

# Ispitivanje osjetljivosti sojeva gljivice *Malassezia pachydermatis* na mikonazol metodom mikrodilucij

---

Mohorović, Nikola

Master's thesis / Diplomski rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Veterinary Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Veterinarski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:178:436710>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-09**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Veterinary Medicine -  
Repository of PHD, master's thesis](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
VETERINARSKI FAKULTET

Nikola Mohorović

Ispitivanje osjetljivosti sojeva gljivice *Malassezia pachydermatis* na mikonazol metodom  
mikrodilucije

Diplomski rad

Zagreb, 2023.

Ovaj rad izrađen je na Zavodu za mikrobiologiju i zarazne bolesti s klinikom Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Predstojnik: izv. prof. dr. sc. Vilim Starešina

Mentorica: izv. prof. dr. sc. Suzana Hađina

Članovi Povjerenstva za obranu diplomskog rada:

1. Izv. prof. dr. sc. Josipa Habuš
2. Doc. dr. sc. Matko Perharić
3. Izv. prof. dr. sc. Suzana Hađina
4. Prof. dr. sc. Vilim Starešina (zamjena)

## ZAHVALE

*Najljepše zahvaljujem svojoj mentorici, izv. prof. dr. sc. Suzani Hadini na pruženoj prilici i ukazanom povjerenju za izradu ovog rada. Najviše se zahvaljujem na prenešenom znanju i svim dragocijenim savjetima, ali i strpljenju te svom uloženom vremenu.*

*Veliko hvala dr. sc. Vesni Mojčec dipl. ing. mol. biol. na uloženom trudu i prenesenom znanju, dobroj volji i pristupačnosti prilikom obavljanja laboratorijskog dijela ovog rada.*

*Također se zahvaljujem dr.med.vet. Ivi Benvin na ideji za temu ovog diplomskog rada.*

*Zahvaljujem se i Petri Pavečić na nesebičnom dijeljenju savjeta te uvijek spremnoj volji za pomoć u laboratoriju.*

*I na kraju najveća zahvala mojoj obitelji i prijateljima koji su vjerovali u mene i kada ja nisam.*

## POPIS I OBJAŠNENJE KRATICA

SA – Sabouraudov agar

IgE – imunoglobulin E

MCZ – mikonazol

CLSI – (eng. *Clinical and Laboratory Standards Institute*) – Institut za kliničke i laboratorijske standarde

EUCAST – (eng. *European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing*) – Europski odbor za istraživanje antimikrobne osjetljivosti

MIK – minimalna inhibitorna koncentracija

RPMI – Roswell Park Memorial Institute medij

CFU/mL – (eng. *Colony forming units per milliliter*) – broj kolonija u mililitru

MOPS – (eng. *3-(N-morpholino)-propane sulfonic acid*) – 3-(N-morfolino)-propansulfonska kiselina

SAA – Sabouraudov agar s dodatkom aktidiona

PBS – (eng. *phosphate buffered saline*) – fiziološka otopina puferirana fosfatom

DMSO – (eng. *dymethyl sulfoxide*) – dimetil sulfoksid

McF – McFarland jedinica

MIK50 – minimalna inhibitorna koncentracija potrebna za inhibiciju  $\geq 50\%$  ispitanih sojeva

MIK 90 – minimalna inhibitorna koncentracija potrebna za inhibiciju  $\geq 90\%$  ispitanih sojeva

## POPIS PRILOGA

### Popis tablica

Tablica 1. Usporedba standardiziranih postupaka mikrodilucije u bujonu korištenih za ispitivanje osjetljivosti gljivica roda *Candida* na azole (prilagođeno iz ALASTRUEY-IZQUIERDO i sur., 2015.)

Tablica 2. Sastav hranjivih podloga

Tablica 3. Sastav obogaćenog Sabouraud bujona i PBS otopine za pripremu suspenzije inokuluma

Tablica 4. Prikaz rezultata kontrole gustoće suspenzije inokuluma

Tablica 5. Prikaz raspona MIK vrijednosti za 40 istraženih sojeva *M. pachydermatis*

Tablica 6. Prikaz statističkih podataka MIK vrijednosti istraženih sojeva *M. pachydermatis*

### Popis slika

Slika 1. Shematski prikaz priređivanja radnih koncentracija mikonazola

Slika 2. Prikaz kontrole gustoće suspenzije inokuluma na SA hranjivoj podlozi nakon nacijepljivanja radne suspenzije inokuluma te inkubacije pri 37°C: a) porast kolonija *M. pachydermatis* nakon 72 sata; b) porast kolonija ATCC soja *C. parapsilosis* nakon 24 sata

### Popis grafikona

Grafikon 1. Prikaz podrijetla uzoraka s obzirom na vrstu životinje

Grafikon 2. Prikaz podrijetla uzoraka pasa s obzirom na anatomsko mjesto uzorkovanja

Grafikon 3. Prikaz podrijetla uzoraka mačaka s obzirom na anatomsko mjesto uzorkovanja

## SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. PREGLED REZULTATA DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA .....	2
2.1. Etiologija.....	2
2.2. Epizootiologija .....	4
2.3. Patogeneza .....	5
2.4. Kliničke slike infekcija uzrokovanih gljivicom <i>M. pachydermatis</i> .....	6
2.4.1. Klinička slika u pasa .....	6
2.4.2. Klinička slika u mačaka .....	7
2.5. Dijagnostika .....	8
2.6. Liječenje.....	9
2.7. Rezistencija .....	10
2.9. Metode ispitivanja osjetljivosti .....	11
2.7. Javno zdravstvo .....	15
3. MATERIJALI I METODE.....	16
3.1. Pribor i oprema.....	16
3.2. Uzgoj sojeva gljivica <i>M. pachydermatis</i> .....	17
3.3. Mikrodilucija u bujonu .....	18
3.4. Priprema radnih otopina mikonazola.....	19
3.5. Priprema suspenzije inokuluma gljivice <i>M. pachydermatis</i> .....	21
3.6. Priprema mikrotitracijskih ploča za mikrodiluciju u bujonu .....	22
3.7. Kontrola gustoće suspenzije inokuluma (CFU/mL).....	23
3.8. Kontrola kvalitete postupka mikrodilucije.....	23
3.9. Očitavanje rezultata .....	24
4. REZULTATI .....	25
4.1. Istraživani sojevi gljivice <i>M. pachydermatis</i> .....	25
4.2. Rezultati kontrole gustoće suspenzije inokuluma .....	27

4.3. Rezultati postupka mikrodilucije u bujonu .....	28
4.4. Rezultati kontrole kvalitete postupka .....	29
5. RASPRAVA .....	30
6. ZAKLJUČCI.....	36
7. LITERATURA .....	37
8. SAŽETAK .....	47
9. SUMMARY .....	48
10. ŽIVOTOPIS.....	49



## 1. UVOD

Vrsta *Malassezia pachydermatis* kvascu je slična gljivica koja na koži i sluznicama životinja obitava kao komenzal. Njezin najčešći domaćin je pas, a potom mačka (GUILLOT i BOND, 2020.). Uz određene predisponirajuće čimbenike te poremećaje u ravnoteži okoliša u kojem ona obitava, odnosno koži, stvaraju se uvjeti pogodni za prekomjerno umnažanje ove gljivice, poput povećane količine vlage na koži, povećane proizvodnje sebuma, oštećenja zaštitne barijere kože te prenaplašenog imunskog odgovora organizma. U takvim uvjetima ova oportunistički patogena gljivica postane patogena te kao takva najčešće uzrokuje upalu vanjskog zvukovoda ili upalu kože (PEANO i sur., 2020.). Pri liječenju sekundarnih infekcija uzrokovanih vrstom *M. pachydermatis* najviše se koriste topikalni i/ili sistemski antimikotici, od kojih najviše oni iz skupine azola (BOND i sur., 2010.). Lokalno liječenje preparatima koji sadrže azole poput mikonazola (MCZ) uspješno rješava infekciju, no uz primjenu antimikotika potrebno je dijagnosticirati i liječiti primarne upalne procese koji su omogućili pretjerano umnažanje i patogeno djelovanje ove gljivice. Propust u navedenome dovodi do neuspjeha u liječenju, a posljedično tome do kroničnog tijeka bolesti i recidivirajućih infekcija koje se opetovano liječe istim preparatima (GUILLOT i BOND, 2020.). Rezultati istraživanja ukazuju da dugoročna terapija antimikoticima kao i neadekvatno liječenje sistemskom primjenom niskih doza antimikotika mogu dovesti do razvoja rezistencije u ove gljivice. Navedeno ukazuje na sve veću potrebitost ispitivanja osjetljivosti sojeva ove gljivice u svrhu odabira odgovarajućeg antimikotika u liječenju infekcija uzrokovanih ovom gljivicom (PEANO i sur., 2020., RHIMI i sur., 2020.).

Cilj ovog rada bio je ispitati osjetljivost različitih sojeva *M. pachydermatis* modificiranom metodom mikrodilucije na derivat azola mikonazol, najčešće upotrebljavan antimikotik namijenjen za lokalnu primjenu u formulaciji šampona koji se koriste u terapiji pasa s atopijskim dermatitisom ili kapi za uši koje se koriste u terapiji upale vanjskog zvukovoda.

## 2. PREGLED REZULTATA DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA

### 2.1. Etiologija

Rod *Malassezia* čine jednostanični gljivični organizmi koji kao komenzali obitavaju na koži brojnih toplokrvnih životinja. Spadaju u porodicu *Malasseziaceae*, red *Malasseziales*, razred *Malasseziomycetes*, podkoljeno *Usilaginomycota* te koljeno *Basidiomycota* (PARK i sur., 2021.). Smatra se da su podrijetlom od predaka koji su obitavali na tlu i/ili biljkama te se postepeno prilagodile ekosustavu kože toplokrvnih kralježnjaka (XU i sur., 2007.). Trenutno je poznato 18 vrsta iz navedenog roda. Od najveće važnosti za veterinarsku medicinu je vrsta *M. pachydermatis* koja je najučestalija na koži kućnih ljubimaca poput pasa i mačaka (PARK i sur., 2021.).

Najvažnije osobine koje ih povezuju s pripadajućim koljenom *Basidiomycota* su građa stanične stijenke te način pupanja. Stanična stijenka je debela te višeslojne građe (GUÉHO-KELLERMANN i sur., 2010.) i čini čak 26 do 37% ukupnog staničnog volumena. Njezina unutarnja površina sadrži brojne nabore koji odgovaraju invaginacijama stanične membrane (CHEN i sur., 2005.). Pupanje je monopolarno, odnosno nastaje iz jednog mjesta na staničnoj stijenci roditeljske stanice. Mikroskopski se lako uočava zbog tipičnog izgleda stanice pri pupanju. Ono nastaje zbog povezanosti stanice kćeri s matičnom stanicom širokom osnovom te daje izgled boce (GUÉHO-KELLERMANN i sur., 2010.).

Specifičnost ovog roda uočava se u građi genoma koji je po svojoj veličini upola manji od ostalih gljivica pripadajućeg koljena. Analizom gena otkrivene su jedinstvene osobine koje ponajprije zahvaćaju metabolizam ovih kvasaca te objašnjavaju njihov afinitet prema lipidima. Naime, oni kodiraju brojne enzime poput lipaza, fosfolipaza i sfingomijelaza (BOND i sur., 2020.). S druge strane, velika skupina gena potrebnih za razgradnju ugljikohidrata nedostaje u genomu. Stoga su glavni izvor ugljika, odnosno energije za gljivice iz roda *Malassezia* upravo masti. Navedeno je povezano s okolišem kože koje je siromašno ugljikohidratima, ali bogato mastima (WU i sur., 2015.). Zanimljivo je i to što iako filogenetski nisu povezani s rodom *Candida*, sastav enzima koje proizvode vrlo im je sličan te prilagođen katabolizmu masti i proteina (THEELEN i sur., 2019.). Najistaknutije svojstvo genoma je nedostatak gena koji kodiraju enzime potrebne za sintezu dugolančanih masnih kiselina. To čini ove gljivice ne samo lipofilnima, već ovisnima o izvorima lipida iz vanjskog okoliša. Sve navedeno govori u prilog tome da se ovaj rod gljivica evolucijski prilagodio specifičnoj ekološkoj niši - kožnom

ekosustavu toplokrvnih kralježnjaka u kojem dobivaju i iskorištavaju potrebne masne kiseline, odnosno hranu (BOND i sur., 2020.).

Gljivica *M. pachydermatis* po prvi puta je izdvojena s kože indijskog nosoroga s kliničkom slikom generaliziranog ekfolijativnog dermatitisa. Ime je dobila upravo po navedenom nosorogu koji je u vrijeme otkrića spadao u red *Pachydermata* (FOX, 1925.). Na koži i sluznicama djeluje kao komenzal, ali i kao potencijalno oportunistički patogen (BOND i sur., 2020.). U prošlosti se smatrala lipofilnom, ali ne i vrstom čiji je rast ovisan o izvoru zasićenih masnih kiselina te se tim svojstvom izdvajala od ostalih vrsta pripadajućeg roda. Razlog takvoj teoriji bila je njezina sposobnost rasta na Sabouraud agaru (SA) koji ne sadržava lipide, zbog čega nije moguće na takvoj hranjivoj podlozi izdvojiti ostale vrste pripadajućeg roda čiji je rast ovisan o izvoru nezasićenih masnih kiselina (GUILLOT i BOND, 1999.). Za izdvajanje i uzgoj vrsta ovisnih o mastima potrebne su obogaćene hranjive podloge kao što su Dixon, Leeming i Notman koje nisu komercijalno dostupne već se priređuju u laboratoriju prema posebnim recepturama. One sadrže različite izvore dugolančanih masnih kiselina, odnosno lipida zahvaljujući volovoj žuči, glicerolu te polisorbitima Tween (40 i 60) koji se nalaze u njihovim sastavima (GUÉHO-KELLERMANN i sur., 2010.). Sekvenciranjem genoma utvrđeno je kako i vrsti *M. pachydermatis* nedostaju geni za sintezu dugolančanih masnih kiselina. Razlog zbog kojeg ona ipak uspijeva rasti na SA hranjivoj podlozi je jedinstvena sposobnost iskorištavanja lipidne frakcije peptona kao vanjski izvor esencijalnih masnih kiselina (PUIG i sur., 2017.). Naime, pepton koji je sastavni dio SA hranjive podloge sadrži 0,6% lipida, od kojih 6 µg palmitinske kiseline i 1 g peptona te manje količine ostalih masnih kiselina. Upravo bi zbog ovih razloga trebalo smatrati i ovu vrstu ovisnom o mastima (WU i sur., 2015.). Usprkos navedenoj osobini koja izdvaja vrstu *M. pachydermatis* od ostalih vrsta iz roda *Malassezia*, važno je napomenuti da je i u nje utvrđen slabiji rast na SA hranjivoj podlozi. Naime, u istraživanju HUANG i sur. (1993.) opisana su dva fenotipa gljivice *M. pachydermatis*. Prvi fenotip koji je najčešće izdvojen iz vanjskog zvukovoda i kože pasa odlikuje uspješan rast na SA hranjivoj podlozi te prosječna veličina kolonija od 3 mm. Uz navedeni, opažen je i fenotip sojeva ove gljivice koje odlikuje slab rast na SA hranjivoj podlozi i formiranje manjih kolonija prosječne veličine od 1 mm. Istraživanje BOND i ANTHONY (1995.) potkrijepilo je navedena opažanja, ali i utvrdilo da nakon nekoliko precijepljivanja takvih sojeva na SA hranjivu podlogu fenotip malih kolonija poprima osobinu uspješnog rasta fenotipa velikih kolonija.

Kolonije gljivice *M. pachydermatis* kremasto su bijele do žućkaste boje, glatke do lagano naborane, bez sjaja te s cjelovitim ili režnjevitim rubom (BOND i sur., 2020.).

Inkubacija na SA hranjivoj podlozi traje tri do četiri dana pri 37°C. Stanice su elipsoidnog do kratko cilindričnog oblika, veličine 4-5x2-2,5 µm (GUÉHO-KELLERMANN i sur., 2010.).

## 2.2. Epizootiologija

Gljivica *M. pachydermatis* zoofilna je vrsta, odnosno prisutna je na koži brojnih sisavaca i ptica od kojih je najučestalija u pasa, a potom u mačaka (BOND i sur., 2020.). U zdravih pasa najveći broj ove gljivice izdvojen je iz vanjskog zvukovoda, perioralnog i interdigitalnog područja, dok se s ingvinalnog i aksilarnog područja te dorzalnog dijela trupa rjeđe izdvaja. Utvrđeno je da se veća koncentracija ove gljivice nalazi i u perianalnom području, a navedeno se smatra važnim za njezin prijenos s jedne jedinke na drugu (CAFARCHIA i sur., 2005.). Tome govori u prilog mišljenje da se kolonizacija odvija tijekom i neposredno nakon poroda načinima prijenosa sličnim onima u bakterije roda *Staphylococcus*, točnije u vrste *S. intermedius* (BOND i sur., 2020., SAIJONMAA-KOULUMIES i LLOYD, 2002.).

Najučestaliji je kvasac prisutan na koži zdravih pasa, ali i pasa s dermatitisom te upalom vanjskog zvukovoda (GUILLOT i BOND, 2020.). Potreban je primarni upalni proces kao predisponirajući čimbenik koji će dovesti do promjena u imunom odgovoru domaćina i/ili promjena u mikrokolišu kože te time omogućiti njezino prekomjerno umnažanje te nastanak sekundarne infekcije ovom gljivicom (CHEN i sur., 2005.). Promjene mikrokoliša kože koje pogoduju prekomjernom rastu ove gljivice su oštećenja epidermisa koji predstavlja prvu liniju obrane od vanjskih utjecaja, povećana količina vlage na koži te povećana proizvodnja sebuma koja osigurava izvore lipida na površini kože, a time i bogate izvore hranjivih tvari neophodnih za njihovo umnažanje (CHEN i sur., 2005., NIAE i sur., 2021., PEANO i sur., 2020.). Reakcije preosjetljivosti poput atopijskog dermatitisa i alergije na hranu jedni su od najčešćih primarnih uzroka infekcije. Uz njih valja napomenuti različite endokrine poremećaje (hipotireoidizam, hiperadrenokorticism, šećerna bolest), poremećaje keratinizacije, invazije parazitima (*Otodectes cynotis*, *Demodex* sp.) te autoimune bolesti. Dugotrajno liječenje glukokortikoidima ili antibioticima također se smatra predisponirajućim čimbenikom (CHEN i sur., 2005., PEANO i sur., 2020.). Nabori kože skloni razvoju intertriga te konformacijske abnormalnosti uške koje dovode do zadržavanja vlage i stenoze vanjskog zvukovoda također osiguravaju uvjete pogodne za prekomjerno umnažanje i razvoj sekundarne infekcije (PEANO i sur., 2020.).

