

КЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 577.175

©Коллектив авторов

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДА ПЦР РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ НЕСКОЛЬКИХ ВИДОВ ПРОПИОНОВЫХ БАКТЕРИЙ, ОБИТАЮЩИХ НА КОЖЕ ЧЕЛОВЕКА

А.Г. Глоба^{1*}, Я.И. Алексеев¹, В.Г. Арзуманян², В.А. Заборова³, А.А. Гуридов²

¹ГНУ ВНИИ сельскохозяйственной биотехнологии Россельхозакадемии,
127550 Москва, ул. Тимирязевская, 42; эл. почта: aggloba@mail.ru

²ФГБУ НИИ Вакцин и сывороток им. Мечникова РАМН, Москва

³Кафедра лечебной физкультуры и спортивной медицины ГБОУ ВПО Первый
МГМУ им. И.М. Сеченова Минздравсоцразвития России, Москва

Разработана тест-система для определения видового состава пропионовых бактерий, обитающих на коже человека. Данная система создана в формате ПЦР реального времени и позволяет количественно и одновременно определять геномы бактерий *Propionibacterium* видов *P. acnes*, *P. granulosum* и *P. avidum*. Для демонстрации работы тест-системы были исследованы смывы с участков кожи 17 спортсменов-пятиборцев и группы контроля, состоящей из 16 студентов. Было установлено, что у всех участников исследования на коже присутствовали все три вида пропионовых бактерий, причём обсеменённость *P. acnes* в группе контроля была в 2 раза выше по сравнению с группой спортсменов-пятиборцев.

Ключевые слова: полимеразная цепная реакция, пропионовые бактерии, микробиота.

ВВЕДЕНИЕ. Наиболее многочисленной группой микроорганизмов, населяющих кожу человека, являются пропионовые бактерии, причём они представлены тремя видами рода *Propionibacterium* – *P. acnes*, *P. granulosum* и *P. avidum* [1]. *P. acnes* в единичных количествах обитают на коже новорождённых, но в период полового созревания их количество резко возрастает до 1 млн на 1 см². Живут в основном на лице и открытых частях тела. В богатой липидами микросреде волосяных фолликул *P. acnes* производят медиаторы воспаления. Это приводит к появлению папул, угревой или узловой сыпи, характерной для воспалительного акне. *P. granulosum* обнаруживается на тех же участках тела, что и *P. acnes*, но в количестве примерно в 10 раз меньшем. Оба типа бактерий можно обнаружить в желудочно-кишечном

* - адресат для переписки

тракте. *P. avidum* обитает в подмышечных впадинах и других влажных участках тела и его количество возрастает в период половой зрелости. Пропионовые бактерии наиболее изучены из-за их способности вызывать заболевание акне вульгарис, однако имеются сведения, что эти бактерии могут участвовать в возникновении и других инфекционных заболеваний, таких как абсцессы лёгких [2], стоматологические инфекции, эндокардиты, олигоартриты [3] и др.

Пропионовые бактерии – это медленно растущие неспорообразующие грамм-положительные анаэробные бактерии. Для выращивания их в культуре требуется как минимум 6 дней [4]. В связи с тем, что пропионовые бактерии образуют агломераты, а описанные в литературе “селективные” среды не обеспечивают действительно селективного выделения чистых культур, встал вопрос об альтернативном методе идентификации. Целью настоящего исследования являлась разработка тест-системы в формате ПЦР реального времени для количественной оценки видового разнообразия пропионовых бактерий, присутствующих на коже человека.

МЕТОДИКА.

Объект исследования. Объектом исследования служили образцы смывов с участков кожи 17 спортсменов-пятиборцев (возраст $23,1 \pm 2,6$ лет) и группы контроля, включавшей 16 студентов (возраст $22,9 \pm 0,8$ лет), давших информированное согласие на участие в данном исследовании. Сбор образцов проводили с участка кожи середины груди площадью 9 см² путём растирания этого участка стерильным ватным тампоном, смоченным щелочным фосфатным буфером.

