pH 7,9, висівання на модифіковане поживне середовище Лімінга-Нотмана, яке містить пептон, D-глюкозу, бичачу жовч, дріжджовий екстракт, гліцерол моностеарат, гліцерол, олеїнову кислоту, Твін 20, Твін 40, Твін 80, молоко коров'яче, антибіотики левоміцетин, гентаміцин, цефазолін, агар-агар, pH 5,5-6,5.

Для визначення генетичних особливостей було ампліфіковано внутрішні транскрибовані спейсери гену рибосомальної РНК 18S---ITS1---5,8---ITS2. Амплікон був секвенований. Визначенні нуклеотидні послідовності його при порівнянні з базою даних НЦБІ США, виявили 99% збігу, що дозволяє ідентифікувати штам, як *M. sympodialis*, але 1% генетичного матеріалу відрізняється від класичного зареєстрованого штаму, що обумовлює появу нових властивостей. Так, в позиціях 36 та 72 первинної структури внутрішніх транскрибованих спейсерів гену рибосомальної РНК реєструються нуклеотиди, які не зустрічаються в жодній депонованій культурі *M. sympodialis*, у тому числі *M. sympodialis* ATCC 42132.

Штам було одержано від хворої Б., №97, 19 років, жінка, діагноз "атопічний дерматит", яка хворіє з дитинства. Скарги на висип по всьому тілу, свербіж. Зразки для культивування грибів "змив зі шкіри" були одержані за допомогою стерильного вологого мікробіологічного зонду зі скла, гомогенізовано у 0,5 мл стерильного 0,05% розчину Тритону X-100 у фізіологічному розчині pH 7,9, висіяні на модифіковане поживне середовище Лімінга-Нотмана, яке містить пептон, D-глюкозу, бичачу жовч, дріжджовий екстракт, гліцерол моностеарат, гліцерол, олеїнову кислоту, Твін 20, Твін 40, Твін 80, молоко коров'яче, антибіотики левоміцетин, гентаміцин, цефазолін, агар-агар, pH 5,5-6,5. Перші ознаки росту грибів були виявлені на 10 добу. Ідентифікацію грибів здійснювали на підставі вивчення морфологічних, культуральних, біохімічних та молекулярно-генетичних властивостей. Штам характеризується такими ознаками та властивостями: За даними мікроскопічних досліджень дріжджові клітини кулястої, овоїдної форми, розміром 2-6 мікронів, грампозитивні. Колонії на модифікованому середовищі Лімінга-Нотмана, сферичної форми, кольору слонової кістки, розміром 2-4 мм. Штам, що виділений, не росте на середовищі Сабуро, росте на модифікованому середовищі Диксона при t32°C, t37°C, t40°C, каталазопозитивний, не розщеплює Кремофор EL, розщеплює ескулін, утилізує Твін 40, Твін 80, не утилізує Твін 20. Родову приналежність визначали за допомогою полімеразно ланцюгової реакції (ПЛР), а видову приналежність ідентифікували за допомогою ампліфікації та наступного секвенування внутрішніх транскрибованих спейсерів гену рибосомальної РНК 18S---ITS1---5,8---ITS2 для визначення послідовності нуклеотидів. Секвенування було прове-

дено фірмою "Пінні" (РФ, Москва) на секвенаторі ABI Prism Genetic Analyzer 3100 фірми Applied Biosystems. Дані приведені у графіку (див. Рис.). Порівняння з базою даних Національного центру біотехнологічної інформації США, виявили 99% збігу, що дозволяє ідентифікувати штам, як *M.symphodialis*, але в позиціях 36 та 72 первинної структури гену рибосомальної РНК реєструються нуклеотиди, які не зустрічаються в жодній депонованій культурі *M.symphodialis*, у тому числі *M.symphodialis* ATCC 42132, що свідчить про унікальні властивості регіонального штаму *M.symphodialis* 97.

Штам стабільно зберігає антигенні властивості в процесі пасажу його на модифікованому поживному середовищі Лімінгу-Нотмана. При електрофорезі в поліакриламідному гелі екстракту із штаму *M.symphodialis* було виявлено не менш ніж 13 білкових фракцій, що є характерним для *M.symphodialis* [Limacher A., Glaser A.G., Meier C, Schmid-Grendelmeier P., Zeller S., Scapozza L. and Cramer R. Cross-reactivity and 1.4. - A crystal structure of *Malassezia sympodialis* thioredoxin (Mala

s 13), a member of a new pan-allergen family // J. Immunol. - 2007. - Vol.178, №3. - P.389-396]. Це дозволяє одержати високоактивні імунні сироватки та специфічний сумарний антиген для приготування діагностичних тест-систем для діагностики АД. Для перевірки антигенних властивостей штаму було визначено в сироватці хворого на АД вміст специфічних антитіл класу IgG, за допомогою ІФА.