Iako se vrsta *M. pachydermatis* rjeđe izdvaja iz kože mačaka u usporedbi s psima, ona i dalje predstavlja najprisutniju i najznačajniju gljivicu na koži mačaka (BOND i sur., 2020.).

Njezina prevalencija u mačaka s upalom vanjskog zvukovoda iznosi i do 60%, dok je u mačaka bez upale vanjskog zvukovoda ona znatno niža te iznosi od 17,6 do 23% (NIAE i sur., 2021.) Važno je također napomenuti da se u mačaka češće nego u pasa izdvajaju i ostale vrste roda *Malassezia*. Od njih, najviše se ističu vrsta *M. nana* najčešće izdvojena iz vanjskog zvukovoda te vrsta *M. sloofiae* s kože interdigitalnog područja (BOND i sur., 2020.).

Pasmine pasa predisponirane za razvoj atopijskog dermatitisa poput zapadnoškotskog bijelog terijera ili primarne idiopatske seboreje poput baset pasmine također su predisponirane za razvoj sekundarne infekcije gljivicom *M. pachydermatis* (BOND i sur., 2020.). Devon rex i Sphynx pasmine mačaka na svojoj koži nose veći broj gljivica roda *Malassezia*, od kojih je vrsta *M. pachydermatis* najbrojnija, u usporedbi s ostalim pasminama mačaka (AHMAN i sur., 2007., VOLK i sur., 2010.). Njihova koža je čak i u zdravih jedinki masna i seboroična, posebice u interdigitalnom području i ležištu kandži, gdje je brojnost gljivica najveća (COLOMBO i sur., 2007.). Uz masnoću kože genetički čimbenici najvjerojatnije doprinose predispoziciji za razvoj dermatitisa uzrokovanog gljivicom *M. pachydermatis* s obzirom da je Sphynx pasmina nastala iz Devon rex pasmine (AHMAN i BERGSTROM, 2009.).

### 2.3. Patogeneza

Iako su poznati predisponirajući čimbenici koji dovode do razvoja dermatitisa i otitisa, točan mehanizam kojim ovaj kvasac postaje patogen te koji čimbenici sudjeluju u mehanizmima patogeneze još uvijek nisu razjašnjeni (BOND i sur., 2020., IANIRI i sur., 2018.). Istraživanja upućuju na ulogu enzima fosfolipaze kao virulentnog čimbenika jer je utvrđena njegova pojačana aktivnost u sojeva izdvojenih iz pasa s kliničkom slikom dermatitisa (CAFARCHIA i OTRANTO 2004., MACHADO i sur., 2010., VLACHOS i sur., 2013.) i otitisa (CAFARCHIA i OTRANTO 2008., TERAMOTO i sur., 2015.) u usporedbi sa sojevima izdvojenih iz zdravih pasa. Međutim, lipolitička aktivnost ove vrste ne može se objasniti samo jednim čimbenikom te je potrebno identificirati i druge za sada nepoznate koji bi razjasnili njezine mehanizme patogenosti (TERAMOTO i sur., 2015.). COUTINHO i PAULA (2000.) dokazali su da sojevi izdvojeni iz pasa s otitisom i dermatitisom sintetiziraju enzime poput hondriotin-sulfata, hijaluronidaze te proteinaze koji mogu doprinijeti razvoju kliničke slike kao dodatni virulentni čimbenici.

Ugljikohidratne komponente stanične stijenke mjesto su vezivanja alergena specifičnih imunoglobulina E (IgE) te sudjeluju u reakciji preosjetljivosti tipa I u određenog broja ljudi koji

boluju od atopijskog dermatitisa. Smatra se da se isti mehanizam preosjetljivosti javlja i u nekih pasa s atopijskim dermatitisom (BOND i sur., 2020.). Na to ukazuje povišena koncentracija IgE u većine pasa s atopijskim dermatitisom u usporedbi s zdravim psima (CHEN i sur., 2002., NUTTALL i HALLIWELL, 2001.) te pozitivan intradermalni test na antigene gljivice *M. pachydermatis* u pasa s atopijskim dermatitisom (BOND i sur., 2002., MORRIS i sur., 1998.). Osim toga retrospektivno istraživanje ARBERG i sur. (2017.) ukazalo je na uspješnost potkožne imunoterapije u pasa s preosjetljivošću na gljivicu *M. pachydermatis*.

## 2.4. Kliničke slike infekcija uzrokovanih gljivicom *M. pachydermatis*

### 2.4.1. Klinička slika u pasa

Upala vanjskog zvukodova u pasa uzrokovana gljivicom *M. pachydermatis* klinički se očituje svrbežom, eritemom uške i vanjskog zvukovoda te tamnosmeđim cerumenom konzistencije slične vosku (BOND, 2010., MATOUSEK i CAMPBELL, 2002., NARDONI i sur., 2005.). Kao sekundarni uzročnik doprinosi kronicitetu upalnog procesa pri čemu se na medijalnim površinama uški mogu razviti sekundarne kožne lezije poput lihenifikacije (BOND i sur., 2020.), a u samom zvukovodu često dolazi do razvoja stenoza (BOND, 2010.). Iako rijetko, u slučaju oštećenja bubnjića moguće je širenje infekcije na srednje uho (MORRIS, 1999.).

Dermatitis uzrokovan gljivicom *M. pachydermatis* može biti prisutan u lokaliziranom ili generaliziranom obliku (PATERSON i FRANK, 2002.). Lokalizirani oblik dermatitisa najčešće se uočava na mjestima s naborima kože poput aksilarnog, ingvinalnog, interdigitalnog područja te na ventralnoj površini vrata i abdomena. Uz navedno često zahvaća njušku, usne, zvukovode i područje perineuma (BOND i sur., 2020.). U većini slučajeva kao dominantan simptom u pasa uočava se pruritus različitog intenziteta koji se ne povlači u potpunosti primjenom imunosupresivne te antimikrobne terapije (PATERSON i FRANK, 2002.). Ovisno o veličini zahvaćenog područja očituje se generaliziranim svrbežom koji rezultira češanjem životinja o predmete ili o tlo, lizanjem i grizenjem šapa te zamahivanjem glave i češanjem ušiju (BOND i sur., 2020.). Kožne lezije nisu specifične te pruritus, poglavito na licu, može biti vrlo intenzivan i pobuditi sumnju na postojanje problema neurološke ili bihevioralne prirode (PATERSON i FRANK, 2002., PEANO i sur., 2020.). Difuzni eritem glavna je primarna kožna lezija koju većinom prati varijabilna količina masnog smeđe-crnog materijala koji oblaže donji

dio dlaka (BOND, 2010.). Sekundarne kožne lezije poput ekzorijacija i traumatske alopecije nastaju zbog pruritusa, ali i zbog kroničnog tijeka bolesti kada se može uočiti hiperpigmentacija, lihenifikacija, maceracija i intertrigo. Upaljena koža može biti pojačano masna ili suha te perutava (PEANO i sur., 2020.). Generalizirani dermatitis vrlo često prati i neugodan miris (MORRIS, 1999.).

Paronihija uzrokovana gljivicom *M. pachydermatis* može se javiti zasebno ili uz dermatitis (MORRIS, 1999.). Klinički se očituje crvenkasto-smeđom diskoloracijom proksimalnog dijela kandže uz moguću diskoloraciju okolne dlake te upalom okolnog mekog tkiva (PEANO i sur., 2020.). U naborima kože između kandži moguć je nalaz eksudata konzistencije slične vosku. Vlasnici često prije navedenih promjena primijete lizanje ili grizenje šape (MORRIS, 1999.). Iako rijetko, gljivica *M. pachydermatis* može inficirati i rožnicu te uzrokovati keratomikozu (LEDBETTER i STARR, 2015.).

#### 2.4.2. Klinička slika u mačaka

U mačaka upala vanjskog zvukovoda uzrokovana gljivicom *M. pachydermatis* klinički se očituje pruritusom, eritemom, boli u području uha, povećanom količinom smeđeg cerumena konzistencije slične vosku i hiperplazijom kože vanjskog zvukovoda (BOND i sur., 2020.). Generalizirani dermatitis rijetko se uočava u mačaka (CROSAZ i sur., 2013.). Ipak, može se uočiti u predisponiranih pasmina kada se klinički očituje eritemom i masnom seborejom (BOND i sur., 2020.). U slučaju kroničnog dermatitisa nastaju alopecije i hiperpigmentacija dok se pruritus, a time i ekzorijacije ne viđaju često. Najčešće su promjenama obuhvaćena aksilarna i ingvinalna područja, ventralni dio vrata te posebice interdigitalno područje (AHMAN i sur., 2007.). Iako se klinički može uočiti prisutnost smeđeg masnog eksudata u interdigitalnom području, rijetko uzrokuje simptome paronihije ili pododermatitisa (COLOMBO i sur., 2007.). U ostalih mačaka dermatitis se može očitovati kao komplikacija alergijskih kožnih reakcija. Tada se češće očituje pruritusom i kožnim lezijama na licu, zvukovodu i abdomenu dok je interdigitalno područje rjeđe zahvaćeno (BOND i sur., 2020., ORDEIX i sur., 2007.).

Gljivica *M. pachydermatis* u mačaka može kao uzročnik sekundarnih infekcija uzrokovati komplikacije u vidu razvoja akni (JAZIC i sur., 2006.), idiopatskog facijalnog dermatitisa (BOND i sur., 2000.) i paraneoplastičnog sindroma (MAULDIN i sur., 2002.).

## 2.5. Dijagnostika

Klinički znakovi otitisa i dermatitisa uzrokovanih gljivicom *M. pachydermatis* nisu patognomonični te se na temelju njih može samo posumnjati na infekciju. Dokazivanje prisutnosti gljivice na lezijama zahvaćenom području također nije dovoljno za objektivno postavljanje dijagnoze zbog toga što je ona na koži i sluznicama prisutna kao komenzal. Tek kada se primjenom antimikotika smanji populacija gljivica na lezijama zahvaćenom području te posljedično uzrokuje poboljšanje kliničke slike moguće je utvrditi da je prekomjeren rast gljivice *M. pachydermatis* uzrokovao upalni proces. Drugim riječima objektivno postavljanje dijagnoze se jedino postiže primjenom različitih metoda dijagnostike, odnosno kliničke, mikološke i terapijske metode zajedno (GREEN, 2012.). Za utvrđivanje prisutnosti gljivice, ali i određivanje njezine brojnosti najprikladnija je citološka pretraga. U tu svrhu uzima se obrisak vanjskog zvukovoda, odnosno otisak ili strugotina kože. Uzorci se oboje modificiranim Wright Giemsa bojenjem te mikroskopiraju pod velikom ili imerzijskim povećanjem (x400, x1000) svjetlosnog mikroskopa (GUILLOT i BOND, 2020.). Prema istraživanju GINEL i sur. (2002.) nalaz pet ili više gljivica u otisku obriska vanjskog zvukovoda u pasa, odnosno 12 ili više gljivica u slučaju mačaka, pri povećanju objektiva od x400 smatra se prekomjernim rastom koji upućuje na sekundarnu infekciju. Iako bi povećana brojnost populacije gljivice *M. pachydermatis* upućivala na moguću sekundarnu infekciju, takav nalaz nije dovoljan za objektivno postavljanje dijagnoze jer njezina brojnost ovisi o više čimbenika poput pasminske predispozicije, prisutnih komorbiditeta te mjestu i načinu uzorkovanja. Važno je i napomenuti da je u slučaju hipersenzibilnosti dovoljan manji broj ove gljivice za razvoj kliničke slike bolesti (GREEN, 2012., LO i sur., 2016., MACHADO i sur., 2011., MAYNARD i sur., 2011.). Zbog nedovoljno visoke osjetljivosti citološke pretrage uputno je u slučaju negativnih nalaza ponoviti pretragu mijenjanjem mjesta uzorkovanja (BOND i sur., 2020.) odnosno koristiti osjetljiviju metodu poput izdvajanja gljivice *M. pachydermatis* na SA ili Dixon hranjivoj podlozi pri temperaturi od 32 do 37°C (GREEN, 2012.). Važno je istaknuti nužnost dijagnosticiranja primarnih uzroka upale kao i predisponirajućih čimbenika čiji je neuspjeh glavni uzrok kroničnog tijeka bolesti i recidivirajućih infekcija (GUILLOT i BOND, 2020.).



## 2.6. Liječenje

Liječenje dermatitisa i otitisa uzrokovanih sekundarnom infekcijom gljivicom *M. pachydermatis* može se provoditi topikalno, sistemski i kombinacijom oba načina (PEANO i sur., 2020.). Liječenje topikalnim pripravcima prikladniji je izbor pošto se uzročnik nalazi na rožnatom dijelu epidermisa. Također u slučaju otitisa omogućuje izravni kontakt terapijske koncentracije antimikotika s uzročnikom u upalnom eksudatu, odnosno vanjskom zvukovodu. Navedeno je manje vjerojatno pri sistemskom načinu liječenja (GREEN, 2012., MORRIS, 2004., ROUGIER i sur., 2005.). Terapija se sastoji od primjene antimikotika i to najčešće azola koji se dijele na imidazole (klotrimazol, mikonazol) i triazole (flukonazol, itrakonazol). Uz navedenu skupinu koriste se i polieni poput nistatina te alilamini poput terbinafina (PATERSON, 2016., PEANO i sur., 2020.). Azoli djeluju inhibitorno na citokrom P450, a time i na sintezu strukturnih jedinica stanične stijenke poput ergosterola, triglicerida, fosfolipida i hitina. Konačan rezultat njihovog djelovanja je oštećenje stanične stijenke te posljedično apoptoza gljivične stanice (MORRIS, 2004., NEGRE i sur., 2009.). Iako postoje pripravci za liječenje otitisa uzrokovanog gljivicom *M. pachydermatis* koji sadrže samo antimikotik poput MCZ ili klotrimazola, istraživanje BENSIGNOR i GRANDEMANGE (2006.) ukazuje da se bolji klinički rezultati postižu kada se uz antimikotik koristi i kortikosteroid. Većina veterinarskih topikalnih pripravaka koji se koriste u terapiji upale vanjskog zvukovoda uz navedene dvije grupe djelatnih tvari sadrže i neki od antimikrobnih pripravaka poput aminoglikozida (neomicin, gentamicin), fluorokinolona (enrofloksacin, marbofloksacin) i polimiksina B te su formulirani u obliku kapi ili masti (PATERSON, 2016.). U liječenju dermatitisa uzrokovanog gljivicom *M. pachydermatis* najuspješnijom se pokazala topikalna primjena šampona koji sadrže kombinaciju 2% mikonazol nitrata i 2% klorheksidina, dva puta tjedno tijekom tri tjedna (GUILLOT i BOND, 2020., NEGRE i sur., 2009.). Antiseptik klorheksidin u interakciji s fosfolipidima stanične stijenke mikroorganizama poput gljivice *M. pachydermatis*, povećava njezinu propustljivost te time postiže antifungalni učinak. Iako je njegova učinkovitost ovisna o dozi i formulaciji, istraživanje MAYNARD i sur. (2011.) ukazuje kako je primjena šampona koji sadrži 3% klorheksidin diglukonata učinkovita u liječenju dermatitisa kao i primjena šampona koji sadrže kombinaciju 2% mikonazol nitrata i 2% klorheksidina. U slučajevima kada topikalna terapija ne djeluje ili je nije moguće provoditi, primjerice zbog nesuradljivosti životinje pri primjeni šampona ili opsežne ulceracije kože zvukovoda, indicirano je provoditi sistemsku terapiju (MORRIS, 2004., NEGRE i sur., 2009.).

U tu svrhu peroralno se primjenjuje ketokonazol ili itrakonazol u dozi od 5-10 mg/kg dnevno tijekom tri do četiri tjedna. Itrakonazol je također moguće davati u obliku takozvane pulsne terapije kada se daje dva dana za redom nakon čega slijedi pauza od pet dana, a ukupno vrijeme terapije traje tri tjedna (BENSIGNOR, 2006., BOND i sur., 2020., PINCHBECK i sur., 2002.).

## 2.7. Rezistencija

Pojam rezistencija u gljivica može se podijeliti na mikrobiološku odnosno antimikrobnu i kliničku rezistenciju. Klinička rezistencija definira se otpornošću gljivice na određeni antimikotik povezana s neuspješnim ishodom terapije pacijenta. Odnosno koncentracija antimikotika potrebna za inhibiciju rasta gljivice viša je od one koja se na siguran način može postići u organizmu životinje (PEANO i sur., 2020., PFALLER, 2012.). Mikrobiološka odnosno antimikrobna rezistencija definira se otpornošću gljivice na određeni antimikotik dokazana samo u *in vitro* uvjetima kada je koncentracija antimikotika potrebna za inhibiciju rasta gljivice viša od očekivane, odnosno viša od one potrebne za inhibiciju rasta soja gljivice za koji je poznato da nema razvijene mehanizme rezistencije (PEANO i sur., 2020., PFALLER, 2012.). Brojna istraživanja upućuju na razvoj mikrobiološke rezistencije u vrste *M. pachydermatis*, ponajprije na azole (CAFARCHIA i sur., 2012a, JESUS i sur., 2011., NIJIMA i sur., 2011., WATANABE i sur., 2014.). No, istraživanje ANGILERI i sur. (2019.) ukazuje i na kliničku rezistenciju nastalu uslijed višegodišnje terapije azolima. U navedenom radu opisan je slučaj minijaturne pudle podvrgnute dugotrajnijoj sistemske i topikalnoj terapiji zbog čestih recidiva dermatitisa i otitisa te neuspjeha u identificiranju njihovog primarnog uzroka. Zbog pogoršanja kliničke slike provedena je mikološka pretraga odnosno izdvajanje gljivice *M. pachydermatis* i ispitivanje njezine osjetljivosti na azole. Izdvojeno je više sojeva različite osjetljivosti te je u nekih potvrđena rezistencija ne samo na azole korištene u terapiji već i na one koji se uopće nisu koristili, što upućuje i na moguće mehanizme razvoja unakrižne rezistencije. Istraživanje JESUS i sur. (2011.) također upućuje na mogućnost razvoja unakrižne rezistencije kao mehanizma prilagodbe gljivice *M. pachydermatis* na kronično izlaganje azolima, iako u ovom slučaju u *in vitro* uvjetima.