Выделение бактериальной ДНК. ДНК выделяли при помощи набора ДНК-экстрактов EX-509 (“Синтол”, Россия). Суспензию бактериальных клеток (100 мкл) помещали в пластиковые пробирки объёмом 1,5 мл. Перед началом выделения для контроля степени выхода РНК в образцы вносили 5×10^4 копий плазмиды Ptgt 2 в 5 мкл 10 мМ Трис-НСl буфера (рН 8,0). Лизис клеток осуществляли с помощью 300 мкл 1% раствора SDS, содержащего 20 мМ Трис-НСl буфера (рН 8,0), 75 мМ NaCl и 25 мМ Na₂EDTA в течение 10 мин при комнатной температуре. Осаждение белков производили 100 мкл 7,5 М NH₄(CH₃COO⁻) с последующим центрифугированием 12000 g × 2 мин. Супернатант переносили в чистые пластиковые пробирки и ДНК осаждали равным объёмом изопропанола центрифугированием при 12000 g × 2 мин при комнатной температуре. Осадок ДНК промывали 75% этанолом (12000 g × 2 мин) и высушивали в пробирках на воздухе при комнатной температуре до полного испарения спирта. ДНК растворяли в 100 мкл 10 мМ Трис-НСl буфера (рН 8,0) при 65°C в течение 5 мин. Полученный раствор ДНК использовали для количественного ПЦР.

Подбор праймеров и гибридизационных проб TagMan. Подбор праймеров осуществлялся с использованием ресурсов NCBI. Были выявлены отличия в последовательностях фрагментов 16s РНК соответственно для *P. acnes*, *P. granulosum* и *P. avidum*. Далее с помощью поисковой программ Primer-Blast и Primer 3 Input были подобраны праймеры и пробы с последовательностями, исключаяющими перекрывание и перекрёстную амплификацию (табл. 1). Использование различных флуоресцентных красителей позволяло одновременно количественно определять все три типа пропионовых бактерий (табл. 2). Для количественного определения плазмиды Ptgt 2 со вставкой уникальной последовательности использовались специфические праймеры и проба, меченная флуоресцентным красителем Cy5. Необходимые олигонуклеотиды были синтезированы фирмой “Синтол” (Россия).

Таблица 1. Последовательности праймеров и гибридизационных проб, использованные в тест-системе.

Название	Последовательность 5' – 3'
<i>acne</i> f	GCG TGA GTG ACG GTA ATG GGT A
<i>acne</i> re	TTC CGA CGC GAT CAA CCA
<i>acne</i> probe	FAM-AGC GTT GTC CGG ATT TAT TGG GCG-BHQ1
<i>granulosum</i> f	ACA TGG ATC CGG GAG CTT C
<i>granulosum</i> re	ACC CAA CAT CTC ACG ACA CG
<i>granulosum</i> probe	R6G-CGG TTC ACA GGT GGT GCA TTG GC-BHQ2
<i>avidum</i> f	GTC TGC AAC TCG ACC CCA T
<i>avidum</i> re	AGT CCT AAT TAC CAG TCC CAC
<i>avidum</i> probe	ROX-ACC TGT GTG GGG GAG CCG TCG AAG-BHQ2
<i>Ptgt-2</i> f	AGA ACT CTG AGC GCT AGC TGT AG
<i>Ptgt-2</i> re	CGT AGA ACT AGC TGT AGC GCA
<i>Ptgt-2</i> probe	Cy5-AG CGG CTC CTA CTT CTG CAG GGG-BHQ2

Таблица 2. Цветовые каналы флуорофоров и гасителей.