Специфічність штаму ілюструє наступний приклад:

Приклад. Хворий Х., чоловік, 45 років, історія хвороби №484, діагноз "атопічний дерматит в стадії загострення". З його шкіри було виділено *Malassezia furfur*. Враховуючи те, що *M.symphodialis* містить не тільки видо-, але й родиноспецифічні антигени, сумарний екстракт *M.symphodialis* 97 був використаний в якості антигену. У сироватці цього хворого були виявлені специфічні IgG антитіла в титрах 4,5 од/мл, що співпадає за даними літератури (>0,35-70,0 од/мл) з відповідними показниками, коли застосовували для визначення IgG специфічних антитіл у хворих на АД екстракт *M.symphodialis* ATCC 42132.

### Штам малассезій *Malassezia sympodialis* 97

```
>gb|AY743632.1| Malassezia sympodialis strain CBS 7222 18S
ribosomal RNA gene,
partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal
RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete
sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence
Length=621
```

```
Score = 1027 bits (556), Expect = 0.0
Identities = 561/563 (99%), Gaps = 2/563 (0%)
Strand=Plus/Plus
```

```
Query 2 AACACGTCTCTGGCGCCCATCACTATATCCATACC-ACCCCTGTGCACTGTGATGACGAA 60
      |||
Sbjct 40 AACACGTCTCTGGCGCCCATCACTATATCCATACCACCCCTGTGCACTGTGATGACGAA 99
Query 61 TGTCAATCGAAC-AAAAAACTCGTATGGTTGAATGTACGTGAAATGTAGGTATAGCCTA 119
      |||
Sbjct 100 TGTCAATCGAACAAAAAACTCGTATGGTTGAATGTACGTGAAATGTAGGTATAGCCTA 159
Query 120 CGAACTATACACAACCTTCGACAACGGATCTCTTGGTTCTCCCATCGATGAAGAACGCAG 179
      |||
Sbjct 160 CGAACTATACACAACCTTCGACAACGGATCTCTTGGTTCTCCCATCGATGAAGAACGCAG 219
Query 180 CGAAACGCGATAGGTAATGTGAATTCGAGAATCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCA 239
      |||
Sbjct 220 CGAAACGCGATAGGTAATGTGAATTCGAGAATCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCA 279
Query 240 CCTTGCGCTCCATGGTATTCGTGGAGCATGCCGTGTTGAGTGCCGCGAATCTCCCTCC 299
      |||
Sbjct 280 CCTTGCGCTCCATGGTATTCGTGGAGCATGCCGTGTTGAGTGCCGCGAATCTCCCTCC 339
Query 300 CCTTACGGTGGCCGAAAGGCCGAAGTAGGGCGGACGGGTAGGATGGGTGTTGCTGCCTG 359
      |||
Sbjct 340 CCTTACGGTGGCCGAAAGGCCGAAGTAGGGCGGACGGGTAGGATGGGTGTTGCTGCCTG 399
Query 360 GGGATTGTACCAGGCTCGCCCGAAATGCATAAGCGCCAGGACCCCTCGCTACCGCTCTCTA 419
      |||
Sbjct 400 GGGATTGTACCAGGCTCGCCCGAAATGCATAAGCGCCAGGACCCCTCGCTACCGCTCTCTA 459
Query 420 GGGAAGAGTGGCTAAGCGACCGCTGAGCATGGCATGATACGTCATTTGCTGTGTGGGC 479
      |||
Sbjct 460 GGGAAGAGTGGCTAAGCGACCGCTGAGCATGGCATGATACGTCATTTGCTGTGTGGGC 519
Query 480 GGCCGGTTGGAGAGGTGTCTGCTTTACGAGCCCTTTTAAATCTGGTCTCAAATCAGGT 539
      |||
Sbjct 520 GGCCGGTTGGAGAGGTGTCTGCTTTACGAGCCCTTTTAAATCTGGTCTCAAATCAGGT 579
Query 540 AGGATCACCCGCTGAACCTAAGC 562
      |||
Sbjct 580 AGGATCACCCGCTGAACCTAAGC 602
```

Рис.