Mehanizmi razvoja rezistencije na azole su višestruki, ali oni za vrstu *M. pachydermatis* još nisu utvrđeni (IATTA i sur., 2016.). Postoje naznake da ulogu u navedenome imaju promjene nastale mutacijom gena *ERG11*. Naime, gen *ERG11* kodira enzim lanosterol 14-alfa-demetilaza koji je dio citokroma P450 i ciljno mjesto djelovanja antimikotika iz skupine azola.

Promjene u građi ciljnog enzima uzrokovane mutacijama mogu dovesti do smanjenog afiniteta tog enzima prema djelatnim tvarima (KANO i sur., 2018., KANO i sur., 2019.). Osim promjena u vidu mutacija istraživanje KIM i sur. (2018.) ukazalo je da bi i povećana ekspresija gena *ERG11* mogla biti jedan od mogućih mehanizama razvoja rezistencije u vrste *M. pachydermatis*. U navedenom istraživanju u tri su izolata gljivice *M. pachydermatis* rezistentnih na ketokonazol utvrđena četverostruka ponavljanja nizova gena u regiji kromosoma 4 koji sadrži gen *ERG11*. Za rod *Candida* poznato je da rezistenciju na azole uzrokuje pojačana aktivnost efluks pumpi koje uz utrošak energije izbacuju tvari iz stanice uključujući antimikotike te je na taj način onemogućeno njihovo djelovanje (SANGUINETTI i sur., 2005.). Istraživanje IATTA i sur. (2016.) dokazalo je kako upotreba inhibitora efluks pumpi pojačava osjetljivost vrsta *M. pachydermatis* i *M. furfur* na vorikonazol i flukonazol ukazujući da navedeni mehanizam ima ulogu u razvoju rezistencije roda *Malassezia* na azole. Osim toga, vrsta *M. pachydermatis* ima sposobnost stvaranja biofilma koji je vidljiv na površini jažica mikrotitracijskih ploča te na površini katetera (CANNIZZO i sur., 2007., FIGUEREDO i sur., 2013.). Prema nedavnom istraživanju navedena sposobnost povezuje se s nastankom rezistencije jer je u formi biofilma potrebna znatno veća koncentracija antimikotika za inhibiciju rasta ove gljivice (ČONKOVA i sur., 2022.). Iako je moguće da se pri kroničnom otitisu stvaraju povoljni uvjeti za stvaranje eksudata osobina sličnih biofilmu (NUTALL, 2017.), nije utvrđeno da gljivica *M. pachydermatis* ima sposobnost formiranja istog u zvučkovodu. Zbog svih navedenih činjenica potrebna su daljnja istraživanja (PEANO i sur., 2020.).

Važno je i napomenuti da slučajevi rezistencije nisu zabilježeni samo u veterinarskoj već i u humanoj medicini (AL-SWEIH i sur., 2014., CHINN i sur., 2017.), što naglašava važnost daljnjih istraživanja na temu rezistencije u vrste *M. pachydermatis*, ali i razvoja metoda ispitivanja njezine osjetljivosti (PEANO i sur., 2020.).

## 2.9. Metode ispitivanja osjetljivosti

Istraživanje osjetljivosti gljivica potrebno je izvoditi u svrhu utvrđivanja prisutnosti mehanizama rezistencije na postojeće antimikotike, ali i kako bi se omogućilo ispitivanje učinkovitosti novih antimikotika. Osim pojave rezistencije izrazit rast broja invazivnih

gljivičnih infekcija u ljudi nastao uslijed djelovanja drugih imunosupresivnih bolesti razlog je zbog kojeg je navedeno područje posljednja dva desetljeća neprestano u razvoju (ARIKAN, 2007.). Institut za kliničke i laboratorijske standarde (eng. *Clinical and Laboratory Standards Institute*, CLSI) u Americi te Europski odbor za istraživanje antimikrobne osjetljivosti (eng. *European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing*, EUCAST) u Europi razvili su standardizirane postupke makrodilucije i mikrodilucije u bujonu za ispitivanje osjetljivosti određenih invazivnih vrsta kvasaca iz roda *Candida* te vrste *Cryptococcus neoformans*. Standardizacijom postupaka ispitivanja osjetljivosti omogućena je međulaboratorijska usporedba rezultata te razvoj epidemioloških analiza na međunarodnoj razini. Mikrodilucija u bujonu bazira se na mjerenju inhibicije rasta gljivica izloženih dvostrukim razrjeđenjima koncentracije odabranog antimikotika. Izvodi se u mikrotitracijskim pločama koje sadrže 96 jažica volumena 300  $\mu$ L, raspoređene u 12 stupaca i 8 redova, što omogućuje istodobno ispitivanje više sojeva u deset dvostrukih razrjeđenja antimikotika. Navedenim postupkom dobivaju se kvantitativni rezultati, odnosno određuje se minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) ispitivanog antimikotika (ARIKAN, 2007., PEANO i sur., 2017.). MIK se definira kao najmanja koncentracija djelatne tvari, odnosno korištenog antimikotika, koja je sposobna inhibirati rast gljivica, a izražava se u mg/L. Za antimikotike iz skupine azola prema EUCAST i CLSI organizaciji MIK je određen kao najmanja koncentracija koja inhibira  $\geq 50\%$  rasta gljivica (CLSI, 2008., EUCAST, 2020.). Može se očitati vizualno na temelju zamućenja bujona uzrokovanog rastom gljivica te spektrofotometrijski pri čemu se uz pomoć uređaja spektrofotometra određuje zamućenje, odnosno količina apsorbirane svjetlosti svake pojedinačne jažice (EUCAST, 2020.). Postupak mikrodilucije u bujonu sa smjernicama izvođenja i interpretacijom rezultata opisan je u M27-A3 dokumentu CLSI organizacije te u E.DEF 7.3.2 dokumentu EUCAST organizacije (PEANO i sur., 2017.). Iako su rezultati dobiveni standardiziranim postupkom obiju navedenih organizacija međusobno u slaganju, ipak postoje razlike u njihovom izvođenju (Tablica 1). Kao razlog korištenja više koncentracije glukoze u Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 mediju od strane EUCAST organizacije u odnosu na CLSI organizaciju navodi se bolji rast gljivica u jažicama te posljedično lakše očitavanje rezultata (EUCAST, 2020.).

Tablica 1. Usporedba standardiziranih postupaka mikrodilucije u bujonu korištenih za ispitivanje osjetljivosti gljivica roda *Candida* na azole (prilagođeno iz ALASTRUEY-IZQUIERDO i sur., 2015.)

	CLSI M27-A3	EUCAST E.DEF 7.3.2
Dno jažica	zaobljeno	ravno
Medij	RPMI 1640	RPMI 1640
Postotak glukoze u mediju	0,2%	2%
Gustoća suspenzije inokuluma (CFU/mL)	0,5 - 2,5 x10 <sup>3</sup>	0,5 - 2,5 x10 <sup>5</sup>
Temperatura inkubacije	35 °C	35 °C
Vrijeme inkubacije	48 h	24 h
Očitavanje	vizualno	spektrofotometrijski
MIK vrijednost za azole	inhibicija rasta za 50%	inhibicija rasta za 50%

Međutim, navedeni postupci nisu primjenjivi za rod *Malassezia* zbog njihovih specifičnih odlika, točnije zbog ovisnosti njihovog rasta o izvoru nezasićenih masnih kiselina, sporijeg rasta u odnosu na rod *Candida* te zbog sklonosti formiranja grudica. RPMI 1640 medij koji se koristi u postupku mikrodilucije u bujonu ne sadrži izvore masnih kiselina, stoga nije pogodan za rast gljivica iz roda *Malassezia*. Shodno navedenim činjenicama kako bi se mogla istražiti osjetljivost gljivica roda *Malassezia* na različite antimikotike potrebno je provesti izmjene standardiziranih postupaka (PEANO i sur., 2017.). Iako su u istraživanju JESUS i sur. (2011.) koristili RPMI 1640 medij, uspješan rast vrste *M. pachydermatis* objašnjen je prethodnim uzgojem na Dixon hranjivoj podlozi. Navedena podloga bogata je izvorima masnih kiselina te je mišljenje autora da rast na njoj zadovoljava potrebe za njima i omogućava stvaranje njihovih rezervi u stanicama gljivica iz kojih će biti iskorištene tijekom rasta u RPMI 1640 mediju. Unatoč navedenoj činjenici, korištenje zamjenskih bujona s izvorima masnih kiselina smatra se prikladnijim za uspješan rast gljivica *M. pachydermatis* (PEANO i sur., 2017.). Najčešće korišteni u istraživanjima su Christensen ureja bujon s dodatkom polisorbata Tween 80 i 40 (CHIAVASSA i sur., 2014., PEANO i sur., 2012.), Dixon bujon (NIJIMA i sur., 2011., WATANABE i sur., 2014.), RPMI medij s dodatkom glicerola, polisorbata Tween 20 i volove žuči (PRADO i sur., 2008.) te Sabouraud bujon s dodatkom polisorbata Tween 80 (SCHLEMMER i sur., 2018.). Iako ne postoje naznake da navedeni mediji interferiraju s antimikoticima u vidu antagonizma, odnosno umanjivanja njihova učinka na rast gljivica, mišljenje je autora PEANO i sur. (2017.) da je navedeno potrebno tek utvrditi zbog

kompleksnog sastava navedenih medija. Trenutno je odsustvo antagonizma utvrđeno samo za Christensen bujon s dodatkom polisorbata Tween 40 i 80, Sabouraud bujon s dodatkom polisorbata Tween 80 te RPMI medij s dodatkom glicerola, polisorbata Tween 20 i volove žuči. Povećanjem gustoće suspenzije inokuluma, odnosno broja kolonija u mililitru (eng. *colony forming units per milliliter*, CFU/mL) u odnosu na propisanu koncentraciju za rod *Candida* od strane CLSI organizacije ( $0,5-2,5 \times 10^3$  CFU/mL), kompenzira se sporiji rast gljivica roda *Malassezia*. Time se omogućuje očitavanje rezultata nakon dva do tri dana inkubacije mikrotitracijskih ploča pri temperaturi od 32 do 37 °C (PEANO i sur., 2017.). Važno je napomenuti da konačna koncentracija suspenzije inokuluma još uvijek nije definirana zbog čega se u istraživanjima koriste različite vrijednosti gustoće suspenzije inokuluma, primjerice  $1-5 \times 10^6$  CFU/mL (CAFARCHIA i sur., 2015., NIJIMA i sur., 2011.),  $1-5 \times 10^5$  CFU/mL (PEANO i sur., 2012.) i  $7,5 \times 10^6$  CFU/mL (DEEGAN i sur., 2019.). Do poteškoća s postizanjem ponovljivih vrijednosti CFU/mL suspenzije inokuluma dolazi zbog sklonosti roda *Malassezia* ka stvaranju grudica što otežava homogenizaciju suspenzije. Da bi homogenizacija ipak bila uspješna potrebno je provoditi fizičke postupke razbijanja nakupina stanica mehaničkim metodama poput miješanja suspenzije uz pomoć stolne miješalice, ili kemijskim korištenjem blagih deterdženata poput polisorbata (Tween 40, 80). Također za rod *Malassezia* još uvijek nije razjašnjeno kako s preciznošću korelirati optičku gustoću s pripadajućom vrijednošću CFU/mL suspenzije inokuluma zbog čega i u ovom dijelu postupka dolazi do varijacija u dobivenim rezultatima. Zbog svega navedenog potrebna su daljnja istraživanja kako bi se navedene problematike riješile te time dovelo do standardizacije postupka mikrodilucije u bujonu za rod *Malassezia* (PEANO i sur., 2017.). Iako postupak mikrodilucije u bujonu predstavlja zlatni standard ispitivanja antimikrobne osjetljivosti invazivnih gljivica, on ima i svoje nedostatke. Predstavlja složeni postupak koji zahtjeva dosta vremena i rada za izvedbu. Također zahtjeva dodatnu edukaciju osoblja te posebnu opremu što je čini i skupom. Zbog navedenog koriste se i dodatne metode poput razrjeđivanja antimikotika u hranjivim podlogama, disk difuzijskog postupka i E-testa (ALASTRUEY-IZQUIERDO i sur., 2015., FOTHERGILL, 2012.). Disk difuzijski postupak za ispitivanje osjetljivosti roda *Candida* na neke antimikotike standardiziran je od strane CLSI organizacije, a smjernice njegova izvođenja opisane su u dokumentu M44-A2. Iako je manje precizan, ovaj postupak nadopunjava nedostatke mikrodilucije u bujonu jer je praktičan i vremenski manje zahtjevan za izvođenje te stoga lakši za provedbu u rutinskim dijagnostičkim laboratorijima. Iako za rod *Malassezia* ne postoji standardizirani disk difuzijski postupak, istraživanje PASQUETTI i sur. (2015.) pokazuje da se modifikacijom postupka standardiziranog za rod *Candida* mogu dobiti rezultati

koji koreliraju s rezultatima mikrodilucije u bujonu. Ipak, mišljenje je autora PEANO i sur. (2017.) da bi se prednost standardizaciji testa osjetljivosti za rod *Malassezia* trebala dati mikrodiluciji u bujonu, a potom uz pomoć nje provesti standardizaciju disk difuzijskog testa.

## 2.7. Javno zdravstvo

Najzastupljeniji eukariotski organizmi na koži čovjeka pripadaju rodu *Malassezia* od kojih kao najčešće komenzale nalazimo vrstu *M. restricta* i vrstu *M. globosa* (THEELEN i sur., 2018., WU i sur., 2015.). Gljivica *M. pachydermatis* zoofilna je vrsta te se ne smatra uobičajenim komenzalom u čovjeka, a kada se i izdvaja najčešće je to s kože lica i ruku vlasnika pasa (BOND i sur., 2020., MORRIS i sur., 2005.). Iako može dovesti do razvoja folikulitisa, ova gljivica je u ljudi značajnija kao uzročnik fungemije u neonatalnih pacijenata (TRAGIANNIDIS i sur., 2010.). Istraživanja upućuju na veliku vjerojatnost prijenosa gljivice *M. pachydermatis* s ruku medicinskih sestara na kožu neonatalnih pacijenata te posljedično intravenski unos uzročnika prilikom medicinskih zahvata (CHANG i sur., 1998., WELBEL i sur., 1994.). Zoonotski potencijal ovog mikroorganizma izgledan je zbog identifikacije istog soja gljivice izdvojenog s novorođenčadi, jedne medicinske sestre te tri pasa u vlasništvu ostalih medicinskih sestara s istog neonatalnog odjela (CHANG i sur., 1998.). U prilog prijenosu uzročnika s pasa na čovjeka govori i rad autora MORRIS i sur. (2005.) u kojem je lančanom reakcijom polimerazom u 93% slučajeva dokazana prisutnost vrste *M. pachydermatis* na rukama vlasnika pasa. Potencijalni zoonotski prijenos opisan je i u radu FAN i sur. (2006.) u kojem je gljivica *M. pachydermatis* izdvojena iz granuloma na licu zdrave žene te s kože njenog psa, no nažalost nije obavljena molekularna diferencijacija izdvojenih gljivica. Osim u neonatalnih pacijenata opisani su i slučajevi fungemije uzrokovani ovom gljivicom i u odraslih imunokompromitiranih osoba (CHOUDHURY i MARTE, 2014., LAUTENBACH i sur., 1998., LEE i sur., 2019., ROMAN i sur., 2016.). Iako je zoonotski potencijal ograničen na izrazito imunokompromitirane osobe on nije zanemariv. U svrhu smanjenja rizika za prijenos uzročnika važno je naglasiti potrebu za pravilnom higijenom ruku u osoba koje su vlasnici kućnih ljubimaca ili u kontaktu s njima (BOND i sur., 2020.).

