

Sveučilište u Zagrebu

Veterinarski fakultet

Iva Benvin

Primjena disk difuzijskog postupka u ispitivanju osjetljivosti sojeva gljivice  
*Malassezia pachydermatis* izdvojenih iz pasa s kroničnom upalom zvukovoda

Zagreb, 2018.

Ovaj rad izrađen je u Mikološkom laboratoriju Zavoda za mikrobiologiju i zarazne bolesti s klinikom Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom doc. dr. sc. Suzane Hađine i predan je na natječaj Sveučilišta u Zagrebu za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2017./2018.

## **Popis i objašnjenje kratica**

SA - Sabouraudov agar

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

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

MIK - minimalna inhibicijska koncentracija

MH-GM - Mueller-Hintonov agar s dodatkom 2% glukoze i 0,5 µg/l metilenskog modrila

McF - McFarland jedinica

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

SAA - Sabouraudov agar s dodatkom aktidiona

MICOZ - mikonazol

CTRIM - klotrimazol

ITRAC - itrakonazol

S - osjetljiv (eng. *susceptible*)

I - umjereno osjetljiv (eng. *intermediate*)

R - otporan (eng. *resistant*)

# SADRŽAJ RADA

1. UVOD.....	1
2. HIPOTEZA .....	8
3. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA.....	9
4. MATERIJALI I METODE.....	10
4.1. Odabir sojeva gljivice <i>M. pachydermatis</i> i njihov uzgoj .....	10
4.2. Priprema suspenzije inokuluma .....	13
4.3. Određivanje broja kolonija (CFU/mL) nacjepljivanjem suspenzija inokuluma na hranjivu podlogu .....	13
4.4. Disk difuzijski postupak .....	15
4.5. Kontrola kvalitete disk difuzijskog postupka .....	16
4.6. Statistička analiza podataka .....	16
5. REZULTATI.....	17
5.1. Preciznost pripreme suspenzije inokuluma.....	17
5.2. Ponovljivost rezultata .....	18
5.3. Rezultati disk difuzijskog postupka .....	19
5.3.1. Rast gljivice <i>M. pachydermatis</i> na MH-GM agaru tijekom različitih duljina inkubacije i mjerenje zona inhibicije .....	19
5.3.2. Istraživanje osjetljivosti gljivice <i>M. pachydermatis</i> i tumačenje rezultata .....	21
6. RASPRAVA .....	23
7. ZAKLJUČCI.....	27
8. ZAHVALE .....	28
9. POPIS LITERATURE.....	29
10. SAŽETAK.....	35
11. SUMMARY .....	36
12. ŽIVOTOPIS .....	37

## 1. UVOD

Gljivica *Malassezia pachydermatis* fiziološki je stanovnik kože i sluznice vanjskog zvukovoda u pasa. Pripada koljenu *Basidiomycota*, podkoljenu *Ustilaginomycotina*, razredu *Exobasidiomycetes* ili prema nekim autorima zasebnom razredu *Malasseziomycetes* (WANG i sur., 2014.; WU i sur., 2015.), redu *Malasseziales* te porodici *Malasseziaceae*. Rod *Malassezia* trenutno broji sedamnaest vrsta, od kojih je njih sedam izolirano s kože i sluznica ljudi i životinja (*M. furfur*, *M. pachydermatis*, *M. sympodialis*, *M. globosa*, *M. obtusa*, *M. restricta* i *M. slooffiae*), četiri samo iz ljudi (*M. dermatis*, *M. japonica*, *M. yamatoensis* i *M. arunalokei* sp. nov.), te šest vrsta izoliranih samo sa životinja (*M. nana*, *M. caprae*, *M. equina*, *M. cuniculi*, *M. brasiliensis* sp. nov. i *M. psittaci* sp. nov.). Sve pripadnike gljivica iz roda *Malassezia* mikroskopski karakterizira debela višeslojna stanična stijenka koja je građena od šećera, proteina i lipida. Razmnožavaju se pupanjem, prilikom kojeg na jednom polu nastaje stanica kćerka koja svojim širokim dijelom ostaje vezana za matičnu stanicu. Zbog toga njihov oblik podsjeća na bocu te ih je u vidnom polju mikroskopa vrlo lako prepoznati (GUÉHO-KELLERMANN i sur., 2010.). *M. pachydermatis* je lipofilna vrsta u rodu *Malassezia* koja jedina za svoj metabolizam i rast ne treba nezasićene masne kiseline te raste na Sabouraudovom agaru (SA) koji sadrži peptone, glukozu i nešto lipida u tragovima (GUÉHO-KELLERMANN i sur., 2010.). Nakon inkubacije od 72 sata, narasle kolonije na hranjivoj podlozi su konveksnog oblika, promjera 4-5 mm, blijedožučkaste do krem boje, blago sjajne te glatke ili blago naborane. U vidnom polju mikroskopa uočavamo stanice tipičnog elipsoidnog do cilindričnog oblika (GUÉHO-KELLERMANN i sur., 2010.). Danas je poznato postojanje i atipičnih sojeva *M. pachydermatis* za koje je dokazano da su ovisni o mastima i za svoj rast trebaju izvore nezasićenih masnih kiselina (BOND i ANTHONY, 1995.; CRESPO i sur., 2000.; PUIG i sur., 2017.).

Virulentne čimbenike ove gljivice čine različiti enzimi pomoću kojih razgrađuje lipide što dovodi do oslobađanja slobodnih masnih kiselina koje posljedično mogu uzrokovati upalu kože i sluznice. Mnogi istraživači su ustanovili da *M. pachydermatis* izolirana iz upaljene sluznice zvukovoda ili kože proizvodi fosfolipazu i lipazu te da je aktivnost navedenih enzima povezana s nastankom tkivnih oštećenja (CAFARCHIA i OTRANTO, 2004.; JUNTACHAI i sur., 2009.; MACHADO i sur., 2010.; TERAMOTO i sur., 2015.). Uz fosfolipazu i lipazu, dokazana je proizvodnja i drugih enzima poput proteinaze, hondroitin-sulfataze te hijaluronidaze u sojeva izdvojenih iz pasa s otitisom ili dermatitisom (COUTINHO i PAULA, 2000.). Fosfolipaza, lipaza i proteinaza su enzimi ključni za razgradnju fosfolipida stanične

membrane, dok hondroitin-sulfataza i hijaluronidaza dovode do depolimerizacije hondroitin-sulfata i hijaluronske kiseline te na taj način sudjeluju u oštećenju vezivnog tkiva i pridonose prodoru i širenju uzročnika u tkiva (COUTINHO i PAULA, 2000.).

Upala sluznice vanjskog zvukovoda predstavlja jedan od najčešćih zdravstvenih problema u pasa, a sami uzroci upale mogu se podijeliti na primarne i sekundarne. Najčešći primarni uzroci upale su različite vrste preosjetljivosti poput alergije na hranu, atopijski ili kontaktni dermatitis, endokrinološki poremećaji (hipotireoidizam), autoimune ili imunosno-posredovane bolesti (pemfigus foliaceus, bulozni pemfigoid, diskoidni eritemski lupus i multiformni eritem), poremećaji keratinizacije (sebaceozni adenitis, primarna idiopatska seboreja), te ektoparaziti (*Otodectes cynotis*, *Demodex* sp.). Sekundarni uzroci su infekcije koje nastaju umnažanjem različitih vrsta bakterija (*Staphylococcus* sp., *Streptococcus* sp., *Enterococcus* sp., *Corynebacterium* sp., *Pseudomonas* sp., *Proteus* sp., *Escherichia coli*) i gljivica (PATERSON, 2016.), a najčešće izolirana je upravo *M. pachydermatis* (HENSEL i sur., 2009.). Predisponirajući čimbenici poput visećih uški u pojedinim pasmina, dlakavi i suženi zvukovodi, toplije godišnje doba, visoka vlažnost i kupanje, stvaraju idealne uvjete za njihovo prekomjerno umnažanje i pojavu kliničke slike upale sluznice vanjskog zvukovoda i kože (MILLER i sur., 2013.). Osim navedenog, primjena neodgovarajućih pripravaka za ispiranje zvukovoda te oštećenje njegovog epitela koje može nastati prilikom čišćenja uha ili čupanja dlačica, također značajno pridonose razvoju upale (HENSEL i sur., 2009.). Kronična upala zvukovoda definirana je kao upala koja traje dulje od dva mjeseca, te gdje je ustanovljena hiperplazija, hiperpigmentacija i eritem zvukovoda popraćen neugodnim mirisom i povećanom vlažnosti sluznice slušnog kanala (HENSEL i sur., 2009.). Liječenje uključuje dijagnosticiranje primarnih bolesti koje dovode do razvoja patoloških promjena u zvukovodima, identifikaciju i uklanjanje sekundarnih uzroka te prepoznavanje i eventualnu korekciju predisponirajućih čimbenika odgovornih za nastanak ove bolesti. Pravodobno otkrivanje uzroka koji je doveo do upale te ciljano liječenje predstavlja rješenje u sprječavanju povratka bolesti. Danas na tržištu postoji velik broj pripravaka namijenjenih liječenju upale sluznice zvukovoda što dodatno otežava odabir odgovarajućeg pripravka (PATERSON, 2016.). Veterinarski pripravci za liječenje infekcija uzrokovanih gljivicom *M. pachydermatis* najčešće sadrže poliene, azole ili alilamine. Većinom su kombinirani s antibioticima i kortikosteroidima u jedinstveni pripravak u obliku kapi ili masti namijenjenih za lokalnu upotrebu. Osim toga postoje i pripravci antimikotika za peroralnu upotrebu (tablete, kapsule) za sustavno liječenje gljivičnih infekcija. Tako NUTTALL (2016.) spominje upotrebu