Определение	Флуорофор/гаситель	Фильтры λ возбуждение/флуоресценция, нм
<i>P. acne</i>	FAM/ BHQ1	485/520
<i>P. granulosum</i>	R6G/ BHQ2	530/560
<i>P. avidum</i>	ROX/ BHQ2	580/620
ВПК (плазмида)	Cy5/ BHQ2	630/670

ПЦР с детекцией продуктов в режиме реального времени. Для проведения реакции готовили основную смесь, содержащую следующие компоненты: 100 мкл 2,5-кратного буфера для ПЦР (500 mM KCl, 150 mM Трис-НСl, pH 8,8, 0,5% глицерин, 0,1% Tween 20, 2,5 mM смеси дезоксинуклеозидтрифосфатов dNTP, 6,25 mM MgCl₂), 5 мкл Taq-полимеразы с ингибирующими активностью антителами 5 Ед/мкл, по 10 мкл праймеров (конечная концентрация 0,20 мкМ) и 5 мкл зондов (конечная концентрация 0,12 мкМ) и деионизированной воды до общего объёма 200 мкл. В пробирки для ПЦР объёмом 200 мкл помещали по 5 мкл образцов ДНК и 20 мкл основной смеси. ПЦР РВ осуществляли в приборе АНК-32 (Институт аналитического приборостроения РАН, Россия) в следующих условиях: плавление ДНК и активация Taq-полимеразы – 95°C, 180 с – 1 цикл; (отжиг

МЕТОД ПЦР РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПРОПИОНОВЫХ БАКТЕРИЙ

праймеров и элонгация цепей ДНК – 60°C, 40 с + плавление – 95°C, 15 с) – 45 циклов. Критический цикл и исходное количество копий ДНК определяли с помощью компьютерной программы, поставляемой вместе с прибором. Для построения калибровочных прямых использовались растворы олигонуклеотидов-ампликонов, синтезированные для каждого типа исследуемых бактерий имеющие известные концентрации 10^3 – 10^6 копий/мкл. Полученные результаты нормировали по проценту выхода РНК, который определяли исходя из выхода плазмиды Ptgt-2, исходно добавленной в образцы. Количество бактериальных клеток в образце рассчитывалось с учётом известного количества копий оперона 16s РНК (3 копии на клетку) [5] и представлялось в виде количества клеток в 100 мкл образца.

Для определения состояния барьерной функции кожи были измерены уровень влажности поверхностных слоев кожи и определено содержание липидов на поверхности кожи с помощью прибора “Skin-o-mat” производства фирмы “Cosmomed GmbH” (Германия).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Частота выявления всех трёх видов пропионовых бактерий в указанной зоне кожи, как у спортсменов, так и в контрольной группе составила 100% (табл. 3). Это не согласуется с данными литературы, полученными традиционными методами, где данный показатель для *P. acnes* варьировал от 46 до 100%, для *P. granulosum* – от 0 до 85%, а *P. avidum* – от 0 до 52% [1]. Подобное несоответствие объясняется тем, что традиционные методы базируются на культивировании, то есть определяют только живые, колониеобразующие бактерии. Предлагаемый же метод определяет геном как живых, так и погибших микроорганизмов [5]. По нашим данным обсеменённость (медианы) составляла: в группе спортсменов - *P. acnes* – $1,6 \times 10^5$ клеток/см², *P. granulosum* – $9,4 \times 10^2$ клеток/см², *P. avidum* – $5,8 \times 10^4$ клеток/см²; в группе контроля - *P. acnes* – $3,8 \times 10^5$ клеток/см², *P. granulosum* – $9,4 \times 10^2$ клеток/см², *P. avidum* – $7,7 \times 10^4$ клеток/см². В контрольной группе данный показатель превосходил таковой в группе спортсменов в 2 раза только в случае *P. acnes*. Важно, что в отличие от данных литературы, разброс значений по сравнению с медианой был незначительным. Никаких значимых корреляционных зависимостей между обилием пропионовых бактерий и влажностью/себумом в обеих группах отмечено не было.

Таблица 3. Обсеменённость (медианы) контрольной группы и спортсменов-пятиборцев.