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Pribor i oprema

##### Pribor

- Staklene epruvete zapremnine 10 mL i 5 mL
- Eppendorf epruvete zapremnine 1,25 mL
- Jednokanalne i višekanalne pipete
- Erlenmayerove tikvice zapremnine 0,5 L i 1 L
- Staklene Petrijeve ploče ( $\Phi$  15 cm)
- Sustav za membransku filtraciju (VACUMED 390, Slovenija)
- Mikrotitracijske ploče (T 92096, TPP, Švicarska)
- Autoklav (INKO, Zagreb, Hrvatska)
- Termostat (Shel Lab, Model IR2424, SAD)
- Sigurnosni kabinet (Klimaoprema, Hrvatska)
- Stolna tresilica (Heidolph, No. 54115, Type REAX1 D, Njemačka)
- Denzitometar (BioMérieux, Densimat, Italija)
- Kružna miješalica za mikrotitracijske ploče (Rotamax 120, Heidolph, Njemačka)
- Spektrofotometar (Tecan, Sunrise, Austria)

##### Hranjive podloge

- Sabouraud bujon s dodatkom polisorbata (1% Tween 80) i pufera 3-(N-morfolino)-propansulfonska kiselina (eng. *3-(N-morpholino)-propane sulfonic acid*, MOPS)
- SA hranjiva podloga
- Sabouraud agar s dodatkom aktidiona (SAA)
- Dixon hranjiva podloga



## Otopine

- Fiziološka otopina puferirana fosfatom (eng. *phosphate buffered saline*, PBS) s dodatkom polisorbata (0,1% Tween 80 i 0,5% Tween 40)
- Sterilna fiziološka otopina (0,9% NaCl)
- Dimetil sulfoksid (eng. *dymethyl sulfoxide*, DMSO)

## Antimikotik

- MCZ (Sigma, Francuska)

### 3.2. Uzgoj sojeva gljivica *M. pachydermatis*

U ovom istraživanju korišteno je 40 arhiviranih sojeva gljivice *M. pachydermatis* pohranjenih u Mikološkom laboratoriju Zavoda za mikrobiologiju i zarazne bolesti s klinikom Veterinarskog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu. Nakon odmrzavanja svaki se uzorak nacijepio na SAA hranjivu podlogu te precijepio u prosjeku oko tri puta prije korištenja u postupku mikrodilucije u bujonu da bi se osigurala optimalna vijabilnost stanica. U slučaju slabijeg porasta, za njihov uzgoj korištena je obogaćena Dixon hranjiva podloga. Navedene podloge priređene su u Erlenmayerovim tikvicama zapremnine 1 L u koje su se sastojci postepeno dodavali i miješali (Tablica 2). Nakon dodavanja svih sastojaka Erlenmayerova tikvica se zagrijavala u vodenoj kupelji uz povremeno miješanje do temperature vrenja i kuhanja tijekom samo jedne minute. Nakon toga priređene hranjive podloge autoklavirane su pri temperaturi od 121°C kroz 15 minuta kako bi se osigurala njihova sterilnost. Nakon hlađenja do temperature od 45 do 50°C podloge su razlivene u Petrijeve ploče korištenjem graduirane pipete u sigurnosnom kabinetu te skladištene u hladnjaku pri temperaturi od 4°C.

Tablica 2. Sastav hranjivih podloga

SA	SAA	Dixon
65 g SA praha	65 g SA praha	36 g ekstrakt slada
0,5 g kloramfenikola	0,5 g kloramfenikola	20 g dehidrirane volove žuči
1 L destilirane vode	0,5 cikloheksimida	10 g bakteriološkog peptona
	1 L destilirane vode	0,5 g kloramfenikola
		0,5 g cikloheksimida
		15 g bakteriološkog agara
		10 mL polisorbata Tween 40
		2 mL glicerola
		2 mL oleinske kiseline
		1 L destilirane vode

### 3.3. Mikrodilucija u bujonu

Za provođenje postupka mikrodilucije u bujonu u ovom istraživanju korišten je dokument EUCAST organizacije E.DEF 7.3.2 (2020.) standardiziran za kvasce iz roda *Candida*. Zbog specifičnih obilježja roda *Malassezia* poput ovisnosti njihovog rasta o izvoru masnih kiselina, sporijeg rasta u usporedbi s rodom *Candida* te sklonosti formiranja grudica pri izradi suspenzije inokuluma zbog debele stanične stijenke s visokim udjelom masti, posebice u njezinom vanjskom sloju (DAVID i sur., 2007.), potrebna je prilagodba samog postupka (PEANO i sur., 2017.). Najprikladnijim bujonom za rast vrste *M. pachydermatis* u postupku mikrodilucije pokazao se Sabouraud bujon s dodatkom polisorbata Tween 80 u koncentraciji od 1% i MOPS pufera (CAFARCHIA i sur., 2012b) koji je sukladno tome korišten u ovom istraživanju. Sastojci potrebni za izradu bujona postepeno su dodavani u Erlenmayerovu tikvicu zapremnine 1 L uz miješanje (Tablica 3), a tikvica se zagrijavala u vodenoj kupelji do temperature vrenja na kojoj se bujon prokuhao tijekom jedne minute nakon čega je provedeno autoklaviranje na temperaturi od 121°C tijekom 20 minuta. Nakon autoklaviranja i hlađenja na sobnu temperaturu u bujon se dodao MOPS pufer te se pH vrijednost korigirala na 7,0 ( $\pm 1$ ). Posljednji korak u pripremi bujona predstavljala je njegova sterilizacija membranskom filtracijom pomoću vakuum pumpe te skladištenje u hladnjaku pri temperaturi od 4°C. Uz izmjenu korištenog bujona, u postupku izrade suspenzije inokuluma gljivice *M. pachydermatis*, umjesto 0,9% NaCl korištena je PBS otopina s dodatkom polisorbata Tween 80 u koncentraciji

od 0,1% i Tween 40 u koncentraciji od 0,5%. Nakon dodavanja preostalih sastojaka (Tablica 3) otopina se autoklavirala pri temperaturi od 121°C kroz 20 minuta. Polisorbati korišteni u bujonu i PBS otopini predstavljaju izvor masnih kiselina neophodnih za njihov rast, ali i posjeduju osobine deterdženta uz pomoć kojih se umanjuje spomenuta problematika formiranja grudica (PEANO i sur., 2017.).

Tablica 3. Sastav obogaćenog Sabouraud bujona i PBS otopine za pripremu suspenzije inokuluma

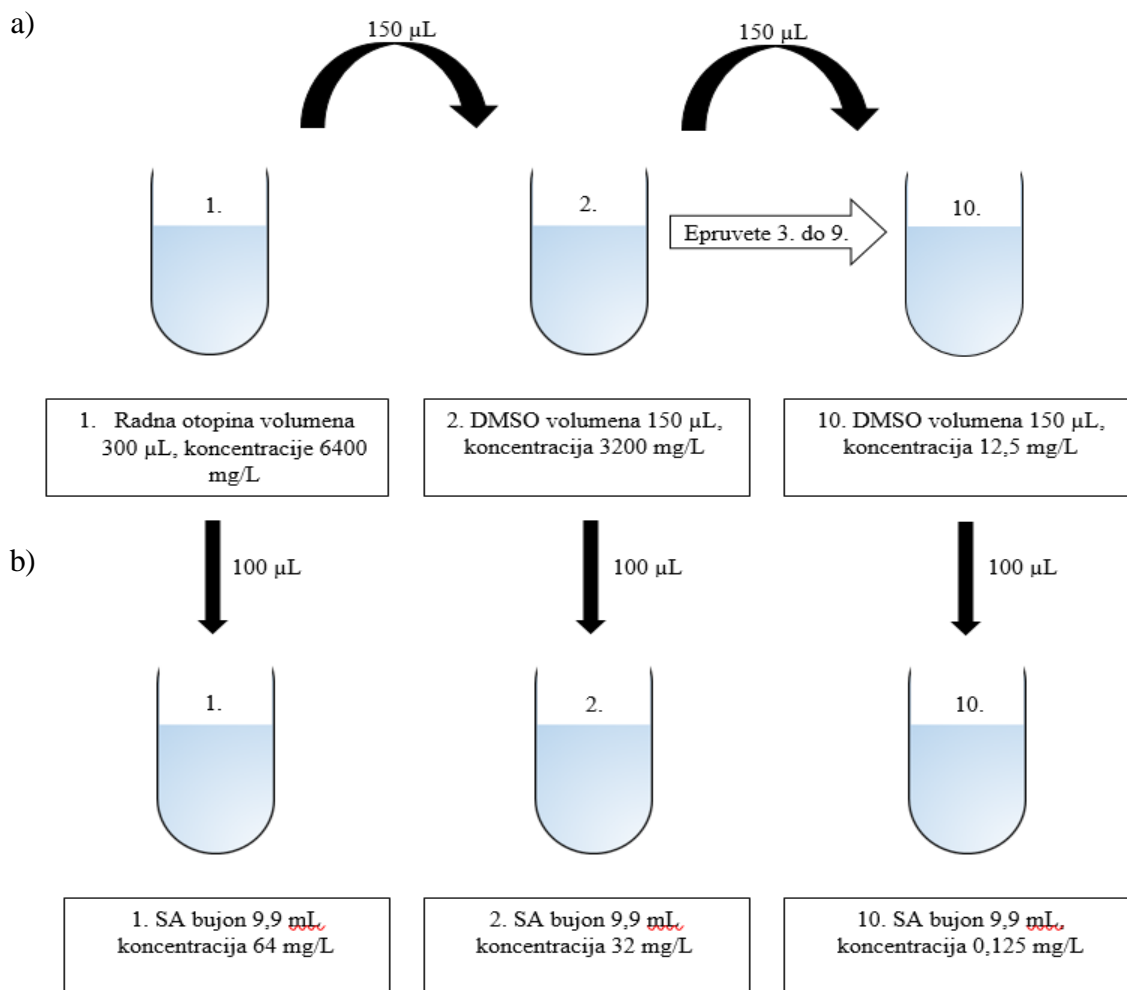
Sabouraud bujon + 1% Tween 80	PBS otopina + 0,1% Tween 80+ 0,5% Tween 40
40 g glukoze	200 mL destilirane vode
10 g bakteriološkog peptona	1 PBS tableta (137 mmol NaCl, 2,7 mmol KCl, 10 mmol fosfatnog pufera nakon otapanja u 200 mL destilirane vode)
10 mL polisorbata Tween 80	1 mL polisorbata Tween 40
1 L destilirane vode	200 µL polisorbata Tween 80
34,53 g MOPS pufera	podešavanje pH na 7,0
podešavanje pH na 7,0 ( $\pm 1$ ) uz NaOH granule	

#### 3.4. Priprema radnih otopina mikonazola

Priprema radnih otopina odgovarajućih razrjeđenja mikonazola provedena je prema smjericama dokumenta E.DEF 7.3.2 (EUCAST, 2020.). Naime, koncentracija temeljne standardne otopine antimikotika mora biti 200 puta veća od radnih koncentracija antimikotika koje se koriste u postupku mikrodilucije. S obzirom da u smjericama EUCAST dokumenta nema propisanih vrijednosti radnih MCZ koncentracija za ispitivanje osjetljivosti kvasaca, u

ovom istraživanju odabran je raspon radne koncentracije MCZ od 0,06-32 mg/L u svrhu usporedbe rezultata s rezultatima sličnih istraživanja u veterinarskoj medicini (CHIAVASSA i sur., 2014., NIAE i sur., 2021.).

Temeljna standardna otopina MCZ koncentracije 6400 mg/L priređena je na način da se 50 mg MCZ u prahu otopilo u 7,81 mL organskog otapala DMSO te je alikvotirana u 26 Eppendorf epruveta u volumenu od 300  $\mu$ L. Njihovo skladištenje i uporaba omogućeno je držanjem u zamrzivaču pri temperaturi od -80°C tijekom šest mjeseci. Prilikom ispitivanja osjetljivosti sojeva u ovom istraživanju, iz temeljne standardne otopine MCZ (6400 mg/L) priređena su dvostruka serijska razrjeđenja (1:2) u devet Eppendorf epruveta ukupnog volumena 300  $\mu$ L, koristeći 150  $\mu$ L temeljne standardne otopine i 150  $\mu$ L DMSO otapala. Na taj način dobivene su radne otopine MCZ u koncentraciji od 6400 mg/L (epruveta br. 1) do 12,5 mg/L (epruveta br. 10) (Slika 1a). U slijedećem koraku, u daljnjih deset epruveta priređena su stostruka radna razrjeđenja (1:100) MCZ na način da je iz svake Eppendorf epruvete 100  $\mu$ L radne otopine preneseno pipetom u slijedeću epruvetu koja je sadržavala 9,9 mL obogaćenog SA bujona. U svakom međukoraku radne otopine MCZ promiješane su uz pomoć stolne tresilice u svrhu dobre homogenizacije. Konačne radne koncentracije antimikotika MCZ dobivene navedenim postupkom iznosile su u rasponu od 64 mg/L do 0,125 mg/L (Slika 1b).



Slika 1. Shematski prikaz priređivanja radnih koncentracija mikonazola

### 3.5. Priprema suspenzije inokuluma gljivice *M. pachydermatis*

U svrhu pripreme suspenzije inokuluma korišteni su klinički izolati sojeva gljivice *M. pachydermatis* prethodno nacijepljeni na SAA hranjivu podlogu te inkubirani na 37°C tijekom 48 do 72 sati. Kako je stanična stijenka ovih gljivica debela te sadrži veliki udio masti (DAVID i sur., 2007.), javljala se problematika stvaranja grudica prilikom izrade suspenzije inokuluma. U nekih je sojeva ta problematika bila naglašenija te se uočavala kao pretjerana mrvičavost stijenki kolonija, a bila je izraženija u kultura sojeva starih 72 sata u odnosu na sojeve inkubirane 48 sata. Zbog navedenoga, sojevi kod kojih su utvrđeni opisani problemi u izradi homogene suspenzije inkubirani su kraće vrijeme odnosno 48 sata, čime se osigurala adekvatna

priprema suspenzije inokuluma. Naime, poznato je da uvjeti i duljina inkubacije utječu na debljinu stanične stijenke ovih gljivica (GUÉHO-KELLERMANN i sur., 2010.). Nakon inkubacije sterilnom se ezom zahvatilo četiri do pet kolonija naraslih gljivica promjera najmanje 1 mm te razmazalo uz rub epruvete u kojoj se nalazila obogaćena PBS otopina. Koristeći stolnu tresilicu suspenzija se promiješala na brzini od 800 okretaja u minuti (eng. *revolution per minute*, rpm) kroz petnaestak sekundi u svrhu njezine homogenizacije. Zamućenje suspenzije inokuluma izmjereno je fotometrijski u denzitometru kako bi se utvrdila optička gustoća u vrijednosti od 0,5 McFarland jedinica (McF) koja je odgovarala koncentraciji od 1 do  $5 \times 10^6$  CFU/mL. Dodavanjem 0,4 mL prethodno opisane suspenzije u 3,6 mL obogaćene PBS otopine priređeno je deseterostruko razrjeđenje (1:10) čime se dobila radna koncentracija inokuluma od 1 do  $5 \times 10^5$  CFU/mL korištena za dodavanje u mikrotitracijske ploče. U svrhu osiguravanja vijabilnosti stanica izrada suspenzije inokuluma i naknadno dodavanje iste u mikrotitracijske ploče obavljeno je unutar vremenskog okvira od 30 minuta (EUCAST, 2020.).

### 3.6. Priprema mikrotitracijskih ploča za mikrodiluciju u bujonu

Postupak mikrodilucije u bujonu u ovom istraživanju provodio se u sterilnim mikrotitracijskim pločama ravnog dna s poklopcem prema standardiziranom protokolu EUCAST organizacije (2020.). Ploče se sastoje od 96 jažica zapremnine 300  $\mu$ L, raspoređenih u 8 redova (A-H) i 12 stupaca (1-12). U stupce 1 do 10 multikanalnom se pipetom dodavalo 100  $\mu$ L odgovarajućeg dvostrukog razrjeđenja otopine MCZ, počevši s najvećom radnom koncentracijom (64 mg/L) u stupac 1 te završavajući s najmanjom (0,125 mg/L) u stupac 10. Nakon toga u stupce 1 do 11 dodalo se 100  $\mu$ L suspenzije inokuluma ( $1$  do  $5 \times 10^6$  CFU/mL). Opisani postupak za svaki ispitani soj provodio se u triplicatu. U stupce 11 i 12 dodavao se obogaćen Sabouraud bujon bez dodatka MCZ u volumenu od 100  $\mu$ L te su oni služili kao kontrole. Stupac 11 koristio se za kontrolu rasta ispitivanog soja i dodano mu je 100  $\mu$ L inokuluma (pozitivna kontrola), dok se stupac 12 u koji se dodalo 100  $\mu$ L obogaćene PBS otopine korištene za pripremu suspenzije inokuluma koristio kao negativna kontrola. Opisanim načinom pripreme svaka jažica sadržavala je 200  $\mu$ L odgovarajuće radne suspenzije. Zbog dvostrukog razrjeđenja nastalog dodavanjem 100  $\mu$ L inokuluma i 100  $\mu$ L otopine antimikotika u jažice, koncentracija inokuluma u jažicama iznosila je u rasponu od 0,5 do  $2,5 \times 10^5$  CFU/mL, dok je raspon koncentracije antimikotika iznosio od 32 mg/L u stupcu 1 do 0,06 mg/L u stupcu

10. Inkubacija ploča trajala je 72 h odnosno 96 h pri 37°C ovisno o rastu ispitivanog soja (RINCON i sur., 2006.), a neposredno prije inkubiranja mikrotitracijske ploče bi se postavile na kružnu miješalicu kroz 5 do 10 minuta u svrhu dobre homogenizacije priređenih suspenzija.

### 3.7. Kontrola gustoće suspenzije inokuluma (CFU/mL)

Prema standardiziranom protokolu radne koncentracije inokuluma ispitivanih sojeva, koji su u slučaju ovog istraživanja bili sojevi *M. pachydermatis*, potrebno je provjeriti na način da se izdvoji 10 µL pozitivne kontrole svakog ispitivanog soja i resuspendira u 2 mL obogaćene PBS otopine. Miješanjem pri 800 rpm kroz 15-tak sekundi omogućena je homogenizacija inokuluma nakon čega se 100 µL suspenzije nacijepilo na SA hranjivu podlogu (Tablica 1). Nakon inkubacije od 48 do 72 sata pri 37°C pobrojane su sve narasle kolonije, a pet do 125 naraslih kolonija odgovaralo je koncentraciji od 0,5 do 2,5 x10<sup>5</sup> CFU/mL te se na taj način provjerila točnost korištene gustoće suspenzije inokuluma. Navedenu kontrolu je važno razlikovati od kontrole kvalitete cjelokupnog postupka mikrodilucije u bujonu u čiju svrhu su se koristili kontrolni ATCC sojevi *C. krusei* i *C. parapsilosis* koji su također bili podvrgnuti istom postupku opisane kontrole.