itrakonazola, ketokonazola i terbinafina u liječenju upale vanjskog ili, ponekad, srednjeg uha uzrokovanog gljivicom *Malassezia* sp.. Lokalno liječenje je najčešći način terapije upale sluznice vanjskog zvukovoda i većinom uspješan prilikom primjene azolnih preparata poput mikonazola ili klotrimazola u kombinaciji s različitim antisepticima (CHIAVASSA i sur., 2014.). Azoli se dijele na imidazole (mikonazol, klotrimazol) i triazole (itrakonazol, flukonazol). Mehanizam djelovanja azola je ometanje biosinteze ergosterola što uzrokuje oštećenje stanične membrane gljivica. U kliničkoj praksi neuspjeh u liječenju ili ponovna pojava upale sluznice vanjskog zvukovoda je vrlo česta i to najčešće kada nije dijagnosticirana primarna bolest koja je dovela do razvoja upale ili nisu uspješno liječeni sekundarni uzroci, odnosno nisu korigirani predisponirajući čimbenici koji su pridonijeli njenoj pojavi (PATERSON, 2016.). U posljednje vrijeme neuspjeh u liječenju pripisuje se i soju koji je otporan na određeni antimikotik. Istraživanja provedena *in vitro* dokazala su da upotreba nižih koncentracija azola dovodi do smanjene osjetljivosti vrste *M. pachydermatis* prema tim preparatima, što upućuje da ova vrsta kvasca može razviti mehanizam rezistencije (NAKANO i sur., 2005.). BERNARDO i sur. (1998.) opisali su jedan soj *M. pachydermatis* koji je u disk difuzijskom postupku pokazao otpornost prema svim istraživanim antimikoticima, a to su bili klotrimazol, mikonazol, amfotericin B, ketokonazol, ekonazol te 5-fluorocitozin. JESUS i sur. (2011.) ustanovili su da je vrsta *M. pachydermatis* sposobna razviti otpornost prema flukonazolu, kada su istraživane životinje bile liječene istim antimikotikom kroz dulji vremenski period. Osim toga, ustanovili su da sojevi koji su bili otporni na flukonazol pokazuju unakrižnu otpornost i na sve preostale antimikotike iz skupine azola korištene u istraživanju, poput itrakonazola, ketokonazola i vorikonazola. Prvi slučaj otpornosti izolata *M. pachydermatis* na itrakonazol i ketokonazol, izdvojenog s kože psa s kliničkom slikom seboroičnog dermatitisa, opisali su NIJIMA i sur. (2011.).

Do danas još uvijek nije objašnjeno da li je uzrok neuspjeha u liječenju otpornost navedene gljivice prema korištenim antimikoticima, ili su predisponirajući čimbenici odgovorni za njen konstantan prekomjeran rast (PASQUETTI i sur., 2015.). Uz sve navedeno, važno je napomenuti da je do nedavno smatrano da zoofilna gljivica *M. pachydermatis* samo sporadično dovodi do pojave bolesti u ljudi. U većini slučajeva oboljele su imunokompromitirane jedinice poput novorođenčadi u intenzivnim jedinicama (CHANG i sur., 1998.; MORRIS i sur., 2005.). Međutim, u posljednjih desetak godina bilježi se značajan porast fungemija uzrokovanih vrstom *M. pachydermatis* i u odraslih osoba koje boluju od različitih bolesti primjerice lepromatozne gube (ROMAN i sur., 2016.) i akutne mijeloidne

leukemije (LAUTENBACH i sur., 1998.; CHOUDHURY i MARTE, 2014.). Uz navedeno, opisan je i slučaj gdje je *M. pachydermatis* izolirana iz granuloma na licu zdrave žene te iz cerumena i strugotina kože njenog psa (FAN i sur., 2006.). Nedavno istraživanje ne samo da opisuje pet slučajeva infekcije novorođenčadi s *M. pachydermatis*, izoliranih tijekom devet mjeseci na jedinicama intenzivne njege u Kaliforniji, već i da su svi izolirani sojevi bili otporni na flukonazol (CHINN i sur., 2017.). Tako da se danas taj oportunistički kvasac smatra i emergentnim patogenim mikroboom (CELIS i sur., 2017.). Zbog svega navedenoga, posljednjih godina ukazuje se sve više na potrebu istraživanja osjetljivosti gljivice *M. pachydermatis* kako u veterinarskoj tako i u humanoj medicini.

Posljednjih dvadesetak godina proces standardizacije postupaka za istraživanje osjetljivosti gljivica na antimikotike je u tijeku. U svrhu interlaboratorijske standardizacije i mogućnosti usporedbe ponovljivosti rezultata, mikološki laboratoriji koriste propisane postupke istraživanja i interpretacije osjetljivosti samo invazivnih vrsta kvasaca i to iz roda *Candida* i vrste *Cryptococcus neoformans*. U Americi postoje propisane smjernice od Instituta za kliničke i laboratorijske standarde (CLSI, eng. *Clinical and Laboratory Standards Institute*) M44-A2, a u Europi od Europskog odbora za istraživanje antimikrobne osjetljivosti (EUCAST, eng. *European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing*) dokument EDef 7.3.1 (PEANO i sur., 2017.). Za istraživanje osjetljivosti spomenutih kvasaca propisane su navedene smjernice s uputama za određivanje minimalnih inhibicijskih koncentracija antimikotika postupkom makrodilucije i mikrodilucije u bujonu te za disk difuzijski postupak. U laboratorijima se vrlo često upotrebljava postupak mikrodilucije u bujonu kojim se određuju minimalne inhibicijske koncentracije (MIK) antimikotika. On omogućava dobivanje kvantitativnih rezultata, odnosno određuje najnižu koncentraciju antimikotika u  $\mu\text{g/mL}$  koja sprječava rast istraživane gljivice. Za provedbu navedene metode potrebne su mikrolitarske količine suspenzije inokuluma i reagensa. S obzirom da se navedena metoda radi u mikrotitracijskim pločama istodobno je moguće ispitati velik broj sojeva. Prednost ovog postupka je očitavanje rezultata spektrofotometrijski gdje je uz pomoć računalnog programa omogućen izravan prijenos podataka na računalo (EUCAST, 2017.). Nedostatak je što je za razliku od disk difuzijskog postupka, znatno skuplja i složenija metoda za provedbu u dijagnostičkim laboratorijima. Osim što zahtijeva posebnu opremu, potrebna je i posebna edukacija laboratorijskog osoblja. Za razliku od mikrodilucije u bujonu, disk difuzijski postupak istraživanja osjetljivosti je praktičniji jer je jednostavniji za izvedbu i korištenje u rutinskoj laboratorijskoj dijagnostici. S obzirom da se svaki soj gljivice ispituje zasebno,