Определение	Контрольная группа, клеток/см ²	Спортсмены, клеток/см ²
<i>P. acne</i>	$3,8 \times 10^5$	$1,6 \times 10^5$
<i>P. granulosum</i>	$9,4 \times 10^2$	$9,4 \times 10^2$
<i>P. avidum</i>	$7,7 \times 10^4$	$5,8 \times 10^4$

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Предлагаемый нами метод исследования субпопуляционного состава пропионовых бактерий имеет свои особенности. Определяется геном бактерий независимо от их жизнеспособности. На наш взгляд, это даёт дополнительные возможности в оценке состояния кожной микробиоты. Это особенно важно в свете новой концепции, согласно которой

кожная микробиота человека является компонентом иммунной системы [6] Известно, что состав кожной микрофлоры индивидуален для каждого человека [7]. Количество пропионовых бактерий и их популяционный состав варьирует в зависимости от возраста, пола и исследуемого района кожи [5]. Вместе с тем кожная микрофлора постоянно подвергается воздействию солнечного ультрафиолета и гигиенических процедур, что мешает корректно определить её истинный видовой состав. Метод ПЦР реального времени даёт более постоянную картину этого состава, так как исключает различные факторы, приводящие к массовой гибели бактерий.

ВЫВОДЫ.

1. Метод ПЦР реального времени позволяет определить видовой состав пропионовых бактерий на коже человека.

2. В отличие от методов культивирования, метод ПЦР реального времени выявил присутствие всех трёх видов бактерий рода *Propionibacterium* у 100% испытуемых.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации в рамках выполнения ФЦП “Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007-2012 годы” ГК № 16.552.11.7023 от 29 апреля 2011 г. на оборудовании ЦКП "ВНИИСБ".

ЛИТЕРАТУРА

1. Нобл У.К. (1986) Микробиология кожи человека (пер. с англ.), Медицина, М.
2. Mandell G.I., Bennett J.E., Dolin R. (2005) Principles and Practice of Infectious Diseases. 6th ed. NY:Churchill Livingstone.
3. Delyle L.G., Vittecoq O., Bourdel A., Duparc F., Michot C., Le Loet X. (2000) Arthritis Rheum., **43**(12), 2843-2847.
4. Levy P.Y., Fenollar F., Stein A. (2008) Clin. Infect. Dis., **46**, 1884-1886.
5. Miura Y., Ishige I., Soejima N., Suzuki Y., Uchida K., Kawana S., Eishi Y. (2010) J. Med. Dent. Sci., **57**, 65-74.
6. Cogen A.L., Nizet V., Gallo R.L. (2008) Br. J. Dermatol., **158**, 442-455.
7. Evans C.A. (1975) J. Invest. Dermatol., **64**, 42-46.

Поступила: 22. 05. 2012.

THE USE OF REAL TIME PCR FOR QUANTITATIVE DETERMINATION
OF SOME PROPIONIC BACTERIA RESIDING ON HUMAN SKIN

A.G. Globa¹, Y.I. Alekseev¹, V.G. Arzumanyan², V.A. Zaborova³, A.A. Guridov²

¹Institute of Agricultural Biotechnology, Russian Academy of Agricultural Sciences,
Timiryazevskaya ul., 42, Moscow, 127550 Russia; e-mail: aggloba@mail.ru

²Mechnikov Institute of Vaccines and Sera, Russian Academy of Medical Sciences,
Moscow, Russia

³Sechenov Moscow State Medical University, Moscow, Russia

A test system has been developed for determination of propionic bacterial species residing on human skin. This system developed in the real time PCR format is applicable for quantitative determination and also detection of genomes of the following *Propionibacterium* species: *P. acnes*, *P. granulosum* and *P. avidum*. This system was used for analysis of wash samples from the skin of 17 pentathlon sportsmen and 16 students. All three species of propionic bacteria were found in all skin wash samples. However, contamination with *P. acnes* was two times higher in control group than in the group of pentathlon sportsmen.

Key words: polymerase chain reaction, propionic bacteria, microbiota.