### 3.8. Kontrola kvalitete postupka mikrodilucije

U svrhu kontrole kvalitete postupka mikrodilucije korišteni su kontrolni ATCC sojevi *C. krusei* i *C. parapsilosis*. Za pripremu suspenzije inokuluma navedenih sojeva korištene su kulture nacijepljene na SA hranjivu podlogu te inkubirane u trajanju od 24 sati pri 37°C. Iz pripremljenih kultura sterilnom se ezom zahvatilo četiri do pet kolonija promjera najmanje 1 mm koje su suspendirane u fiziološkoj otopini. Nakon miješanja na stolnoj tresilici odredila se optička gustoća suspenzije inokuluma u vrijednosti od 0,5 McF koja odgovara koncentraciji od 1 do 5 x10<sup>6</sup> CFU/mL. Daljnjim deseterostrukim razrjeđenjima suspenzije (1:10) koristeći 0,9% NaCl priređena je radna koncentracija suspenzije od 1 do 5 x10<sup>5</sup> CFU/mL koja je dodana u mikrotitracijske ploče unutar 30 minuta od pripreme suspenzije. Opisana kontrola kvalitete korištena je prilikom svake izrade postupka mikrodilucije u bujonu.

### 3.9. Očitavanje rezultata

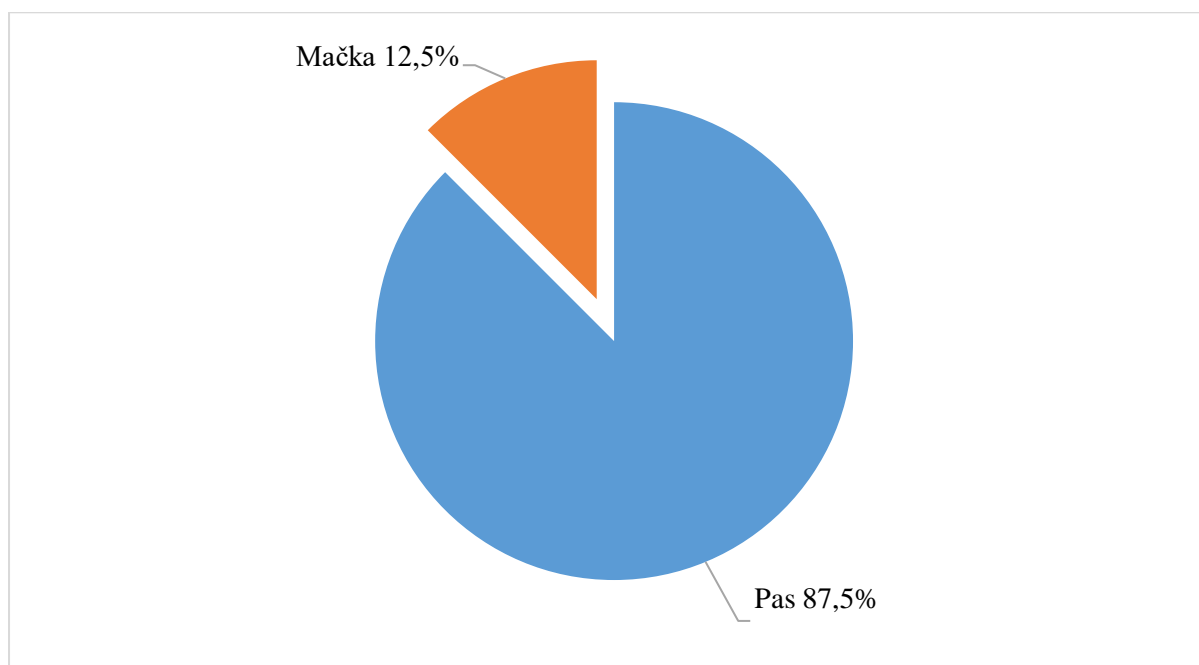
Spektrofotometrijsko očitavanje mikrotitracijskih ploča određeno je dokumentom E.DEF 7.3.2 u kojem je propisano korištenje valne duljine od 530 nm uz mogućnost korištenja i ostalih vrijednosti valnih duljina poput 405 ili 450 nm (EUCAST, 2020.). U ovom istraživanju očitavanje ploča provedeno je koristeći valnu duljinu od 540 nm, pošto je ta vrijednost najbliža preporučenoj koju je korišten spektrofotometar dozvoljavao. Rezultati apsorbancije pozitivne kontrole u vrijednosti  $\leq 0,2$  nakon  $24 \pm 2$  sata inkubacije ploča smatraju se pokazateljem nedovoljnog rasta gljivica u bujonu. Kako se navedena pojava najčešće uočava u vrste *C. parapsilosis* i vrste *C. guilliermondii* za njih se u slučaju nedovoljnog rasta inkubacija produžuje za dodatnih 12 do 24 sata. Ukoliko i nakon produžene inkubacije vrijednost apsorbancije nije  $> 0,2$  postupak mikrodilucije u bujonu smatra se neuspješno izvedenim (EUCAST, 2020.). Zbog sporijeg rasta roda *Malassezia* u odnosu na rod *Candida* preporučeno trajanje inkubacije mikrotitracijskih ploča pri temperaturi od  $37^{\circ}\text{C}$  iznosi 48 do 72 sata (PEANO i sur., 2017.) te je u ovom istraživanju iznosilo 72 sata. U slučaju slabijeg rasta soja te očitane vrijednosti apsorbancije pozitivne kontrole u vrijednosti  $< 0,2$  inkubacija se produžila do 96 sati prema preporuci istraživanja RINCON i sur. (2006.). Ukoliko je i nakon 96 sati inkubacije vrijednost bila  $< 0,2$  postupak se smatrao neuspješno izvedenim te je bio ponovljen. Oduzimanjem vrijednosti negativne kontrole, koja se sastoji od obogaćenog Sabouraud bujona i PBS otopine, od vrijednosti preostalih jažica pripadajućeg reda dobivala se vrijednost dobivena isključivo rastom gljivica. Odnosno na taj se način isključio utjecaj spektrofotometrijske vrijednosti obogaćenog Sabouraud bujona i PBS otopine na dobivene rezultate (EUCAST, 2020.). U ovom istraživanju MIK vrijednost MCZ definirana je najmanjom koncentracijom antimikotika koja inhibira rast  $\geq 50\%$  gljivica u odnosu na pozitivnu kontrolu. Nadalje, kao pokazatelji distribucije dobivenih MIK vrijednosti ispitanih sojeva korištene su minimalna inhibitorna koncentracija 50 (MIK50) koja je definirana kao prosječna koncentracija antimikotika koja inhibira rast u najmanje 50% ispitanih sojeva te minimalna inhibitorna koncentracija 90 (MIK90) koja inhibira rast u najmanje 90% ispitanih sojeva (SCHWARZ i sur., 2010.).



## 4. REZULTATI

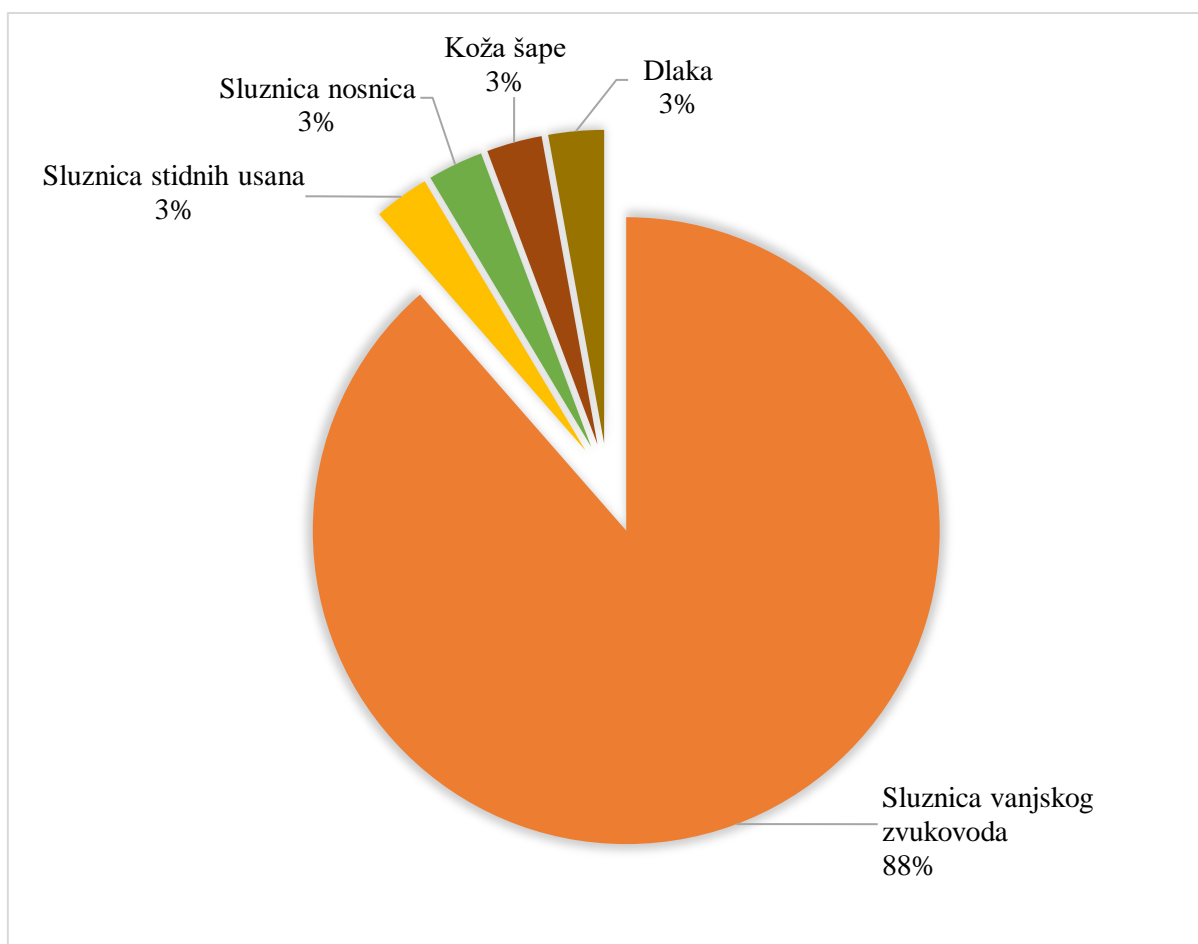
### 4.1. Istraživani sojevi gljivice *M. pachydermatis*

U ovom istraživanju ispitana je osjetljivost 40 sojeva gljivice *M. pachydermatis* pohranjenih u Mikološkom laboratoriju Zavoda za mikrobiologiju i zarazne bolesti s klinikom Veterinarskog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu. Od ukupno 40 sojeva njih 35/40 (87,5%) izdvojeno je iz pasa, dok je njih 5/40 (12,5%) izdvojeno iz mačaka (Grafikon 1).

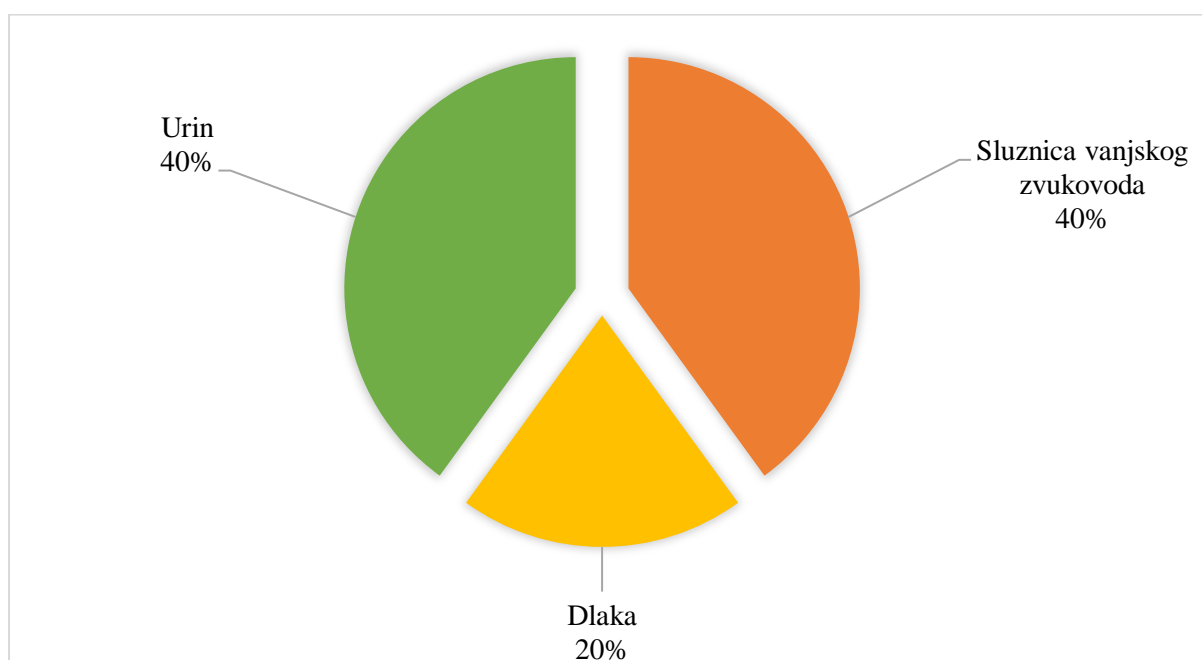


Grafikon 1. Prikaz podrijetla uzoraka s obzirom na vrstu životinje

Nadalje, od 35 ispitanih sojeva izdvojenih iz pasa 31/35 (88%) bilo je podrijetlom iz vanjskog zvukovoda, 1/35 (3%) sa stidnih usana, 1/35 (3%) iz nosnog prohoda, 1/35 (3%) sa šape te 1/35 (3%) s dlake (Grafikon 2). Od ukupno pet sojeva izdvojenih iz mačaka 2/5 (40%) bilo je podrijetlom iz vanjskog zvukovoda, 2/5 (40%) iz urina te 1/5 (20%) s dlake (Grafikon 3).



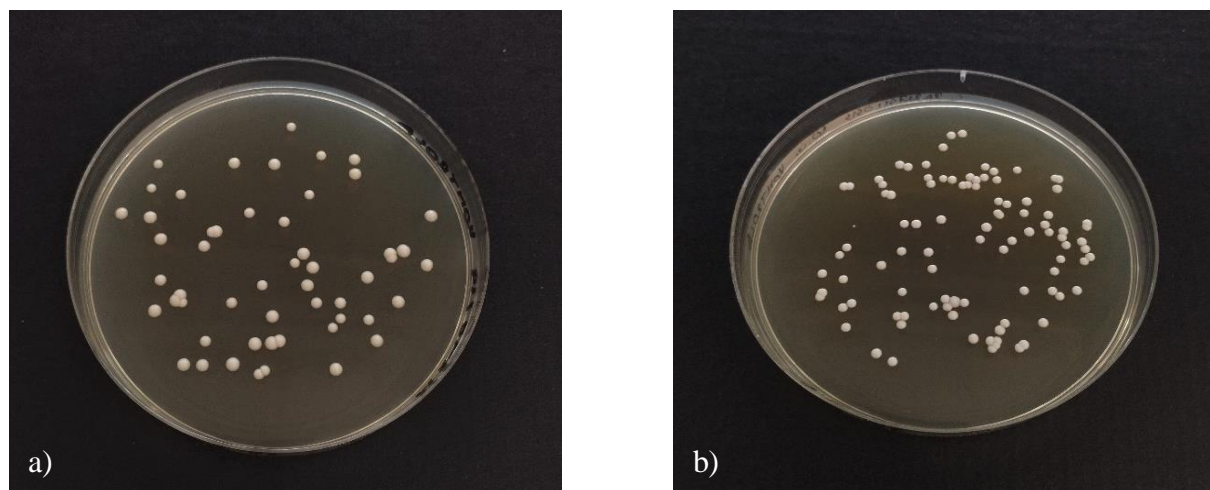
Grafikon 2. Prikaz podrijetla uzoraka pasa s obzirom na anatomsko mjesto uzorkovanja



Grafikon 3. Prikaz podrijetla uzoraka mačaka s obzirom na anatomsko mjesto uzorkovanja

#### 4.2. Rezultati kontrole gustoće suspenzije inokuluma

Nakon provođenja postupka kontrole gustoće suspenzije inokuluma izbrojane su narasle kolonije istraživanih sojeva gljivice *M. pachydermatis* kao i kontrolnih sojeva kvasaca *C. krusei* i *C. parapsilosis* (Slika 2).



Slika 2. Prikaz kontrole gustoće suspenzije inokuluma na SA hranjivoj podlozi nakon nacijepljivanja radne suspenzije inokuluma te inkubacije pri 37°C: a) porast kolonija *M. pachydermatis* nakon 72 sata; b) porast kolonija ATCC soja *C. parapsilosis* nakon 24 sata

Broj izraslih kolonija odgovarao je propisanom rasponu kolonija (od pet do 125) što je odgovaralo radnoj koncentraciji inokuluma od  $0,5- 2,5 \times 10^5$  CFU/mL (Tablica 4.).

Tablica 4. Prikaz rezultata kontrole gustoće suspenzije inokuluma (min – najmanji broj izbrojanih kolonija, max – najveći broj izbrojanih kolonija,  $\bar{x}$  – aritmetička sredina)

Statistički parametar	<i>M. pachydermatis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. krusei</i>
min	5	8	8
max	111	97	57
$\bar{x}$	30,28	40,67	34,80

#### 4.3. Rezultati postupka mikrodilucije u bujonu

U ovom istraživanju raspon MIK vrijednosti dobivenih ispitivanjem osjetljivosti sojeva gljivice *M. pachydermatis* izdvojenih iz pasa i mačaka bio je u rasponu od 0,5 do >32 mg/L (Tablica 5). Od ukupnog broja ispitanih sojeva njih 25,00% (10/40) je imalo MIK vrijednost 16 mg/L i 25,00% (10/40) 4 mg/L. Sedam je sojeva (7/40, 17,50%) imalo MIK vrijednost 8 mg/L, pet sojeva (5/40, 12,50%) 2 mg/L, a četiri sojeva (4/40, 10,00%) 32 mg/L. Za dva ispitana soja (2/40, 5,00%) MIK vrijednost bila je veća od najveće radne koncentracije korištene u ovom istraživanju, odnosno >32 mg/L, a po jedan je soj imao vrijednost 1 mg/L (1/40, 2,50%), odnosno 0,5 mg/L (1/40, 2,50%). Niti jedan soj nije imao MIK vrijednost nižu od 0,5 mg/L.