rezultati analize dobiju se znatno brže, a i ekonomski je isplativiji. Nedostatak ove metode je manja preciznost te subjektivna interpretacija mjerenja promjera zone inhibicije. Naime, kod pojedinih antimikotika nije u potpunosti jasno vidljiva granica zone inhibicije jer se na granici prijelaza zone inhibicije (zone bez vidljivog rasta gljivica) i ravnomjernog rasta kolonija pojavljuju kolonije neuobičajeno malene veličine što kod dvije ili više osoba prilikom očitavanja promjera zone inhibicije može rezultirati svrstavanjem rezultata u pogrešnu kategoriju osjetljivosti (CLSI, 2009.). Važno je napomenuti da do danas ne postoje ni CLSI niti EUCAST smjernice za istraživanje osjetljivosti vrste *M. pachydermatis*. Problem nastaje ukoliko se navedenim propisanim protokolima želi istražiti njena osjetljivost što je tijekom godina rezultiralo upotrebom različitih metoda: makrodilucije i mikrodilucije u bujonu, dilucija u hranjivim podlogama, disk difuzijskog postupka i E testa (PEANO i sur., 2017.). Naime, kriteriji prema CLSI-u i EUCAST-u nisu u potpunosti primjenjivi na navedenu gljivicu zbog njenog sporijeg rasta u odnosu na vrste *Candida* sp. i tendencije stvaranja grudica prilikom pripreme inokuluma, zbog čega je otežano napraviti homogenu suspenziju. U različitim istraživanjima postupci istraživanja osjetljivosti *M. pachydermatis* prilagođavani su na način da su se koristile hranjive podloge različitog sastava, različite vrijednosti gustoća suspenzija inokuluma te različite duljine inkubacije. Osim toga, koristili su se diskovi različitih proizvođača koji su sadržavali različite koncentracije istraživanih antimikotika. U nekim radovima spominje se upotreba hranjivih podloga poput SA (ROUGIER i sur., 2005.; LYSKOVA i sur., 2007.), SA s dodatkom 1% Tweena 80 (CAFARCHIA i sur., 2012.), SA s dodatkom 1,5% ekstrakta kvasca i 1% Tweena 80 (LORENZINI i sur., 1985.), modificiranog Dixonovog agara (JAGIELSKI i sur., 2014.) ili Casitone agara (BERNARDO i sur., 1998.). Međutim, nedavna istraživanja ukazala su da interpretacija zone inhibicije na navedenim podlogama nije toliko jednostavna i jasna kao na Mueller-Hintonovom agaru s dodatkom 2% glukoze i 0,5 µg/l metilenskog modrila (MH-GM) (PASQUETTI i sur., 2015.). Također u dosadašnjim istraživanjima osjetljivosti disk difuzijskim postupkom, korištene su suspenzije kultura različite starosti, te se navode različite vrijednosti optičke gustoće izražene u McFarland jedinicama (McF) ili vrijednosti broja kolonija u mililitru (CFU/mL, eng. *colony forming units per milliliter*) suspenzije inokuluma koje ne djeluju konzistentno. Primjerice, u nedavnom istraživanju osjetljivosti koristila se suspenzija inokuluma optičke gustoće 0,5 McF koja je odgovarala koncentraciji od 1 do  $5 \times 10^6$  CFU/mL (YURAYART i sur., 2013.). Za razliku od njih, ROJAS i sur. (2016.) upotrijebili su suspenziju inokuluma optičke gustoće 1 McF što je u njihovom istraživanju odgovaralo koncentraciji od  $1 \times 10^6$  CFU/mL, dok je talijanska skupina istraživača koristila 2,4 McF što je odgovaralo broju od 1 do  $5 \times 10^6$

CFU/mL (CAFARCHIA i sur., 2012.). U pojedinim istraživanjima navedena je samo optička gustoća ili samo broj kolonija u mililitru, primjerice korištena koncentracija u rasponu od 1 do  $5 \times 10^7$  CFU/mL (PASQUETTI i sur., 2015.) odnosno optička gustoća od 2 McF (BERNARDO i sur., 1998.) i 5 McF (JAGIELSKI i sur., 2014.). Iz navedenoga je vidljivo da je riječ o različitim vrijednostima optičkih gustoća korištenih u disk difuzijskom postupku te da ne postoji neka očekivana proporcionalna povezanost optičkih gustoća s brojem kolonija u mililitru. Osim toga, za pripremu suspenzija inokuluma korištene su i različite koncentracije Tween-a, koji osim što je izvor lipida za optimalan rast vrste *M. pachydermatis*, predstavlja i deterdžent koji olakšava pripremu homogene suspenzije inokuluma istraživane gljivice. Tako su RINCÓN i sur. (2006.) koristili sterilnu destiliranu vodu s 0,04% Tween-a 80, a PEANO i sur. (2012.) i PASQUETTI i sur. (2015.) Christensenov urea bujon s 0,1% Tween-a 80 i 0,5% Tween-a 40. Upravo ovi nedostaci u standardizaciji metodologije i interpretacije za istraživanje osjetljivosti navedene gljivice dovode u pitanje pouzdanost dosadašnjih različitih istraživanja osjetljivosti provedenih *in vitro* i mogućnost postojanja klinički značajne otpornosti izolata *M. pachydermatis* (CHIAVASSA i sur., 2014.; PASQUETTI i sur., 2015.). Zbog prethodno navedenih činjenica neki izolirani soj koji se *in vivo* smatra otpornim, može primjenom nekih od navedenih *in vitro* postupaka istraživanja osjetljivosti u različitim uvjetima izgledati osjetljiv, ali i obratno (PEANO i sur., 2017.). Zadnjih godina počeo se koristiti modificirani disk difuzijski postupak za istraživanje osjetljivosti vrste *M. pachydermatis*, standardiziran za kvasac *Candida* sp. CLSI dokumentom M44-A2 (CLSI, 2009.). Rezultati su pokazali da se modifikacijom navedenog postupka mogu dobiti vrijednosti zona inhibicije koje statistički značajno koreliraju s vrijednostima MIK-ova izraženih u  $\mu\text{g/mL}$  za istraživani antimikotik (PASQUETTI i sur., 2015.). Nadalje, upotreba MH-GM agara značajno olakšava interpretaciju promjera zone inhibicije. Naime, zbog njegovog plavkastog obojenja granice zone inhibicije jasno su vidljive (CLSI, 2009.). U većini istraživanja u kojima su uspoređivali mikrodiluciju u bujonu i disk difuzijski postupak ustanovljena je visoka korelacija između tih dviju metoda istraživanja osjetljivosti vrste *M. pachydermatis* (VANDERBOSSCHE i sur., 2002.; PASQUETTI i sur., 2015.; PEANO i sur., 2017.). Za razliku od većine, YURAYART i sur. (2013.) pri istraživanju osjetljivosti gljivice *M. pachydermatis* izolirane s kože zdravih pasa i pasa sa seboroičnim dermatitisom na različite vrste antimikotika (itraconazol, ketokonazol, nistatin i terbinafin) ustanovili su nisku korelaciju između rezultata dobivenih disk difuzijskim postupkom i mikrodilucijom u bujonu smatrajući je posljedicom podjednake osjetljivosti sojeva na spomenute antimikotike. Sve do sada navedeno ukazuje na mogućnost upotrebe disk difuzijskog postupka u rutinskoj

laboratorijskoj dijagnostici, ali i za epidemiološka istraživanja u svrhu istraživanja osjetljivosti navedene gljivice prema antimikoticima (PEANO i sur., 2017.).

## 2. HIPOTEZA

Upala sluznice vanjskog zvukovoda u pasa vrlo je često uzrokovana oportunistički patogenom gljivicom *M. pachydermatis* koja zahtijeva dugotrajno liječenje s različitim antimikoticima, najčešće iz skupine azola. Liječenje se najčešće provodi lokalno kapima za uši, a kod životinja s kliničkom slikom atopijskog dermatitisa često se primjenjuje i s peroralnom terapijom. Zadnjih godina ustanovljena je pojava smanjene osjetljivosti određenih genskih tipova vrste *M. pachydermatis* na antimikotike iz skupine azola (NIJIMA i sur., 2011.) upućujući na hipotezu da bi pojava recidivirajućih otitisa mogla biti povezana s rezistentnim sojevima vrste *M. pachydermatis* (CAFARCHIA i sur., 2012.). Osim toga, ustanovljeno je da će tretiranje gljivice *M. pachydermatis* nižim koncentracijama nistatina, ketokonazola i terbinafina tijekom izmjene 30 generacija, dovesti do njene smanjene osjetljivosti ukazujući na sposobnost razvoja mehanizma rezistencije (NAKANO i sur., 2005.). Prema najnovijim literaturnim podacima CHINN i sur. (2017.) ističu infekciju novorođenčadi sa sojevima *M. pachydermatis* rezistentnim na flukonazol.

Alarmirajući porast rezistencije brojnih bakterijskih vrsta upozorenje je da i u primjeni antimikotičkih pripravaka valja biti oprezan, posebice s obzirom na sve učestaliju pojavu smanjene otpornosti i u gljivičnih vrsta. U ovom istraživanju pretpostavka je da bi sojevi *M. pachydermatis* izolirani iz vanjskog zvukovoda u pasa s kroničnom upalom mogli ukazati na različiti stupanj osjetljivosti na najčešće upotrebljavane antimikotike u Republici Hrvatskoj. Za očekivati je da će se navedena hipoteza moći potvrditi disk difuzijskim postupkom kojega je potrebno prilagoditi u svrhu postizanja konzistentnih i ponovljivih rezultata.

### 3. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA

Opći cilj ovog istraživanja bio je prilagoditi disk difuzijski postupak propisan dokumentom CLSI M44-A2 za kvasac *Candida* sp. (CLSI, 2009.), u svrhu dobivanja pouzdanih i ponovljivih rezultata istraživanja osjetljivosti gljivice *M. pachydermatis in vitro*. Navedeni cilj sadržavao je nekoliko različitih eksperimenata:

1. U prvoj skupini eksperimenata standardizirali smo gustoću inokuluma i istraživali ponovljivost rezultata u svrhu dobivanja konzistentnih vrijednosti broja kolonija u mililitru ispitivane suspenzije (CFU/mL) i mjerenja optičke gustoće u McF jedinicama. Navedeno je utvrđeno naciepljivanjem inokuluma na Sabouraudov agar s dodatkom aktidiona (SAA) i statističkom analizom dobivenih podataka.
2. U drugoj skupini eksperimenata ispitivala se pogodnost i upotrebljivost podloge Mueller-Hintonovog agara s dodatkom glukoze i metilenskog modrila (MH-GM) za upotrebu u disk difuzijskom postupku. Tako je praćen rast navedene gljivice na MH-GM podlozi, potrebno vrijeme inkubacije, te čitljivost promjera zona inhibicije.

Specifični ciljevi bili su sljedeći:

1. Istražiti osjetljivost sojeva gljivice *M. pachydermatis* izdvojenih iz pasa s kliničkom slikom kroničnog otitisa na antimikotike koji pripadaju u skupinu azola (mikonazol, klotrimazol, itrakonazol).
2. Usporediti dobivene vrijednosti s rezultatima dosadašnjih istraživanja.
3. Uspostaviti navedenu metodu za rutinsku upotrebu u dijagnostici, ali i za daljnja epidemiološka istraživanja.

## 4. MATERIJALI I METODE

### 4.1. Odabir sojeva gljivice *M. pachydermatis* i njihov uzgoj

Ovo istraživanje je provedeno na 60 arhiviranih sojeva gljivice *M. pachydermatis* pohranjenih u Mikološkom laboratoriju Zavoda za mikrobiologiju i zarazne bolesti s klinikom Veterinarskoga fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu. Istraživani sojevi izdvojeni su naciepljivanjem obrisaka sluznice zvukovoda na SAA hranjivu podlogu za uzgoj gljivica. Nakon inkubacije u trajanju od 72 sata narasle kolonije identificirane su na osnovi njihovog makroskopskog izgleda. U sljedećem koraku, napravljeni su razmasci obojeni po Diff Quiku (BioGnost, Hrvatska) te su mikroskopski utvrđene stanice elipsoidnog oblika tipične za gljivice iz roda *Malassezia*. Njihov rast na SAA agaru bez dodatka lipida bila je potvrda identifikacije vrste *M. pachydermatis* (GUÉHO-KELLERMANN i sur., 2010.). Broj naraslih kolonija *M. pachydermatis* u Petrijevoj zdjelici izražen je kao broj križića (Tablica 1). Nakon identifikacije, sojevi gljivice *M. pachydermatis* pohranjeni su na -20 °C u Sabouraud bujonu s dodatkom 15% glicerola u Eppendorf epruvetama. Odabir arhiviranih sojeva načinjen je na osnovu anamnestičkih podataka iz kojih je bilo vidljivo da psi imaju problema s učestalim i dugotrajnim upalama sluznice vanjskog zvukovoda koje nisu prolazile niti nakon nekoliko uzastopnih lokalnih i/ili sustavnih terapija (Tablica 1). Upale su bile uzrokovane samo s gljivicom *M. pachydermatis* ili u kombinaciji navedene gljivice s različitim bakterijama, najčešće *Staphylococcus* spp. (podaci nisu prikazani). Osim toga, otoskopskim pregledom ustanovljena je hiperplazija, hiperpigmentacija i eritem zvukovoda popraćeni neugodnim mirisom i povećanom količinom tamnosmeđeg pastoznog cerumena koji je čest pri kroničnoj upali zvukovoda (HENSEL i sur., 2009.).

**Tablica 1.** Podrijetlo istraživanih sojeva gljivice *M. pachydermatis* izoliranih iz desnog (D) i/ili lijevog (L) uha pasa s kroničnom upalom sluznice zvukovoda.

Uzorak	Pasma	Spol	Dob (god.)	Broj kolonija*		Prijašnja terapija	
				L	D	Lokalna terapija	Sustavna terapija
1	križanac	M	12	+++	+++	Otifree® otop. za ispiranje uha, Mitex® kapi	Enroxil® tbl.
2	križanac	M	3	+++	+++	Otodine® otop. za ispiranje uha	Cefaleksin® caps.
3	križanac	M	4	+++	+	nepoznato	nepoznato
4	križanac	Ž	10	–	+	Surolan® kapi, 3% hidrogen peroksid	Ampicilin inj.
5	križanac	Ž	15	–	+	srebrni nitrat	–
6	križanac	Ž	5	–	++	Aurizon® kapi	–
7	križanac	Ž	1	+++	+++	nepoznato	nepoznato
8	križanac	Ž	4	+++	+	nepoznato	nepoznato
9	križanac	Ž	7,5	–	++	Mitex® kapi, Otifree® otop. za ispiranje uha	–
10	zapadno-škotski bijeli terijer	M	14	+	+++	kapi EDTA+gentamicin	Enroxil® tbl.
11	zapadno-škotski bijeli terijer	Ž	8	–	+	Otodine® otop. za ispiranje uha, Canesten® otop.	Medrol® tbl.
12	zapadno-škotski bijeli terijer	M	14	+	–	nepoznato	nepoznato
13	zapadno-škotski bijeli terijer	M	6	+++	–	Otonazol® kapi	antibiotik inj.
14	Cavalier King Charles španijel	M	6	++	–	–	Klavocin® inj.
15	Cavalier King Charles španijel	M	6	+	–	nepoznato	nepoznato
16	Cavalier King Charles španijel	M	6	+	–	kapi EDTA+gentamicin	–
17	Cavalier King Charles španijel	M	5	+	+++	3% hidrogen peroksid	–
18	rotvajler	Ž	11	+	+	Otonazol® kapi	–
19	rotvajler	Ž	4	++	+++	Otonazol® kapi, Otodine® otop. za ispiranje uha	–
20	rotvajler	M	4	+++	+++	kapi, Oridermyl® mast	–
21	labrador retriever	M	10	++	+++	nepoznato	nepoznato
22	labrador retriever	M	1,5	+++	+++	nepoznato	nepoznato
23	labrador retriever	Ž	6	+++	++	Otodine® otop. za ispiranje uha	–
24	njemački kratkodlaki ptičar	Ž	1,5	+++	–	nepoznato	nepoznato
25	njemački kratkodlaki ptičar	M	4	++	+	nepoznato	nepoznato

26	akita	M	nepoznato	ϕ	++	Oridermyl® mast	–
27	akita	M	6	ϕ	+++	nepoznato	nepoznato
28	bernski planinski pas	Ž	12	+++	+	nepoznato	nepoznato
29	bernski planinski pas	Ž	6	–	+	nepoznato	nepoznato
30	tornjak	Ž	8	+++	ϕ	nepoznato	nepoznato
31	newfoundlander	Ž	4	–	+	Mitex® kapi	–
32	velški terijer	Ž	8	+++	+++	-	deksametazon i Klavuxil® inj.
33	weimarski ptičar	Ž	10	ϕ	++	Otomax® kapi	–
34	malteški psić	M	6	+++	–	Aurizon® kapi, Mitex® kapi	–
35	francuski buldog	M	6	++	+	Mitex® kapi, Aurizon® kapi	–
36	njemački ovčar	Ž	7	++	–	nepoznato	nepoznato
37	američki staford terijer	Ž	5	+++	–	3% hidrogen peroksid	–
38	lagotto romagnolo	Ž	2,5	+	+	Canesten® otop.	–
39	staroengleski ovčar	M	4	++	++	Aurizon® kapi, 3% hidrogen peroksid	–
40	srednji pudl	M	5	+++	–	nepoznato	nepoznato
41	zlatni retriever	M	11,5	+	–	Otodine® otop.za ispiranje uha	–
42	bigl	M	6,5	–	+++	Otozyme® krema, Otifree® otop. za ispiranje uha	–
43	argentinska doğa	Ž	1,5	–	+	Mitex® kapi	–

\*broj izraslih kolonija određen je brojem križića: +=1-25 CFU/ploči; ++=25-100 CFU/ploči; +++=>100 CFU/ploči;

– = negativan nalaz; ϕ = nije uzorkovano



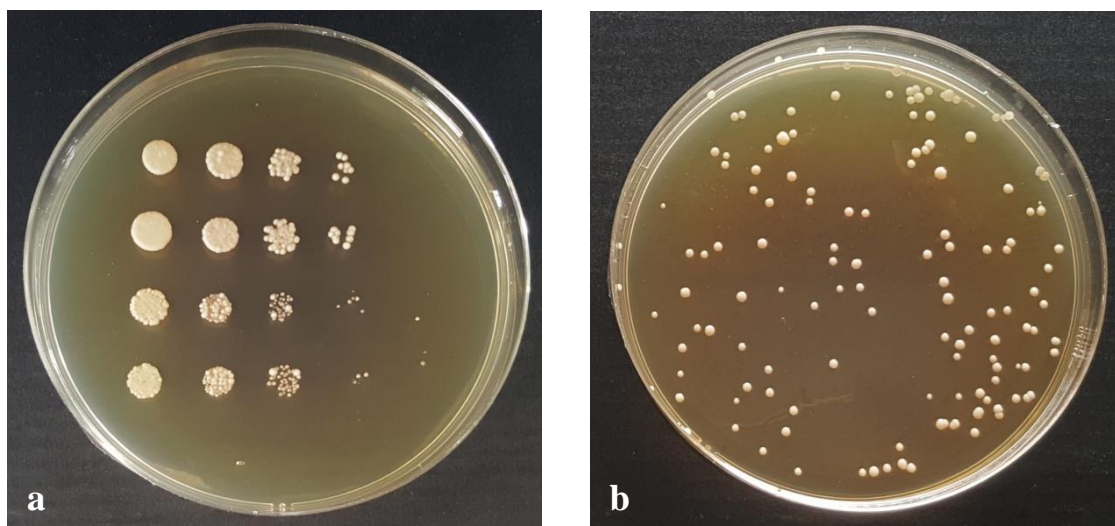
## **4.2. Priprema suspenzije inokuluma**