Tablica 5. Prikaz raspona MIK vrijednosti za 40 istraženih sojeva *M. pachydermatis*

MIK (mg/L)	40 sojeva <i>M. pachydermatis</i>
>32	2 (5,00%)
32	4 (10,00%)
16	10 (25,00%)
8	7 (17,50%)
4	10 (25,00%)
2	5 (12,50%)
1	1 (2,50%)
0,5	1 (2,50%)
0,25	0 (0,00%)
0,125	0 (0,00%)
0,0625	0 (0,00%)

Najveća MIK vrijednost dobivena u ovom istraživanju iznosila je >32 mg/L, a najmanja 0,5 mg/L. Geometrijska sredina MIK vrijednosti iznosila je 7,28 mg/L. MIK vrijednost s najvećom učestalošću pojavljivanja, odnosno mod iznosio je 16 mg/L, a centralna MIK vrijednost, odnosno medijan iznosio je 8 mg/L (Tablica 6).

Tablica 6. Prikaz statističkih podataka MIK vrijednosti istraženih sojeva *M. pachydermatis* (max - najveća MIK vrijednost, min - najmanja MIK vrijednost, GM - geometrijska sredina)

Statistički parametar	MIK (mg/L)
max	>32
min	0,5
GM	7,28
mod	16
medijan	8

MIK50, odnosno prosječna vrijednost koncentracije MCZ koja je inhibirala rast u najmanje 50% ispitanih sojeva iznosila je 8 mg/L, dok je MIK90, odnosno koncentracija MCZ koja je inhibirala rast u najmanje 90% ispitanih sojeva iznosila 32 mg/L.

#### 4.4. Rezultati kontrole kvalitete postupka

Kontrolni sojevi ATCC *C. krusei* i *C. parapsilosis* bili su uključeni u svakoj izvedbi postupka mikrodilucije u bujonu ovog istraživanja. Srednja geometrijska vrijednost MIK za vrstu *C. parapsilosis* iznosila je 8 mg/L, dok je za vrstu *C. krusei* iznosila 13,45 mg/L.

## 5. RASPRAVA

Gljivica *M. pachydermatis* kao oportunistički patogeni mikroorganizam uzrokuje upalu vanjskog zvukovoda i upalu kože u pasa i mačaka. Liječenje navedenih patoloških stanja uspješno se provodi topikalnom i/ili sistemskom primjenom antimikotika, od kojih najčešće onih iz skupine azola (BOND i sur., 2020.). Neuspješan klinički ishod terapije u vidu kroničnih ili recidivirajućih infekcija javlja se povremeno te se smatra da je razlog tome neprepoznavanje predisponirajućih čimbenika te dijagnostika primarnih uzroka koji osiguravaju povoljne uvjete za prekomjerno umnažanje ove gljivice te posljedično tome razvoj sekundarne infekcije. Sve više istraživanja ukazuje na postojanje mehanizma rezistencije u gljivice *M. pachydermatis* na azole te posljedično njezine smanjene osjetljivosti što također može rezultirati neuspješnim ishodom liječenja (PEANO i sur., 2020., RHIMI i sur., 2020.). Kako bi se točno mogla definirati uloga rezistencije u vrste *M. pachydermatis* potrebno je koristiti jedinstven standardizirani postupak za ispitivanje njezine osjetljivosti na antifungalne lijekove koji bi omogućio objektivnu usporedbu dobivenih rezultata te interlaboratorijske kontrole kvalitete provođenja navedenog postupka. Dosadašnja istraživanja u tu su svrhu koristila CLSI i EUCAST standardizirani postupak mikrodilucije u bujonu za invazivne vrste kvasaca kao što su vrste iz roda *Candida* i vrsta *Cryptococcus neoformans*. Kako bi se postupak mikrodilucije mogao primijeniti i na vrste iz roda *Malassezia* potrebno je uvesti izmjene sukladno specifičnim odlikama navedenog roda. To su ponajprije ovisnost njihovog rasta o vanjskim izvorima dugolančanih masnih kiselina, specifičnost građe stanične stijenke u vidu njezine izražene debljine i visokog udjela masti što uzrokuje stvaranje grudica prilikom izvođenja postupka te sporiji rast u usporedbi s rodom *Candida* (PEANO i sur., 2020.).

U ovom istraživanju ispitana je osjetljivost 40 sojeva gljivice *M. pachydermatis* izdvojenih iz pasa i mačaka na derivat azola MCZ metodom mikrodilucije u bujonu u čiju je svrhu korišten prilagođen postupak mikrodilucije propisan dokumentom E.DEF 7.3.2 (EUCAST, 2020.). Većina sojeva istraženih u ovom istraživanju, odnosno njih 87,5% izdvojeni su iz pasa, dok je 12,5% izdvojeno iz mačaka. Navedeno se može protumačiti činjenicom da pas predstavlja primarnog domaćina gljivice *M. pachydermatis* te iako je ona najčešće izdvojena gljivica i u mačaka, u njih se ipak izdvaja znatno rjeđe u usporedbi s psima (BOND i sur., 2020.). Nadalje, najveći broj sojeva i to njih 88%, izdvojen je iz vanjskog zvukovoda pasa iz razloga što je upala vanjskog zvukovoda uzrokovana ovom gljivicom znatno češća od upale kože (PEANO i sur., 2020.).

Derivat azola MCZ odabran je u ovom istraživanju zbog učestale primjene u topikalnom načinu provođenja liječenja upale vanjskog zvukovoda koji se smatra prikladnijim od sistemskog. Također preparati koji sadrže kombinaciju 2% mikonazol nitrata i 2% klorheksidina utvrđeni su kao najuspješniji topikalni preparati za liječenje upale kože uzrokovanu ovom gljivicom (GUILLOT i BOND, 2020., NEGRE i sur., 2009.).

Postupak mikrodilucije u bujonu propisan od strane EUCAST i CLSI organizacije potrebno je prilagoditi zbog specifičnih odlika roda *Malassezia*, a to je ovisnost njihovog rasta o izvorima masnih kiselina nedavno ustanovljena i kod vrste *M. pachydermatis*. Naime, utvrđeno je da čak i ta vrsta, za koju se smatralo da ne treba masne kiseline za svoj rast, ne posjeduje gen za sintezu dugolančanih masnih kiselina u svom genomu (PEANO i sur., 2020., PUIG i sur., 2017.). Kako RPMI 1640 medij koji se koristi u EUCAST i CLSI postupcima mikrodilucije u bujonu ne sadrži masne kiseline ustanovljeno je da ga je potrebno obogatiti izvorima masnih kiselina ili odabrati neki drugi medij (PEANO i sur., 2020.). U istraživanju CAFARCHIA i sur. (2012b) istražena je osjetljivost sojeva gljivice *M. pachydermatis* uporabom različitih vrsta obogaćenih hranjivih bujona kao što su Dixon, Sabouraud, Christensen i RPMI bujon. Osjetljivost na azole (ketokonazol, flukonazol, itrakonazol) istražena je u 30 kliničkih izolata *M. pachydermatis*, a u svrhu kontrole rasta ispitivanih sojeva korišten je soj u kojeg je u *in vitro* uvjetima inducirana rezistencija na derivat azola flukonazol. Rezultati su pokazali da RPMI bujon obogaćen izvorima masnih kiselina nije osigurao adekvatan rast gljivica, dok je provođenjem postupka u Dixon bujonu utvrđena neobjašnjivo velika pojavnost rezistencije na flukonazol, točnije u čak 88,6% sojeva. Stoga je zaključeno da niti jedan od njih ne predstavlja adekvatan medij za ispitivanje osjetljivosti vrsta iz roda *Malassezia*. U istom su istraživanju Christensen i Sabouraud bujon omogućili adekvatan rast sojeva *M. pachydermatis* te ispitivanje njezine osjetljivosti, međutim odabran je Sabouraud bujon jer je samo njegovim korištenjem dokazana *in vitro* inducirana rezistencija kontrolnog soja vrste *M. pachydermatis* na flukonazol. Shodno navedenom, prema preporuci istraživanja CAFARCHIA i sur. (2012b) u ovom je istraživanju korišten obogaćen Sabouraud bujon. Dokument E.DEF 7.3.2 (EUCAST, 2020.) odabran je za daljnju prilagodbu postupka jer u odnosu na protokol propisan dokumentom M27-A3 (CLSI, 2008.) ima određene prednosti koje se odnose na gustoću suspenzije inokuluma te način očitavanja rezultata. Iako točna gustoća suspenzije inokuluma gljivice *M. pachydermatis* potrebna za izvođenje postupka mikrodilucije u bujonu nije definirana, većina istraživanja ukazuje da bi ona trebala biti veća od propisane u dokumentu M27-A3 (CLSI, 2008.) za rod *Candida*, a koja iznosi od 0,5 do 2,5 x10<sup>3</sup> CFU/mL. U prilog činjenici da korištenje koncentracije inokuluma u rasponu propisanim od strane CLSI

organizacije nije prikladno za rod *Malassezia* govori istraživanje HENSEL i sur. (2009.) u kojem je uporabom koncentracije inokuluma  $2 \times 10^3$  CFU/mL dobivena značajno niska MIK90 vrijednost od 0,25 mg/L u odnosu na primjerice 4 mg/L (CHIAVASSA i sur., 2014, PEANO i sur., 2012.). Smatra se da se povećanjem radne koncentracije inokuluma iznad one propisane dokumentom M27-A3 (CLSI, 2008.) rješava problematika sporijeg rasta roda *Malassezia* te omogućuje očitavanje rezultata već nakon 48-72 sati inkubacije mikrotitracijskih ploča. Inkubacija mikrotitracijskih ploča u istraživanju HENSEL i sur. (2009.) trajala je do pet dana što dodatno govori u prilog neprikladnosti korištenja navedene koncentracije inokuluma (PEANO i sur., 2012, PEANO i sur., 2017.). Kako je u dokumentu E.DEF 7.3.2 propisana koncentracija inokuluma u rasponu od 0,5 do  $2,5 \times 10^5$ , dakle 100 puta veća od one propisane od strane CLSI organizacije, EUCAST protokol smatra se prikladnijim za ispitivanje osjetljivosti gljivice *M. pachydermatis* te je zbog toga korišten u ovom istraživanju. Većina istraživanja pokazuje kako je vremenski period od 48 do 72 sata dovoljan za inkubaciju mikrotitracijskih ploča pri temperaturi od 32 do 37°C (PEANO i sur., 2017.) te je sukladno tome u ovom istraživanju odabrano trajanje inkubacije ploča od 72 sata. Iznimno je inkubacija produžena za dodatnih 24 sata prema preporuci RINCON i sur. (2006.) u slučaju šest ispitivanih sojeva zbog njihovog nedovoljnog rasta u bujonu definiranog vrijednošću njihovih pozitivnih kontrola ( $\leq 0,2$ ) nakon očitavanja vrijednosti apsorbancija spektrofotometrom (EUCAST, 2020.). Dok je očitavanje rezultata korištenjem spektrofotometra propisano od strane EUCAST organizacije, CLSI organizacija propisuje vizualan način očitavanja rezultata. Ono se temelji na zamućenju jažica uzrokovanom rastom gljivica u bujonu, a za rod *Malassezia* olakšano je zbog opisane tendencije stvaranja grudica, koje se u jažicama mikrotitracijskih ploča uočava stvaranjem nakupina na njihovom dnu (PEANO i sur., 2017.). Međutim, u radu PEANO i sur. (2017.) navodi se da se nakupine na dnu jažica uočavaju pri korištenju mikrotitracijskih ploča s zaobljenim dnom, dok se pri korištenju ploča s ravnim dnom koje su propisane za korištenje u dokumentu E.DEF 7.3.2 (EUCAST, 2020.), češće javlja uniformno zamućenje bez nastanka taloga biomase ove gljivice. Rješavanje problematike nastanka grudica, postizanje uniformnijeg zamućenja suspenzije inokuluma u mikrotitracijskim jažicama ravnog dna te pogodnosti pri spektrofotometrijskom očitavanju rezultata dodatni su razlozi zašto je za potrebe ovog istraživanja odabrana prilagodba E.DEF 7.3.2 dokumenta.

Raspon MIK vrijednosti dobivenih u ovom istraživanju iznosio je u rasponu od 0,5 do  $>32$  mg/L. Dobivena MIK50 vrijednost iznosila je 8 mg/L, a MIK90 32 mg/L. U svrhu provjere ponovljivosti rezultata svi sojevi ispitani su u triplikatu, a u svrhu kontrole kvalitete postupka korišteni su kontrolni sojevi. S obzirom da za rod *Malassezia* ne postoje definirane smjernice



kojima se može povezati određena optička gustoća suspenzije inokuluma s pripadajućom vrijednosti broja kolonija u mililitru (CFU/mL) inokuluma, provodila se kontrola radne koncentracije inokuluma. Navedenim postupcima maksimalno se osiguralo kvalitetno provođenje postupka unatoč odsutnosti standardiziranog postupka mikrodilucije u bujonu za vrstu *M. pachydermatis*. No, zbog navedenog nedostatka standardizacije u istraživanjima dolazi i do razlika u izvođenju postupka, poglavito u odabiru odgovarajućeg bujona za rast, radne koncentracije inokuluma, trajanja inkubacije mikrotitracijskih ploča i načina njihova očitavanja, a time i do razlika u rezultatima. Posljedično javljaju se poteškoće u usporedbi dobivenih rezultata i interpretacije osjetljivosti istraživanih sojeva roda *Malassezia*. Primjerice, u istraživanju SCHLEMMER i sur. (2018.) ispitana je osjetljivosti 30 sojeva gljivice *M. pachydermatis* na MCZ te je njihov raspon MIK vrijednosti iznosio od 0,5 do 16 mg/L, a geometrijska srednja vrijednost 2,25 mg/L, što je trostruko manje od geometrijske srednje vrijednosti dobivene u ovom istraživanju koja je iznosila 7,28 mg/L. Iako je korišten isti bujon u postupku mikrodilucije oba istraživanja, točnije obogaćeni Sabouraud bujon, u istraživanju SCHLEMMER i sur. (2018.) nije navedena konačna radna koncentracija inokuluma te vrijeme inkubacije mikrotitracijskih ploča, zbog čega nije moguće utvrditi točne razlike u izvođenju postupka kojima bi se eventualno mogle objasniti razlike u dobivenim rezultatima. Nadalje, raspon MIK vrijednosti u istraživanju PEANO i sur. (2012.) iznosio je od 0,03 do 16 mg/L, MIK50 vrijednost iznosila je 2 mg/L, a MIK90 4 mg/L. Uspoređujući s ovim istraživanjem, uočava se da su dobivene MIK vrijednosti u istraživanju PEANO i sur. (2012.) manje, odnosno da je osjetljivost njihovih sojeva bila veća. Do istog zaključka dolazi se i usporedbom s istraživanjem CHIAVASSA i sur. (2014.) u kojem je ispitana osjetljivost sveukupno 42 soja izdvojenih iz vanjskog zvukovoda pasa s dijagnosticiranom akutnom ili kroničnom upalom. Raspon MIK vrijednosti iznosio je od 1 do 8 mg/L, a vrijednosti MIK50 i MIK90 za sojeve izdvojene iz pasa s kroničnim otitisom bile su iste kao u istraživanju PEANO i sur. (2012.). Smanjena osjetljivost sojeva ispitanih u ovom istraživanju u usporedbi s navedenim istraživanjima posebice dolazi do izražaja uzimajući u obzir MIK vrijednost od 16 mg/L utvrđena u 25% sojeva, dok je u istraživanju PEANO i sur. (2012.) utvrđena tek u 3,9% sojeva, a u istraživanju CHIAVASSA i sur. (2014.) navedena MIK vrijednost nije uopće utvrđena. Uzrok navedenim razlikama u rezultatima mogle bi biti razlike u izvedbi postupka, pošto su oba spomenuta istraživanja koristila obogaćeni Christensen ureja bujon te radnu koncentraciju inokuluma veću od one u našem istraživanju, točnije njezin raspon iznosio je od 1 do  $5 \times 10^5$  CFU/mL. Iako je istraživanje PEANO i sur. (2012.) objavljeno iste godine kada i istraživanje CAFARCHIA i sur. (2012b) u kojem se dokazala prednost uporabe obogaćenog Sabouraud

bujona u odnosu na Christensen ureja bujon, nije obrazloženo zbog čega je ista skupina istraživača dvije godine kasnije ponovno koristila Christensen ureja bujon u svom istraživanju (CHIAVASSA i sur., 2014.). U oba istraživanja očitavanje mikrodilucijskog postupka provedeno je nakon inkubacije ploča tijekom 48 sati. Nadalje, većina istraživanja ukazuje kako se očitavanjem ploča nakon 48 i 72 sata ne dobiva statistički značajna razlika u rezultatima (PEANO i sur., 2020.). Iz navedenog se može zaključiti kako navedena vremenska razlika u očitavanju ne utječe na konačan rezultat ispitivanja osjetljivosti osim u slučajevima sojeva u kojih je općenito utvrđen sporiji rast. U nedavnom istraživanju NIAE i sur. (2021.) ispitana je osjetljivost 41 soja gljivice *M. pachydermatis* izdvojenih iz vanjskog zvukovoda mačaka na MCZ te su dobivene MIK vrijednosti iznosile u rasponu od 0,063 do  $\geq 32$  mg/L. Navedeno se slaže s rezultatima našeg istraživanja jer su dobivene vrijednosti također veće od onih dobivenih u istraživanjima PEANO i sur. (2012.) te CHIAVASSA i sur. (2014.), odnosno ukazuju na smanjenu osjetljivost sojeva. Iako je u istraživanju NIAE i sur. (2021.) korištena znatno niža konačna koncentracija inokuluma u jažicama ( $5 \times 10^3$ - $1 \times 10^4$  CFU/mL), korišten je obogaćeni Sabouraud bujon kao i u ovom istraživanju.