Za pripremu suspenzije inokuluma korištene su 72 sata stare kulture *M. pachydermatis* naciepljene na SAA te inkubirane na 37 °C. Inokulum je pripremljen na način da se sterilnom ezom pažljivo zahvatilo četiri do pet kolonija gljivica s hranjive podloge i razmazalo uz rub epruvete u kojoj se nalazilo 5 mL sterilne fiziološke otopine (0,9% NaCl) s dodatkom 0,04% Tween-a 80 (radna otopina). Radi dobivanja što homogenije suspenzije kvasca, suspenzija je dobro promiješana na miješalici pri najjačoj brzini kroz petnaestak sekundi. U svrhu optimizacije inokuluma, pripremljene su suspenzije različitih zamućenja od četrdeset i četiri istraživanih sojeva (0,5 McF, 0,9 McF, 1 McF, 1,6 McF, 1,7 McF, 2 McF, 2,1 McF, 2,27 McF, 2,65 McF, 3,1 McF, 3,3 McF, 3,5 McF, 3,8 McF), te njihova deseterostruka serijska razrjeđenja, izražena kao optička gustoća u McF jedinicama. Zamućenja su izmjerena fotometrijski u denzitometru (DEN-1B, Densitometer, Biosan, Latvija). Svako razrjeđenje naciepljeno je na SAA podlogu u svrhu određivanja broja naraslih kolonija u mililitru suspenzije i njihova povezanost s vrijednostima optičke gustoće. U namjeri da se dobije još detaljniji uvid u odnos deseterostrukih serijskih razrjeđenja suspenzije inokuluma i njihova zamućenja, spektrofotometrom (Helios Gamma UV-Vis Spectrophotometer, Thermo Electron Corporation) su izmjerene vrijednosti apsorbancije pri valnoj duljini od 600 nm. Navedena turbidimetrijska metoda primijenjena je na najčešće korištenu optičku gustoću od 0,5 McF (CLSI, 2009.; YURAYART i sur., 2013.) i 3,5 McF koja je u ovom istraživanju odgovarala preporučenom broju kolonija za disk difuzijski postupak u rasponu od 1 do  $5 \times 10^7$  CFU/mL (PASQUETTI i sur., 2015).

## **4.3. Određivanje broja kolonija (CFU/mL) naciepljivanjem suspenzija inokuluma na hranjivu podlogu**

Imajući u vidu prije opisane poteškoće u postizanju homogene suspenzije navedenog kvasca koja je neophodna za daljnji rad, za svaki nasumično odabrani uzorak određivali smo točan broj kolonija u jednom mililitru suspenzije. U ovom postupku broj kolonija u mililitru suspenzije inokuluma određen je brojenjem izraslih kolonija na hranjivoj podlozi iz serijskih razrjeđenja suspenzije uzorka. Deseterostruka serijska razrjeđenja pripremljena su na način da je pipetom iz epruvete u kojoj se nalazila početna suspenzija odgovarajuće optičke gustoće preneseno 200  $\mu$ l suspenzije u epruvetu br. 1 s 1800  $\mu$ l radne otopine da bi se dobilo razrjeđenje 1:10. Priređena epruveta dobro je promiješana na miješalici tijekom 15 sekundi, te je iz epruvete br. 1 preneseno 200  $\mu$ l suspenzije u epruvetu br. 2 koja je sadržavala 1800  $\mu$ l

radne otopine čime se dobilo razrjeđenje 1:100. Na isti način pripremljeno je sveukupno pet serijskih razrjeđenja, od 1:10 do 1:100 000. Iz epruveta u kojima su se nalazila različita razrjeđenja otpipetirano je 5  $\mu$ l suspenzije i naciepljeno na osnovu sheme na svježe pripremljenu SAA hranjivu podlogu u svrhu dobivanja CFU/mL (Slika 1a). Ukupan broj kolonija izračunat je na način da se broj izbrojenih kolonija pomnožio s brojem radnog razrjeđenja te podijelio s volumenom suspenzije uzorka. Dobiveni broj pomnožen je s 1000  $\mu$ l radi dobivanja ukupnog broja kolonija u jednom mililitru. Radi malog volumena suspenzije uzorka inokuluma od 5  $\mu$ l naciepljenog na hranjivu podlogu, nije uvijek bilo moguće izbrojiti broj kolonija u razrjeđenju 1:100 000. Zbog toga, rađene su i dvostruke kontrole uzoraka suspenzija inokuluma na način da je na cijelu površinu SAA podloge naciepljen 1 mL u razrjeđenju 1:100 000 kod kojih je gustoća iznosila odgovarajućih 30 do 300 naraslih kolonija te je omogućila brojenje svih naraslih kolonija na podlozi (Slika 1b). Preliminarni rezultati preostalih naciepljivanih razrjeđenja 1:10, 1:100, 1:1000 i 1:10 000 ukazali su da nije bilo moguće izbrojiti pojedinačne kolonije. SAA podloge su inkubirane na nešto nižoj temperaturi (32 °C) da se uspori rast gljivice te da se kolonije lakše izbroje 72 sata nakon inkubacije. Broj kolonija u mililitru suspenzije dobiven je na način da se broj izbrojenih kolonija pomnožio s brojem radnog razrjeđenja. Postupak je napravljen za trideset nasumično odabranih suspenzija inokuluma.



**Slika 1.** Porast kolonija *M. pachydermatis* 72 sata nakon naciepljivanja serijskih razrjeđenja suspenzija inokuluma: a) 1:10 do 1:100 000 u volumenu od 5  $\mu$ l naciepljenih na osnovu sheme na SAA podlogu; b) 1:100 000 u volumenu od 1 mL naciepljen na cijelu površinu SAA podloge.

#### 4.4. Disk difuzijski postupak

U ovom istraživanju koristio se modificirani disk difuzijski postupak prema smjernicama određenim CLSI dokumentom M44-A2 (CLSI, 2009.) koji je standardiziran za kvasce iz roda *Candida*. Postupak se izvodi u Petrijevoj zdjelici na čvrstoj hranjivoj podlozi debljine 4 milimetra, MH-GM agaru (2% goveđi ekstrakt, 1,5% škrob, 17,5% hidrolizat kazeina, 17% agar) pripremljenom prema uputi proizvođača (Biolife, Italija) uz dodatak 2% glukoze i 0,5 µg/l metilenskog modrila. Dodatak glukoze pospješuje rast većine kvasaca, a metilensko modrilo omogućuje jasno očitavanje granica zone inhibicije te vidljivost sitnog rasta pojedinačnih kolonija unutar područja same zone olakšavajući interpretaciju rezultata (PASQUETTI i sur., 2015.). Od antimikotika koristili smo tablete mikonazola (MICOZ), klotrimazola (CTRIM) i itrakonazola (ITRAC), u koncentraciji od 10 µg i promjera 9 mm od proizvođača Neo-Sensitabs (Rosco, Taastrup, Danska). Nakon pripreme MH-GM podloge i suspenzije inokuluma, sterilni obrisak uronjen je u suspenziju, višak je uklonjen laganim pritiskom i okretanjem štapića uz unutrašnji rub epruvete, te je istraživana kultura *M. pachydermatis* naciepljena u tri smjera. Prilikom naciepljivanja ploča se lagano rotirala pod kutom od 60° kako bi se suspenzija inokuluma ravnomjerno rasporedila po cijeloj površini agara. Ovaj postupak je vrlo važno napraviti unutar petnaest minuta od pripreme inokuluma suspenzije jer duljim stajanjem dolazi do propadanja stanica i posljedično manjeg broja naraslih kolonija iz pripremljene radne suspenzije. Nakon navedenog postupka podloge su se sušile oko pet minuta. Uz pomoć sterilne pincete, tablete s antimikoticima su utisnute na površinu agara. Važno je naglasiti da su tablete morale biti u potpunom kontaktu s hranjivom podlogom (CLSI, 2009.). Zbog relativno velikog promjera zone inhibicije i moguće posljedične interferencije između zona, na sredinu jedne ploče utisnuta je samo jedna tableta antimikotika. Ploče su inkubirane pri temperaturi od 37 °C te je zona inhibicije očitana nakon 24, 48, 72, 96 i 120 sati. Veličina zone inhibicije izmjerena je u milimetrima, a obuhvaćala je kružni promjer površine hranjive podloge oko tablete gdje nije bilo rasta kolonija, ali je uključivala i male sitne kolonije. Prema uputama proizvođača granicom mjerenja zone inhibicije smatralo se područje zone gdje se uočavao rast kolonija *M. pachydermatis* uobičajene veličine. Pravilna, kružna zona inhibicije i ravnomjeran rast kolonija ukazivao je da je suspenzija ispravno inokulirana na površinu agara te da je ispravno pripremljena (CLSI, 2009.). Prema smjernicama u CLSI dokumentu, rezultati su očitani iznad crne podloge s donje strane Petrijevih zdjelica. Nakon mjerenja zona inhibicije soj je svrstan prema propisanim standardima za kvasac *Candida* sp. u tri kategorije: osjetljiv (S, eng.

*susceptible*), umjereno osjetljiv (I, eng. *intermediate*) i otporan (R, eng. *resistant*). Postupak je napravljen u dva navrata, a u pojedinim slučajevima izrazito slabog rasta istraživanog soja ili većih razlika u promjeru zona i u četiri navrata.

#### **4.5. Kontrola kvalitete disk difuzijskog postupka**

U svrhu kontrole kvalitete disk difuzijskog postupka, pripremljen je i inokulum od dva klinička izolata *C. albicans* prema standardiziranom disk difuzijskom postupku, opisanom u dokumentu M44-A2 (CLSI, 2009.). Kolonije stare 48 sati suspendirane su u 0,9% NaCl i optička gustoća je podešena na 0,5 McF što je odgovaralo propisanim vrijednostima od 1 do  $5 \times 10^6$  CFU/mL (CLSI, 2009.). Nakon naciepljivanja suspenzije inokuluma pomoću sterilnog obriska, sušenja te utiskivanja tablete na hranjivu podlogu, ploče su inkubirane pri temperaturi od 37 °C te je zona inhibicije očitana nakon 24 sata (CLSI, 2009.). Postupak je također napravljen u dva navrata.

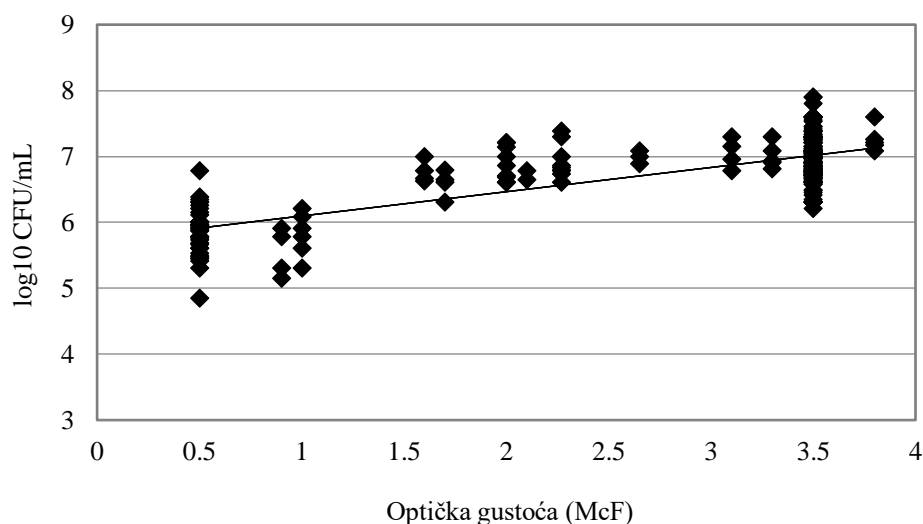
#### **4.6. Statistička analiza podataka**

Dobiveni podaci statistički su obrađeni u računalnom programu MS Excell 2016 i Statistica (TIBCO Statistica™ 13.3.0.). Povezanost optičke gustoće i broja kolonija u jednom mililitru izraženih kao logaritamske vrijednosti broja kolonija u mililitru radne suspenzije ( $\log_{10}$  CFU/mL) prikazana je linearnim modelom regresije i izračunat je koeficijent determinacije. Preciznost pripreme inokuluma i ponovljivost rezultata analizirana je deskriptivnom statistikom te intervalom pouzdanosti. Normalnost raspodjele numeričkih vrijednosti dobivenih mjerenjem zona inhibicija na tri antimikotika, provjerena je grafičkom metodom procjene raspodjele dobivenih podataka korištenjem histograma. Statistički značajne razlike u izmjerenim zonama inhibicije ( $p < 0,05$ ) između duplikata i duljina inkubacije utvrđene su Student t-testom. Razlike u promjerima zona inhibicije između istraživanih antimikotika testirane su jednosmjernom ANOVA i post-hoc testom.

## 5. REZULTATI

### 5.1. Preciznost pripreme suspenzije inokuluma

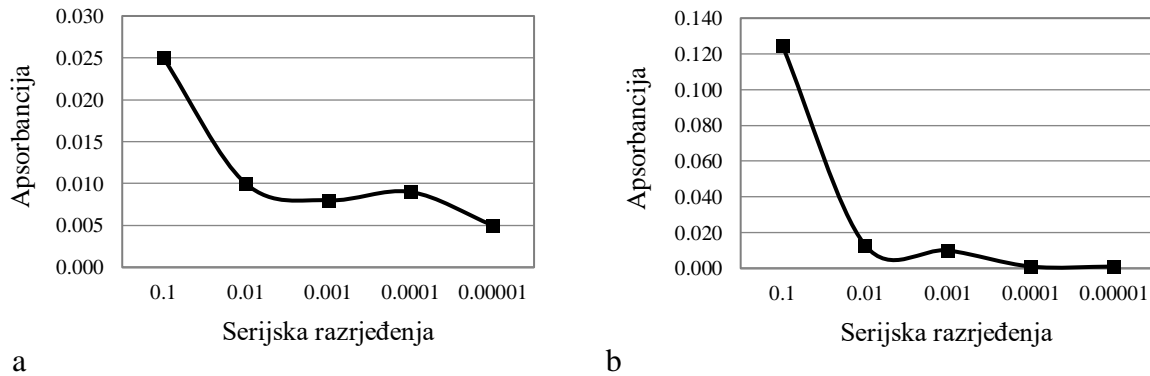
Dobivene vrijednosti broja kolonija za optičku gustoću suspenzije od 0,5 McF bile su u rasponu od  $7 \times 10^4$  do  $6 \times 10^6$  CFU/mL (prosječno  $1 \times 10^6$  CFU/mL), a za 3,5 McF od  $1,6 \times 10^6$  do  $8 \times 10^7$  CFU/mL (prosječno  $1,27 \times 10^7$  CFU/mL). Broj naraslih kolonija u mililitru nacijepljenih inokuluma različitih optičkih gustoća od 1 do 3,3 McF kretao se od  $1,4 \times 10^5$  do  $2,4 \times 10^7$  CFU/mL, a za optičku gustoću od 3,8 McF od  $1,2$  do  $4 \times 10^7$  CFU/mL. Optička gustoća izražena u McF jedinicama uspoređena je s logaritamskom vrijednošću broja kolonija u jednom mililitru ( $\log_{10}$  CFU/mL) različitih serijskih razrjeđenja od 1:10 do 1:100 000 određenog nacijepljivanjem na hranjivu podlogu te prikazana linearnim modelom regresije (Graf 1). Odnos između tih dviju varijabli ukazuje na umjerenu do dobru jačinu povezanosti.



**Graf 1.** Pravac regresije prikazuje odnos optičke gustoće izmjerene denzitometrom u McF i logaritamskih vrijednosti broja kolonija u jednom mililitru ( $\log_{10}$  CFU/mL). Specifičan pokazatelj reprezentativnosti regresije, koeficijent determinacije,  $r^2=0,58$ . Jednadžba pravca regresije:  $\log_{10}$  CFU/mL =  $5,73 + 0,37$  McF.

Povezanost vrijednosti apsorbancije suspenzija inokuluma optičke gustoće 0,5 i 3,5 McF za ispitivana serijska razrjeđenja od 1:10 do 1:100 000 prikazana je u Grafu 2. Na temelju izmjerenih vrijednosti apsorbancije pri valnoj duljini od 600 nm, napravljene su krivulje koje pokazuju odnos razrjeđenja suspenzija inokuluma i vrijednosti apsorbancije. Iz krivulja je vidljivo da postepeno povećanje razrjeđenja prati manja apsorbancija. Također se

moгу uočiti i određena odstupanja u razrjeđenjima 1:1000 i 1:10 000 koja ne prate manju apsorbanciju što se pripisuje tendenciji stvaranja grudica prilikom pripremanja suspenzije inokuluma istraživane gljivice.



**Graf 2.** Odnos serijskih razrjeđenja i vrijednosti apsorbancije inokuluma gljivice *M. pachydermatis* izmjerene spektrofotometrom pri valnoj duljini od 600 nm. Početna suspenzija priređena je od kulture *M. pachydermatis* i njeno zamućenje prilagođeno na optičku gustoću od a) 0,5 McF i b) 3,5 McF.