Provođenjem postupka mikrodilucije opisanim načinom u ovom istraživanju nije bilo moguće odrediti MIK vrijednosti za dva soja, jer najveća testna koncentracija MCZ (32 mg/L) nije inhibirala njihov rast u bujonu za  $\geq 50\%$ . U spomenutom istraživanju NIAE i sur. (2021.) u 24% sojeva također je bilo nemoguće očitati MIK vrijednost jer najveća korištena testna koncentracija MCZ od 32 mg/L nije inhibirala njihov rast za  $\geq 50\%$ . Navedeno se slaže s istraživanjima koja ukazuju na pojavu smanjene osjetljivosti odnosno rezistencije gljivice *M. pachydermatis* na azole (JESUS i sur., 2011., KANO i sur., 2019., NIJIMA i sur., 2011., WATANABE i sur., 2011.). Vrijednosti MIK50 i MIK90 služe kao pokazatelji distribucije MIK vrijednosti ispitanih sojeva, a u nekim istraživanjima se koriste i za interpretaciju kategorije osjetljivosti sojeva. Naime, soj se smatra osjetljivim ako je njegova MIK vrijednost manja od MIK50, umjeren osjetljiv ako se nalazi u rasponu MIK50 i MIK90 vrijednosti te rezistentan ako je MIK vrijednost viša od MIK90 vrijednosti (CAFARCHIA i sur., 2012a, NASCENTE i sur., 2009.). Problem s interpretacijom kategorije osjetljivosti sojeva je u tome da navedene vrijednosti nisu istovjetne koncentracijama koje se postižu prilikom topikalne primjene antimikotika. Naime, koncentracija MCZ u antimikoticima namijenjenim za topikalnu primjenu pri liječenju upale vanjskog zvukovoda i kože uzrokovanih gljivicom *M. pachydermatis* je i do 1000 puta veća od najveće testne koncentracije korištene u postupcima ispitivanja osjetljivosti (CHIAVASSA i sur. 2014., PEANO i sur., 2020.). Pojedine istraživačke skupine koristile su kriterije definirane za interpretaciju osjetljivosti gljivica iz roda *Candida* (CAFARCHIA i sur.,

2012b, JESUS i sur., 2011.) prema kojima se razlikuju tri kategorije osjetljivosti: osjetljiv, umjereno osjetljiv i rezistentan. Definicija kategorija osjetljivosti određena je na osnovu izloženosti spomenutih kvasaca određenom antifungalnom lijeku, njegove farmakokinetike i farmakodinamike prilikom korištenja u terapijske svrhe te predviđanja uspješnosti kliničkog liječenja. Primjena navedene interpretacije osjetljivosti za gljivice iz roda *Malassezia*, dakle na drugu vrstu patogena, ali i domaćina poput primjerice pasa i mačaka smatra se neadekvatnom te je potrebno razviti zasebne kriterije (CHIAVASSA i sur., 2014., PEANO i sur., 2020., REX i sur., 1997.). Zbog navedenih razloga, u ovom istraživanju testirane sojeve nije bilo moguće svrstati niti u jednu od tri kategorija. Nadalje, u slučaju dva ispitana soja nije se mogla odrediti MIK vrijednost na osnovu korištenih testnih koncentracija MCZ što ukazuje na vjerojatnu antimikrobnu, no ne i kliničku rezistenciju. Naime, postoji mogućnost da su ovi sojevi osjetljivi na visoke koncentracije MCZ koje se postižu topikalnom primjenom preparata antimikotika na koži, odnosno u vanjskom zvukovodu. U prilog kliničkoj rezistenciji govori istraživanje ANGILERI i sur. (2019.) koji su nisku osjetljivost te nemogućnost određivanja vrijednosti MIK sojeva gljivice *M. pachydermatis* na azole izravno povezali s neuspješnim kliničkim ishodom terapije. Konkretno radi se o psu koji je zbog neuspjeha u dijagnostici primarnog uzroka kroničnog dermatitisa uzrokovanog gljivicom *M. pachydermatis* podvrgnut dugogodišnjoj terapiji azolima kao jedinom načinu liječenja. Važno je napomenuti da je pojava smanjene osjetljivosti na azole utvrđena i u sojeva ove gljivice izdvojenih iz neonatalnih pacijenata (AL-SWEIH i sur., 2014.), a zbog činjenice izrazitog porasta incidencije fungemija uzrokovanih ovom gljivicom u ljudi zabilježenog u posljednja dva desetljeća ona se smatra ne samo oportunističkim već i emergentim patogenom (CELIS i sur., 2017.).

Uzimajući u obzir sve navedeno ovim se istraživanjem dodatno ističe potreba za razvijanjem standardiziranog postupka mikrodilucije u bujonu za rod *Malassezia* koji bi omogućio interlaboratorijsku usporedbu rezultata i jasniji uvid u problematiku pitanja rezistencije u vrste *M. pachydermatis*.

## 6. ZAKLJUČCI

1. Protokol ispitivanja osjetljivosti gljivice *M. pachydermatis* propisan EUCAST dokumentom E.DEF 7.3.2 pokazao se prikladnim za prilagodbu postupka mikrodilucije u bujonu za vrstu *M. pachydermatis*.
2. Sabouraud bujon s dodatkom polisorbata Tween 80 u koncentraciji od 1% i MOPS pufera predstavlja odgovarajući medij koji je osigurao adekvatan rast vrste *M. pachydermatis* neophodan za provođenje postupka mikrodilucije u bujonu.
3. Sojevi u kojih je utvrđena pretjerana mrvičavost stijenki kolonija te stvaranje grudica prilikom pripremanja radne suspenzije inokuluma inkubirani su kraće vrijeme odnosno 48 sati.
4. Rezultati istraživanja ukazali su na različite MIK vrijednosti istraženih sojeva *M. pachydermatis* koje su iznosile u rasponu od 0,5 do >32 mg/L, s MIK50 vrijednosti od 8 mg/L i MIK90 vrijednost 32 mg/L.
5. U dva soja *M. pachydermatis* utvrđena je MIK vrijednost >32 mg/L što ukazuje na njihovu rezistenciju na mikonazol koju je potrebno dodatno istražiti.
6. Potrebna su daljnja istraživanja osjetljivosti gljivice *M. pachydermatis* na većem broju sojeva te korištenjem većeg broja antimikotika u svrhu razvoja standardiziranog postupka mikrodilucije u bujonu za vrstu *M. pachydermatis* te razjašnjavanja problematike rezistencije u ove vrste.

## 7. LITERATURA

ÅBERG L., K. VARJONEN, S. ÅHMAN (2017): Results of allergen-specific immunotherapy in atopic dogs with *Malassezia* hypersensitivity: a retrospective study of 16 cases. *Vet. Dermatol.* 28, 633-e157.

ÅHMAN S. E., K. E. BERGSTÖRM (2009): Cutaneous carriage of *Malassezia* species in healthy and seborrheic Sphynx cats and a comparison to carriage in Devon Rex cats. *J. Feline Med. Surg.* 11, 970-976.

ÅHMAN S., N. PERINNS, R. BOND (2007): Carriage of *Malassezia spp.* yeasts in healthy and seborrhoeic Devon Rex cats. *Med Mycol.* 45, 449-55.

ALASTRUEY-IZQUIERDO A., M. S. C. MELHEM, L. X. BONFIETTI, J. L. RODRIGUEZ-TUDELA (2015): Susceptibility test for fungi: clinical and laboratorial correlations in medical mycology. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* 57, 57-64.

AL-SWEIH N., S. AHMAD, L. JOSEPH, S. KHAN, Z. KHAN (2014): *Malassezia pachydermatis* fungemia in a preterm neonate resistant to fluconazole and flucytosine. *Med. Mycol. Case Rep.* 5, 9-11.

ANGILERI M., M. PASQUETTI, M. DE LUCIA, A. PEANO (2019): Azole resistance of *Malassezia pachydermatis* causing treatment failure in a dog. *Med. Mycol. Case Rep.* 23, 58-61.

ARIKAN S. (2007): Current status of antifungal susceptibility testing methods. *Med. Mycol.* 45, 569-587.

BENSIGNOR E. (2006): Oral itraconazole as a pulse therapy for the treatment of canine *Malassezia* dermatitis: a randomised, blinded, comparative trial. *Prat. Méd. Chir. Anim. Comp.* 41, 69-72.

BENSIGNOR E., E. GRANDEMANGE (2006): Comparison of an antifungal agent with a mixture of antifungal, antibiotic and corticosteroid agents for the treatment of *Malassezia* species otitis in dogs. *Vet. Rec.* 158, 193-195.

BOND R. (2010): Superficial veterinary mycoses. *Clin. Dermatol.* 28, 226-36.

- BOND R., C. F. CURTIS, A. HENDRICKS, E. A. FERGUSON, D. H. LLOYD (2002): Intradermal test reactivity to *Malassezia pachydermatis* in atopic dogs. *Vet. Rec.* 150, 448-449.
- BOND R., C. F. CURTIS, E. A. FERGUSON, I. S. MASON, J. REST (2000): An idiopathic facial dermatitis of Persian cats. *Vet. Dermatol.* 11, 35-41.
- BOND R., R. M. ANTHONY (1995): Characterization of markedly lipid-dependent *Malassezia pachydermatis* isolates from healthy dogs. *J. Appl. Bacteriol.* 78, 537-542.
- BOND, R., D. O. MORRIS, J. GUILLOT, E. J. BENSIGNOR, D. ROBSON, K. V. MASON, R. KANO, P. B. HILL (2020): Biology, diagnosis and treatment of *Malassezia* dermatitis in dogs and cats Clinical Consensus Guidelines of the World Association for Veterinary Dermatology. *Vet Dermatol.* 31, 27-74.
- CAFARCHIA C., D. OTRANTO (2004): Association between Phospholipase Production by *Malassezia pachydermatis* and Skin Lesions. *J. Clin. Microbiol.* 42, 4868-4869.
- CAFARCHIA C., L. A. FIGUEREDO, R. IATTA, M. T. MONTAGNA, D. OTRANTO (2012a): In vitro antifungal susceptibility of *Malassezia pachydermatis* from dogs with and without skin lesions. *Vet. Microbiol.* 155, 395-398.
- CAFARCHIA C., R. IATTA, D. IMMEDIATO, M. R. PUTTILLI, D. OTRANTO (2015): Azole susceptibility of *Malassezia pachydermatis* and *Malassezia furfur* and tentative epidemiological cut-off values. *Med. Mycol.* 53, 743-748.
- CAFARCHIA C., S. GALLO, D. ROMITO, G. CAPELLI, R. CHERMETTE, J. GUILLOT, D. OTRANTO (2005): Frequency, body distribution and population size of *Malassezia* species in healthy dogs and in dogs with localized cutaneous lesions. *J. Vet. Diagn. Invest.* 17, 316-322.
- CAFARCHIA, C., L. A. FIGUEREDO, R. IATTA, V. COLAO, M. T. MONTAGNA, D. OTRANTO (2012b): *In vitro* evaluation of *Malassezia pachydermatis* susceptibility to azole compounds using E-test and CLSI microdilution methods. *Med. Mycol.* 50, 795-801.
- CANNIZZO F. T., E. ERASO, P. A. EZKURRA, M. VILLAR-VIDAL, E. BOLLO, G. CASTELLA, F. J. CABANES, V. VIDOTTO, G. QUINDOS (2007): Biofilm development by clinical isolates of *Malassezia pachydermatis*. *Med. Mycol.* 45, 357-361.

CHANG, H. J., H. L. MILLER, N. WATKINS, M. J. ARDUINO, D. A. ASHFORD, G. MIDGLEY, S. M. AGUERO, R. PINTO-POWELL, C. F. VON REYN, W. EDWARDS, M. M. MCNEIL, W. R. JARVIS (1998): An epidemic of *Malassezia pachydermatis* in an intensive care nursery associated with colonization of health care workers' pet dogs. N. Engl. J. Med. 338, 706-711.

CHEN T., P. B. HILL (2005): The biology of *Malassezia* organisms and their ability to induce immune responses and skin disease. Vet. Dermatol. 16, 4-26.

CHEN T., R. E. W. HALLIWELL, A. D. PEMBERTON, P. B. HILL (2002): Identification of major allergens of *Malassezia pachydermatis* in dogs with atopic dermatitis and *Malassezia* overgrowth. Vet. Dermatol. 13, 141-150.

CHIAVASSA, E., P. TIZZANI, A. PEANO (2014): *In vitro* antifungal susceptibility of *Malassezia pachydermatis* strains isolated from dogs with chronic and acute otitis externa. Mycopathologia 178, 315-319.

CHINN, R., A. PONG, K. SCHULTZ, J. KIM, C. WOERLE, N. CHOW, L. GADE, J. GLOWICZ, K. BEER, S. LOCKHART, B. JACKSON, A. LITVINTSEVA (2017): A cluster of fluconazole-resistant *Malassezia pachydermatis* in a neonatal intensive care unit - California, 2015-2016. Open Forum Infect. Dis. 4, 176-177.

CHOUHDURY, S., R. L. MARTE (2014): *Malassezia pachydermatis* fungaemia in an adult on posaconazole prophylaxis for acute myeloid leukaemia. Pathology 46, 466-467.

COLOMBO S., S. NARDONI, L. CORNEGLIANI, F. MANCIANTI (2007): Prevalence of *Malassezia spp.* yeasts in feline nail folds: a cytological and mycological study. Vet. Dermatol. 18, 287-283.

COUTINHO S. D., C. R. PAULA (2000): Proteinase, phospholipase, hyaluronidase and chondroitin-sulphate production by *Malassezia pachydermatis*. Med. Mycol. 38, 73-76.

CROSAZ O., A. LEGRAS, F. VILAPLANA-GROSSO, J. DEBEAUPUITS, R. CHERMETTE, B. HUBERT, J. GUILLOT (2013): Generalized dermatitis associated with *Malassezia* overgrowth in cats: A report of six cases in France. Med. Mycol. Case Rep. 2, 59-62

ČONKOVA E., M. PROŠKOVCOVA, P. VACZI, Z. MALINOVKSA (2022): In Vitro Biofilm Formation by *Malassezia pachydermatis* Isolates and Its Susceptibility to Azole Antifungals. J. Funct. Microbiol. 15, 1209.

DAVID M, M. GABRIEL, M. KOPECKÁ (2007): Microtubular and actin cytoskeletons and ultrastructural characteristics of the potentially pathogenic basidiomycetous yeast *Malassezia pachydermatis*. Cell. Biol. Int. 31, 16-23.

DEEGAN K. R., M. S. FONSECA, D. C. P. OLIVEIRA, L. M. SANTOS, C. C. FERNANDEZ, S. A. HANNA, B. A. S. MACHADO, M. A. UMSZA-GUEZ, R. MEYER, R. W. PORTELA (2019): Susceptibility of *Malassezia pachydermatis* Clinical Isolates to Allopathic Antifungals and Brazilian Red, Green, and Brown Propolis Extracts. Front. Vet. Sci. 6, 460.

EUCAST (2020): Definitive Document E.DEF 7.3.2: Method for determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts.

FAN, Y. M., W. M. HUANG, S. F. LI, G. F. WU, K. LAI, R. Y. CHEN (2006): Granulomatous skin infection caused by *Malassezia pachydermatis* in a dog owner. Arch. Dermatol. 142, 1181-1184.

FIGUEREDO L. A., C. CAFARCHIA, D. OTRANTO (2013): Antifungal susceptibility of *Malassezia pachydermatis* biofilm. Med. Mycol. 51, 863-867.

FOTHERGILL A. W. (2012): Antifungal Susceptibility Testing: Clinical Laboratory and Standards Institute (CLSI) Methods. U: Interactions of Yeasts, Moulds, and Antifungal Agents: How to Detect Resistance. (Hall G. S., ur.). Springer, New York?. str. 65-74.

FOX, H. (1925): Exfoliative dermatitis in the Indian rhinoceros (*Rhinoceros unicornis*) with respect to a new yeast species *Pityrosporum pachydermatis*. Report of the Laboratory and Museum of Comparative Pathology of the Zoological Society of Philadelphia. 51, 36-44.

GINEL P. J., R. LUCENA, J. C. RODRIGUEZ, J. ORTEGA (2002): A semiquantitative cytological evaluation of normal and pathological samples from external ear canals of dogs and cats. Vet. Dermatol. 13, 151-156.

GREENE, C. E. (2012): Infectious diseases of the dog and cat, 4th ed., Saunders Elsevier. 602-606.



- GUÉHO-KELLERMANN, E., T. BOEKHOUT, D. BEGEROW (2010): Biodiversity, phylogeny and ultrastructure, U: *Malassezia* and the skin: science and clinical practice. (Boekhout, T., E. Guého-Kellermann, P. Mayser, A. Velegraki, ur.). Springer, New York. str. 17-63.
- GUILLOT, J., R. BOND (1999): *Malassezia pachydermatis*: a review. Med. Mycol. 37, 295-306.
- GUILLOT, J., R. BOND (2020): *Malassezia* Yeasts in Veterinary Dermatology: An Updated Overview. Front. Cell. Infect. Microbiol. 10, 79.
- HUANG H. P., C. J. L. LITTLE, L. M. FIXTER (1993): Effects of fatty acids on the growth and composition of *Malassezia pachydermatis* and their relevance to canine otitis externa. Res. Vet. Sci. 55, 119-123.
- IANIRI G., J. HEITMAN, A. SCHEYNIUS (2018): The Skin Commensal Yeast *Malassezia globosa* Thwarts Bacterial Biofilms to Benefit the Host. J. Invest. Dermatol. 138, 1026-1029.
- IATTA R., M. R. PUTTILLI, D. IMMEDIATO, D. OTRANTO, C. CAFARCHIA (2017): The role of drug efflux pumps in *Malassezia pachydermatis* and *Malassezia furfur* defence against azoles. Mycoses. 60, 178-182.
- JAZIC E., K. S. COYNER, D. G. LOEFFLER, T. P. LEWIS (2006): An evaluation of the clinical, cytological, infectious and histopathological features of feline acne. Vet. Dermatol. 17, 134-140.
- JESUS, F. P. K., C. LAUTERT, R. A. ZANETTE, D. L. MAHL, M. I. AZEVEDO, M. L. S. MACHADO, V. DUTRA, S. A. BOTTON, S. H. ALVES, J. M. SANTURIO (2011): *In vitro* susceptibility of fluconazole-susceptible and -resistant isolates of *Malassezia pachydermatis* against azoles. Vet. Microbiol. 152, 161-164.
- KANO R., H. KAMATA (2019): Miconazole-tolerant strains of *Malassezia pachydermatis* generated by culture in medium containing miconazole. Vet. Dermatol. 31, 97-101.
- KANO R., S. YOKOI, N. KARIYA, K. OSHIMO, H. KAMATA (2019): Multi-azole-resistant strain of *Malassezia pachydermatis* isolated from a canine *Malassezia* dermatitis. Med. Mycol. 57, 346-350.