## 5.2. Ponovljivost rezultata

U ovom istraživanju priprema suspenzije gljivice *M. pachydermatis* prilagođena na optičku gustoću od 3,5 McF rezultirala je vrijednostima u rasponu od  $1,6 \times 10^6$  do  $8 \times 10^7$  CFU/mL s prosječnom srednjom vrijednosti svih razrjeđenja od  $1,27 \times 10^7$  (Tablica 2). Serijska razrjeđenja suspenzija inokuluma naci jepljena na hranjivu podlogu u volumenu od 5  $\mu$ l na osnovu sheme, s pouzdanošću od 95% sadržavala su od  $5,8$  do  $6,9 \times 10^6$  (razrjeđenje 1:1000),  $9,3 \times 10^6$  do  $1,2 \times 10^7$  (razrjeđenje 1:10 000) i  $2,2$  do  $3,5 \times 10^7$  (razrjeđenje 1:100 000) CFU/mL. Također, na preciznost ovog postupka ukazuje i vrlo uzak interval pouzdanosti u razrjeđenju od 1:100 000 naci jepljenog u volumenu od 1 mL na cijelu površinu hranjive podloge koji je rezultirao brojem kolonija od  $1,4$  do  $2,4 \times 10^7$  (interval pouzdanosti od 95%) odnosno  $1,3$  do  $2,5 \times 10^7$  (interval pouzdanosti od 99%) CFU/mL.

**Tablica 2.** Broj kolonija u različitim razrjeđenjima inokuluma od 30 istraživanih sojeva vrste *M. pachydermatis*.

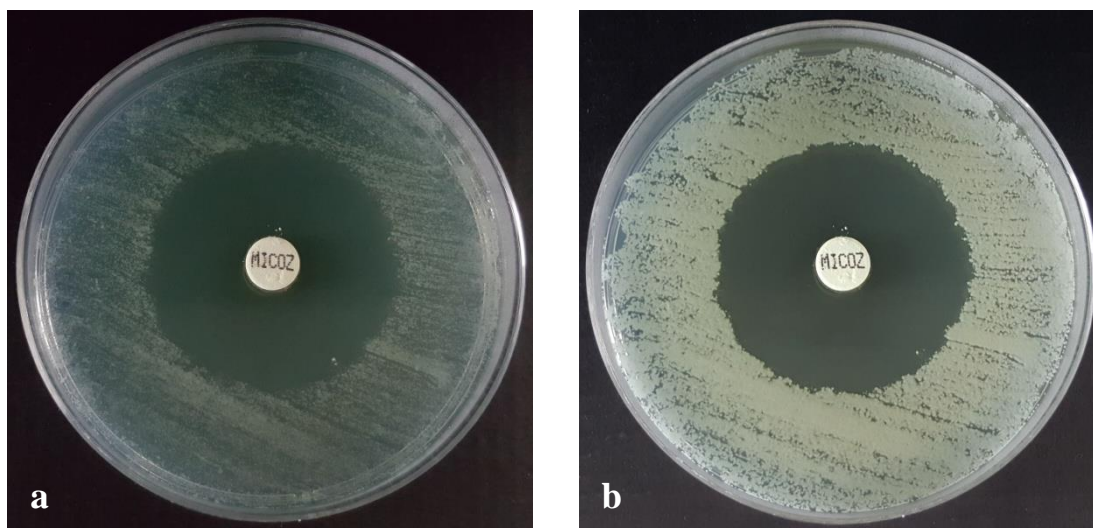
	CFU/mL (shema)			CFU/mL (1 mL)
	1:1000	1:10 000	1:100 000	1:100 000
<b>n</b>	72*	73*	27*	30*
$\bar{x}$	$6,4 \times 10^6$	$1,1 \times 10^7$	$2,8 \times 10^7$	$1,9 \times 10^7$
<b>SD</b>	$2,3 \times 10^6$	$6,3 \times 10^6$	$1,7 \times 10^7$	$1,3 \times 10^7$
<b>Raspon</b>	$1,6 \times 10^6 - 1,3 \times 10^7$	$2 \times 10^6 - 2,8 \times 10^7$	$2 - 8 \times 10^7$	$3,1 \times 10^6 - 6,4 \times 10^7$
<b>CI (95%)</b>	$5,8 - 6,9 \times 10^6$	$9,3 \times 10^6 - 1,2 \times 10^7$	$2,2 - 3,5 \times 10^7$	$1,4 - 2,4 \times 10^7$
<b>CI (99%)</b>	$5,7 - 7,1 \times 10^6$	$8,9 \times 10^6 - 1,3 \times 10^7$	$1,9 - 3,7 \times 10^7$	$1,3 - 2,5 \times 10^7$

\*broj uzoraka u kojima je bilo moguće izbrojiti pojedinačne kolonije (uzorci su rađeni u duplikatu i/ili triplikatu);  $\bar{x}$  - aritmetička sredina; SD - standardna devijacija; CI - interval pouzdanosti

### 5.3. Rezultati disk difuzijskog postupka

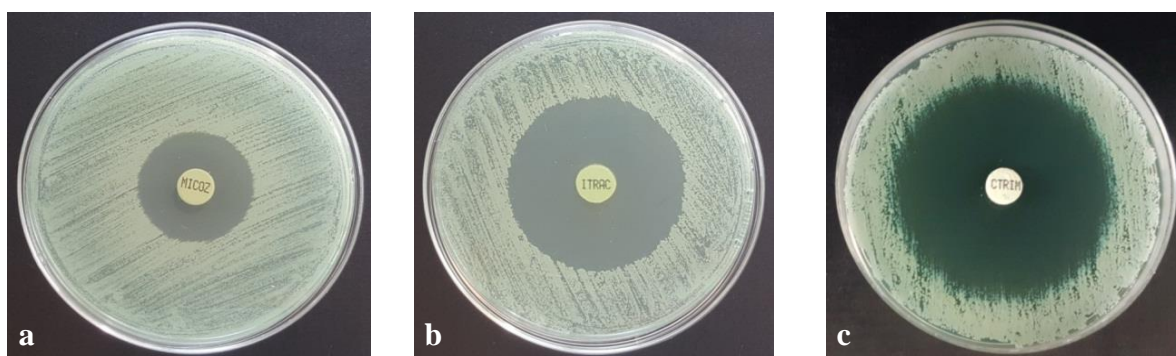
#### 5.3.1. Rast gljivice *M. pachydermatis* na MH-GM agaru tijekom različitih duljina inkubacije i mjerenje zona inhibicije

Nakon naciepljivanja suspenzije inokuluma gljivice optičke gustoće 3,5 McF i prosječnog broja kolonija  $1,27 \times 10^7$  CFU/mL procjenjivao se njihov rast na MH-GM agaru. Za razliku od *C. albicans*, porast kolonija *M. pachydermatis* nakon 24 sata bio je preoskudan da bi se izmjerila zona inhibicije. Nakon 48 sati rast kolonija je bio bolji, zona inhibicije vidljiva, ali tek nakon 72 sata ustanovljen je ravnomjeran rast u gotovo svih istraživanih sojeva i jasno izražena zona inhibicije (Slika 2).



**Slika 2.** Disk difuzijski postupak istraživanja osjetljivosti gljivice *M. pachydermatis* na mikonazol. Porast kolonija i zone inhibicije nakon inkubacije od a) 48 sati i b) 72 sata na MH-GM agaru.

Prilikom istraživanja osjetljivosti sojeva *M. pachydermatis* na mikonazol i itrakonazol zone inhibicije bile su kružnog oblika s jasno izraženom linijom između granice rasta kolonija i inhibicijske zone (Slika 3a i b). Za razliku od njih, kod većine istraživanih sojeva na klotrimazol primijećena je „nazubljena“ granica zone inhibicije, koju su tvorile vrlo sitne pojedinačne kolonije izrasle uz sam rub zone (Slika 3c).



**Slika 3.** Disk difuzijski postupak istraživanja osjetljivosti gljivice *M. pachydermatis* na a) mikonazol, b) itrakonazol i c) klotrimazol nakon inkubacije od 72 sata na MH-GM agaru.

Dodatak metilenskog modrila obojio je plavkasto podlogu što je omogućilo jasnu vidljivost granice između rasta kolonija i inhibicijske zone te olakšalo mjerenje njenog promjera, naročito pri rastu vrlo sitnih, nekada gotovo prozirnih, kolonija uz sam rub zone. Veličine zona inhibicije izmjerene su nakon inkubacije gljivica tijekom 48, 72, 96 i 120 sati. Statističkom analizom ustanovljeno je da su veličine zona izmjerene nakon 72 sata bile



značajno veće ( $p < 0,05$ ) u odnosu na zone izmjerene nakon 48 sati inkubacije u 57 istraživanih sojeva. Promjeri zona izmjereni nakon 96 i 120 sati nisu se statistički značajno razlikovali od promjera izmjerenih nakon 72 sata ( $p > 0,05$ ). Zbog slabog rasta kolonija u dva soja, zona inhibicije prvi puta je izmjerena nakon inkubacije od 72 sata, dok se u jednog soja mogla izmjeriti tek nakon 96 sati. Na osnovi dobivenih rezultata za optimalno vrijeme mjerenja zona inhibicije i tumačenja rezultata disk difuzijskog postupka odabrana je duljina inkubacije od 72 sata.