- KIM M., Y.-J. CHO, M. PAR, Y. CHOI, S. Y. HWANG, W. H. JUNG (2018): Genomic Tandem Quadruplication is Associated with Ketoconazole Resistance in *Malassezia pachydermatis*. J. Microbiol. Biotechnol. 28, 1937-1945.
- LAUTENBACH, E., I. NACHAMKIN, M. G. SCHUSTER (1998): *Malassezia pachydermatis* infections. N. Engl. J. Med. 339, 270.
- LEDBETTER E. C., J. K. STARR (2015) *Malassezia pachydermatis* keratomycosis in a dog. Med. Mycol. Case Rep. 10, 24-26.
- LEE J., Y. G. CHO, D. S. KIM, S. I. SCHOI, H. S. LEE (2019): First Case of Catheter-related *Malassezia pachydermatis* Fungemia in an Adult. 39, 99-101.
- LO K. L., W. S. ROSENKRANTZ (2016): Evaluation of cytology collection techniques and prevalence of *Malassezia* yeast and bacteria in claw folds of normal and allergic dogs. Vet. Dermatol. 27, 279-e67.
- MACHADO M. L. S., C. CAFARCHIA, D. OTRANTO, R. R. FERREIRA, S. P. BIANCHI, M. S. LATROFA, A. PARISI, L. FERREIRO (2010): Genetic variability and phospholipase production of *Malassezia pachydermatis* isolated from dogs with diverse grades of skin lesions. Med. Mycol. 48, 889-892.
- MACHADO M. L. S., L. FERREIRO, R. R. FERREIRA, L. G. CORBELLINI, M. DEVILLE, M. BERTHELEMY, J. GUILLOT (2011): *Malassezia* dermatitis in dogs in Brazil: diagnosis, evaluation of clinical signs and molecular identification. Vet. Dermatol. 22, 46-52.
- MATOUSEK J. L., K. L. CAMPBELL (2002): *Malassezia* Dermatitis. Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian. 24, 224-232.
- MAULDIN E. A., D. O. MORRIS, M. H. GOLDSCHMIDT (2002): Retrospective study: the presence of *Malassezia* in feline skin biopsies. A clinicopathological study. Vet. Dermatol. 13, 7-14.
- MAYNARD L., C. A. REME, S. VIAUD (2011): Comparison of two shampoos for the treatment of canine *Malassezia* dermatitis: a randomised controlled trial. J Small Anim Pract. 52, 566-572.

MORRIS D. O. (1999): *Malassezia* dermatitis and otitis. Vet. Clin. North. Am. Small. Anim. Pract. 29, 1303-1310.

MORRIS D. O., N. B. OLIVIER, E. J. ROSSER (1998): Type-1 hypersensitivity reactions to *Malassezia pachydermatis* extracts in atopic dogs. Am. J. Vet. Res. 59, 836-841.

MORRIS O. D. (2004): Medical therapy of otitis externa and otitis media. Vet. Clin. Small Anim. Pract. 34, 541-555.

MORRIS, D. O., K. O'SHEA, F. S. SHOFER, S. RANKIN (2005): *Malassezia pachydermatis* carriage in dog owners. Emerg. Infect. Dis. 11, 83-88.

NARDONI S., F. MANCIANTI, A. RUM, M. CORAZZA (2005): Isolation of *Malassezia* species from healthy cats and cats with otitis. J. Feline Med. Surg. 7, 141-145.

NEGRE A., E. BENSIGNOR, J. GUILLOT (2009): Evidence-based veterinary dermatology: a systematic review of interventions for *Malassezia* dermatitis in dogs. Vet. Dermatol. 20, 1-12.

NIAE S., C. YURAYART, N. THENGCHAI SRI, P. SATTASATHUCHANA (2021): Prevalence and *in vitro* antifungal susceptibility of commensal yeasts in the external ear canal of cats. BMC Vet. Res. 17, 288.

NIJIMA M., R. KANO, M. NAGATA, A. HASEGAWA, H. KAMATA (2011): An azole-resistant isolate of *Malassezia pachydermatis*. Vet. Microbiol. 149, 288-290.

NUTTALL T. J., R. E. W. HALLIWELL (2001): Serum antibodies to *Malassezia* yeasts in canine atopic dermatitis. Vet. Dermatol. 12, 327-332.

NUTTALL, T. (2016): Successful management of otitis externa. In Practice 38, 17-21.

ORDEIX L., F. GALEOTTI, F. SCARAMPELLA, C. DEDOLA, M. BARDAGI, E. ROMANO, A. FONDATI (2007): *Malassezia* spp. overgrowth in allergic cats. Vet. Dermatol. 18, 316-323.

PARK, M., S. PARK, W. H. JUNG (2021): Skin Commensal Fungus *Malassezia* and Its Lipases. J. Microbiol. Biotechnol. 31, 637-644.

PASQUETTI, M., E. CHIAVASSA, P. TIZZANI, P. DANESI, A. PEANO (2015): Agar diffusion procedures for susceptibility testing of *Malassezia pachydermatis*: Evaluation of

Mueller-Hinton agar plus 2% glucose and 0.5 µg/mL methylene blue as the test medium. *Mycopathologia* 180, 153-158.

PATERSON, S. (2016): Topical ear treatment - options, indications and limitations of current therapy. *J. Small Anim. Pract.* 57, 668-678.

PATTERSON A. P., L. A. FRANK (2002): How to diagnose and treat *Malassezia* dermatitis in dogs. *Veterinary Medicine*. 97, 612-622.

PEANO A., E. JOHNSON, E. CHIAVASSA, P. TIZZANI, J. GUILLOT, M. PASQUETTI (2020): Antifungal Resistance Regarding *Malassezia pachydermatis*: Where Are We Now?. *J. Fungi*. 6, 93.

PEANO, A., M. BECCATI, E. CHIAVASSA, M. PASQUETTI (2012): Evaluation of the antifungal susceptibility of *Malassezia pachydermatis* to clotrimazole, miconazole and thiabendazole using a modified CLSI M27-A3 microdilution method. *Vet. Dermatol.* 23, 131-135.

PEANO, A., M. PASQUETTI, P. TIZZANI, E. CHIAVASSA, J. GUILLOT, E. JOHNSON (2017): Methodological Issues in Antifungal Susceptibility Testing of *Malassezia pachydermatis*. *J. Fungi* 3, E37.

PFALLER M. A. (2012): Antifungal Drug Resistance: Mechanisms, Epidemiology, and Consequences for Treatment. *Am. J. Med.* 125, 3-13.

PINCHBECK L. R., A. HILLIER, J. J. KOWALSKI, K. W. KWOCKA (2002): Comparison of pulse administration versus once daily administration of itraconazole for the treatment of *Malassezia pachydermatis* dermatitis and otitis in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 220, 1807-1812.

PRADO M. R., E. H. S. BRITO, R. S. N. BRILHANTE, R. A. CORDEIRO, J. J. G. LEITE, J. J. C. SIDRIM, M. F. G. ROCHA (2008): Subculture on potato dextrose agar as a complement to the broth microdilution assay for *Malassezia pachydermatis*. *J. of Microbiol. Methods.* 75, 341-343.

PUIG L., M. R. BRAGULAT, G. CASTELLÁ, F. J. CABAÑES (2017): Characterization of the species *Malassezia pachydermatis* and re-evaluation of its lipid dependence using a synthetic agar medium. *PLoS One* 12, e0179148.

REX J. H., M. A. PFALLER, J. N. GALGANI, M. S. BARTLETT, A. E.-I. MAHMOUD, A. GHANNOUM, M. LANCASTER, F. C. ODDS, M. G. RINALDI, T. J. WALSH, A. L. BARRY (1997): Development of Interpretive Breakpoints for Antifungal Susceptibility Testing: Conceptual Framework and Analysis of In Vitro-In Vivo Correlation Data for Fluconazole, Itraconazole, and Candida Infections. Clin. Infect. Dis. 24, 235-237.

ROMAN J., P. BAGLA, P. REN, L. S. BLANTON, M. A. BERMAN (2016): *Malassezia pachydermatis* fungemia in an adult with multibacillary leprosy. Med. Mycol. Case Rep. 12, 1-3.

ROUGIER S., D. BORELL, S. PHEULPIN, F. WOEHRLE, B. BOISRAMÉ (2005): A comparative study of two antimicrobial/anti-inflammatory formulations in the treatment of canine otitis externa. Vet. Derm. 16, 299-307.

SAIJONMAA-KOULUMIES L. E., D. H. LLOYD (2002): Colonization of neonatal puppies by *Staphylococcus intermedius*. Vet. Dermatol. 13, 123-130.

SANGUINETTI M., B. POSTERARO, B. FIORI, S. RANNO, R. TORELLI, G. FADDA (2005): Mechanisms of azole resistance in clinical isolates of *Candida glabrata* collected during a hospital survey of antifungal resistance. Antimicrob. Agents. Chemother. 49, 668-679.

SCHLEMMER K. B., F. P. K. DE JESUS, E. S. LORETO, J. B. FARIAS, S. H. ALVES, L. FERREIRO, J. M. SANTURIO (2019): *In vitro* combination of antifungal agents against *Malassezia pachydermatis*. Med. Mycol. 1, 324-327.

SCHWARZ S., P. SILLEY, S. SIMJEE, N. WOODFOORD, E. V. DUIJKEREN, A. P. JOHNSON, W. GAASTRA (2010): Editorial: Assessing the antimicrobial susceptibility of bacteria obtained from animals. J. Antimicrob. Chemother. 65, 601-604.

TERAMOTO H., Y. KUMEDA, K. YOKOIGAWA, K. HOSOMI, S. KOZAKI, M. MUKAMOTO, T. KOHDA (2015): Genotyping and characterisation of the secretory lipolytic enzymes of *Malassezia pachydermatis* isolates collected from dogs. Vet. Rec. Open. 2, e000124.

THEELEN, B., C. CAFARCHIA, G. GAITANIS, I. D. BASSUKAS, T. BOEKHOUT, T. L. DAWSON (2018): *Malassezia* ecology, pathophysiology and treatment. Med. Mycol. 56, 10-25.

TRAGIANNIDIS A., G. BISPING, G. KOEHLER, A. H. GROLL (2010): Minireview: *Malassezia* infections in immunocompromised patients. *Mycoses*. 53, 187-195.

VLACHOS CH. G. GAITANIS, E. C. ALEXOPOULOS, C. PAPADOPOULOU, I. D. BASSUKAS (2013): Phospholipase activity after  $\beta$ -endorphin exposure discriminates *Malassezia* strains isolated from healthy and seborrhoeic dermatitis skin. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* 27, 1575-1578.

VOLK A. V., C. E. BELYAVIN, K. VARJONEN, M.-C. CADIERGUES, K. B. STEVENS, R. BOND (2010): *Malassezia pachydermatis* and *M. nana* predominate amongst the cutaneous mycobiota of Sphynx cats. *J. Feline Med. Surg.* 12, 917-922.

WATANABE S., A. KOIKE, R. KANO, M. NAGATA, C. CHEN, C. Y. HWANG, A. HASEGAWA, H. KAMATA (2014): *In vitro* susceptibility of *Malassezia pachydermatis* isolates from canine skin with atopic dermatitis to ketoconazole and itraconazole in East Asia. *J. Vet. Med. Sci.* 76, 579-581.

WELBEL S. F., M. M. MCNEIL, A. PRAMANIK, R. SILBERMAN, A. D. OBERLE, G. MIDGLEY, S. CROW, W. R. JARVIS (1994): Nosocomial *Malassezia pachydermatis* bloodstream infections in a neonatal intensive care unit. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 13, 104-108.

WU, G., H. ZHAO, C. LI, M. P. RAJAPAKSE, W. C. WONG, J. XU, C. W. SAUNDERS, N. L. REEDER, R. A. REILMAN, A. SCHERYNIUS, S. SUN, B. R. BILLMYRE, W. LI (2015): Genus-wide comparative genomics of *Malassezia* delineates its phylogeny, physiology, and niche adaptation on human skin. *PLoS genetics* 11, e1005614.

XU, J., C. W. SAUNDERS, P. HU, R. A. GRANT, T. BOEKHOUT, E. E. KURAMAE, J. W. KRONSTAD, Y. M. DEANGELIS, N. L. REEDER, K. R. JOHNSTONE, M. LELAND, A. M. FIENO, W. M. BEGLEY, Y. SUN, M. P. LACEY, T. CHAUDHARY, T. KEOUGH, L. CHU, R. SEARS, B. YUAN, T. L. DAWSON (2007): Dandruff-associated *Malassezia* genomes reveal convergent and divergent virulence traits shared with plant and human fungal pathogens. *Proc Natl Acad Sci USA.* 104, 18730-18735.

## 8. SAŽETAK

Nikola Mohorović

### Ispitivanje osjetljivosti sojeva gljivice *Malassezia pachydermatis* na mikonazol metodom mikrodilucije

Vrsta *Malassezia pachydermatis* zoofilni je kvasac koji prelazi iz komenzala u patogen prilikom pojave pogodnih uvjeta za njegovo prekomjerno umnažanje te u pasa i mačaka najčešće uzrokuje upalu vanjskog zvukovoda ili upale kože. Topikalna primjena antimikotika iz skupine azola poput mikonazola predstavlja uspješan način liječenja, no često dolazi do recedivirajućih oblika infekcija i razvoja kroničnog tijeka bolesti sa sve većim postotkom izdvajanja rezistentnih sojeva ove vrste. Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi osjetljivost vrste *M. pachydermatis* na antimikotik mikonazol metodom mikrodilucije u bujonu. U tu svrhu ispitano je 40 sojeva izdvojenih iz pasa i mačaka prilagođavajući standardizirani postupak mikrodilucije propisan dokumentom E.DEF 7.3.2 od strane Europskog odbora za istraživanje antimikrobne osjetljivosti. S obzirom na lipofilne odlike roda *Malassezia* korišten je Sabouraud bujon s dodatkom 1% polisorbata Tween 80. Konačna gustoća suspenzije inokuluma iznosila je 0,5 do 2,5 x10<sup>5</sup> kolonija u mililitru. Mikrotitracijske ploče inkubirane su tijekom 72 do 96 sati na 37°C, a očitavanje je provedeno spektrofotometrom. Raspon dobivenih vrijednosti minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) iznosio je od 0,5 do >32 mg/L. Antimikrobna rezistencija utvrđena je u dva soja čiji rast nije inhibirala ni najveća testna koncentracija antimikotika od 32 mg/L za ≥50%. Ovo istraživanje ukazuje na potrebu za razvojem standardiziranog postupka mikrodilucije u bujonu za rod *Malassezia* i dodatnim istraživanjima u cilju razjašnjenja ulogu rezistencije u ove vrste.

Ključne riječi: *M. pachydermatis*, mikrodilucija u bujonu, MIK

## 9. SUMMARY

Nikola Mohorović

### Testing the sensitivity of *Malassezia pachydermatis* strains to miconazole using the microdilution method

The species *Malassezia pachydermatis* is a zoophilic yeast that changes from a commensal to a pathogen when conditions are favorable for its excessive reproduction, and in dogs and cats it most often causes inflammation of the external auditory canal or inflammation of the skin. Topical application of antimycotics from the azole group, such as miconazole, is a successful method of treatment, but often recurring infection and the development of a chronic course of the disease occur, with an increasing percentage of resistant strains of this yeast species being isolated. The aim of this research was to determine the sensitivity of *M. pachydermatis* species to the antifungal agent miconazole using the broth microdilution method. For this purpose, 40 strains isolated from dogs and cats were tested by adapting the standardized microdilution procedure described by document E.DEF 7.3.2 of the European Committee for Antimicrobial Susceptibility Research. Considering the lipophilic characteristics of the genus *Malassezia*, Sabouraud broth with the addition of 1% polysorbate Tween 80 was used. The final density of the inoculum suspension was 0,5 to 2,5 x10<sup>5</sup> colony forming units per milliliter. The microtiter plates were incubated for 72-96 hours at 37°C, and the reading was performed with a spectrophotometer. The range of minimal inhibitory concentration (MIC) values obtained was from 0.5 to >32 mg/L. Antimicrobial resistance was determined in two strains whose growth was not inhibited even by the highest antifungal test concentration of 32 mg/L by  $\geq 50\%$ . This research points to the need for the development of a standardized broth microdilution procedure for the genus *Malassezia* and for additional research aimed at clarifying the role of resistance in these species.

Key words: *M. pachydermatis*, broth microdilution, MIC



## 10. ŽIVOTOPIS

Rođen sam 21.12.1996. u Puli. Srednjoškolsko obrazovanje stječem u Pazinskom kolegiju, smjer klasična gimnazija, nakon čega godine 2015. upisujem Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. U kolovozu 2020. radim na govedarskoj farmi Vrana d.o.o., a obaveznu stručnu praksu odrađujem u veterinarskoj ambulanti za male životinje i kućne ljubimce "Šegota". Godine 2021. sudjelujem u 9. međunarodnom kongresu "Veterinarska znanost i struka". Apsolventske godine provodim volontirajući na Klinici za zarazne bolesti Veterinarskog fakulteta, radom u veterinarskoj praksi za male životinje "ULTRA VET" te radom u poslovnici Zoo City.