Promjeri zona inhibicije za vrstu *C. albicans* očitani su bez poteškoća nakon 24 sata inkubacije kako je i propisano CLSI dokumentom. Zone izmjerene nakon 48, 72, 96 i 120 sati nisu se statistički značajno razlikovale u odnosu na zone izmjerene nakon 24 sata ( $p > 0,05$ ).

### **5.3.2. Istraživanje osjetljivosti gljivice *M. pachydermatis* i tumačenje rezultata**

Na osnovi vrijednosti izmjerenih promjera zona inhibicije nakon 72 sata inkubacije, sojevi su svrstani u tri različite kategorije osjetljivosti prema propisanim standardima za kvasac *Candida* sp.. Rezultati osjetljivosti interpretirani su prema uputama proizvođača prema sljedećem kriteriju: osjetljiv (S) za MICOZ i CTRIM ( $\geq 20$  mm) i ITRAC ( $\geq 23$  mm), umjereno osjetljiv (I) za MICOZ i CTRIM (12-19 mm) i ITRAC (14-22 mm) te otporan (R) za MICOZ i CTRIM ( $\leq 11$  mm) i ITRAC ( $\leq 13$  mm) (Rosco, Taastrup, Danska). Od ukupno 60 istraživanih sojeva ustanovljeno je da je jedan soj bio umjereno osjetljiv na mikonazol, s prosječnom vrijednosti promjera zone inhibicije od 19 mm. Svi ostali sojevi bili su osjetljivi na sva tri istraživana antimikotika s prosječnim vrijednostima promjera zone inhibicije od 41 mm za mikonazol, 58 mm za klotrimazol te 52 mm za itrakonazol (Tablica 3). U svrhu kontrole kvalitete disk difuzijskog postupka, istražena je osjetljivost dva soja *C. albicans*. Oba soja bila su osjetljiva na istraživane antimikotike, s prosječnim vrijednostima izmjerenih zona od 25 mm za mikonazol, 36 mm za klotrimazol i 26 mm za itrakonazol.

**Tablica 3.** Prosječne vrijednosti promjera zona inhibicije za mikonazol, klotrimazol i itrakonazol sojeva svrstanih u kategorije prema propisanim standardima za vrstu *Candida* sp..

Gljivica	Osjetljivost	MICOZ		CTRIM		ITRAC	
		n	$\bar{x}$	n	$\bar{x}$	n	$\bar{x}$
<i>M. pachydermatis</i>	S	59	41	60	58	60	52
	I	1	19	0	-	0	-
	R	0	-	0	-	0	-
<i>C. albicans</i>	S	2	25	2	36	2	26
	I	0	-	0	-	0	-
	R	0	-	0	-	0	-

\*n- broj istraživanih sojeva,  $\bar{x}$  - prosječna vrijednost promjera zona inhibicije (mm)

Prilikom usporedbe vrijednosti izmjerenih zona inhibicije između duplikata istraživanih sojeva ustanovljene su određene razlike nakon inkubacije od 72 sata, koje se nisu međusobno statistički značajno razlikovale ( $p > 0,05$ ). Razlike u veličini zona u rasponu od 1 do 4 mm utvrđene su u 38 (63,3%) sojeva, a veće od 5 mm u 13 (21,7%) sojeva. Opisane razlike između duplikata najčešće su uočene prilikom istraživanja osjetljivosti sojeva na klotrimazol i to u 21 (35%) soja.

Istraživanje osjetljivosti *M. pachydermatis* na različite antimikotike rezultiralo je različitim veličinom zona inhibicije. Najveći raspon izmjerenih zona inhibicije ustanovljen je za mikonazol (od 19 do 65 mm), zatim za klotrimazol (od 37 do 72 mm) te itrakonazol (od 44 do 68 mm). Usporedbom izmjerenih promjera zone inhibicije istraživanih sojeva ustanovljene su statistički značajne razlike između istraživanih antimikotika ( $p < 0,05$ ) s najvećom aktivnošću klotrimazola, zatim itrakonazola te najmanjom aktivnošću mikonazola.

## 6. RASPRAVA

U zadnjem desetljeću sve više se raspravlja o pojavi smanjene osjetljivosti gljivice *M. pachydermatis* prema antimikoticima te se ona navodi kao jedan od mogućih razloga recidivirajućih upala zvukovoda (CHIAVASSA i sur., 2014.). Navedena hipoteza bila je vrijedna za istražiti budući se danas ova oportunistički patogena gljivica sve češće svrstava u emergentne patogene za što postoji sve više znanstvenih dokaza (CELIS i sur., 2017.). O razvoju njene otpornosti na primjenu različitih antimikotičnih pripravaka u posljednje je vrijeme sve više literaturnih podataka kako u životinja (BERNARDO i sur., 1998.; JESUS i sur., 2011.; NIJIMA i sur., 2011.) tako i u ljudi (CHINN i sur., 2017.).

Zbog ovakvih naznaka u razvoju smanjene osjetljivosti gljivica odlučili smo istražiti sojeve izolirane iz pasa s kroničnim upalama sluznice vanjskog zvukovoda u kojih ni dugotrajna terapija nije dovela do izlječenja. Prema anamnestičkim podacima postojala je veća vjerojatnost da su sojevi izolirani iz takvih životinja imali veću mogućnost razvoja otpornosti zbog ponavljanih terapija antimikoticima. Azoli poput klotrimazola i mikonazola predstavljaju najzastupljenije antimikotike u kapima za uši koje se koriste u terapiji otitisa, a itrakonazol je najčešće korišten antimikotik za peroralnu primjenu.

U ovom istraživanju, za potrebe standardizacije inokuluma, uspoređene su različite optičke gustoće izmjerene u McF jedinicama i logaritamske vrijednosti izračunatih brojeva kolonija u jednom mililitru te je ustanovljeno da postoji umjerena do dobra povezanost između ovih dviju varijabli. Dobivena umjerena povezanost može se pripisati svojstvu vrste *M. pachydermatis* da stvara grudice što otežava pripremu homogene suspenzije i u konačnici rezultira nešto većim rasponom CFU/mL za pojedinu optičku gustoću u McF. Unatoč navedenom, optička gustoća inokuluma od 3,5 McF rezultirala je prosječnom vrijednosti od  $1,27 \times 10^7$  CFU/mL što je odgovaralo preporučenom broju kolonija u mililitru od 1 do  $5 \times 10^7$  CFU/mL inokuluma neophodnom za ravnomjeran rast kolonija (PASQUETTI i sur., 2015.). Danas je poznato da će od bakterija jedino inokulum vrste *E. coli* optičke gustoće 0,5 McF u većini slučajeva rezultirati s brojem od  $10^8$  CFU/mL, dok kod *S. aureus* (HOMBACH i sur., 2015.) ili nekih drugih bakterija poput *M. tuberculosis* to nije slučaj (PEÑUELAS-URQUIDES i sur., 2013.). Kod gljivica je situacija znatno složenija zbog specifičnosti građe njihove stanične stijenke. Od kvasaca je kod *Candida* sp. opisan postupak standardizacije inokuluma gdje je utvrđena vrlo dobra povezanost između optičke gustoće i broja kolonija u mililitru inokuluma (RODRÍGUEZ-TUDELA i sur., 2001.). Do danas takvi podaci za vrstu *M. pachydermatis* ne postoje u znanstvenoj literaturi. Istraživanje provedeno za potrebe izrade

ovog rada daje prve detaljne podatke o standardizaciji pripreme suspenzije inokuluma gljivice *M. pachydermatis* za disk difuzijski postupak, koji je brza, ekonomski isplativa i praktična za rutinske dijagnostičke pretrage.

Dosadašnja istraživanja navode MH-GM kao najprikladniju hranjivu podlogu za izvođenje disk difuzijskog postupka u istraživanju osjetljivosti kvasaca (YURAYART i sur., 2013.; PASQUETTI i sur., 2015.) što se potvrdilo i u ovom istraživanju. Zahvaljujući dodatku metilenskog modrila, koje je plavkasto obojilo MH-GM agar, očitavanje zona inhibicija bilo je jednostavnije, naročito kod određivanja granica između zone rasta kolonija i zone inhibicije, koja nije uvijek bila oštro ograničena zbog prisutnosti vrlo sitnih, često teško uočljivih kolonija. Naime, poznato je da kod korištenja nekih drugih hranjivih podloga te male kolonije značajno otežavaju interpretaciju zone inhibicije (ANONIMUS, 2011.). Porast kolonija na MH-GM agaru nakon 48 sati bio je dovoljan da se izmjere promjeri zona inhibicije, ali gustoća naraslih kolonija nije bila zadovoljavajuća. Ravnomjeran rast kolonija ustanovljen je nakon 72 sata i veličine zona inhibicije izmjerene nakon 72 sata bile su statistički značajno veće u odnosu na veličine zona izmjerenih nakon 48 sati. S obzirom da statistički značajne razlike nisu ustanovljene u izmjerenim zonama nakon 96 i 120 sati, za optimalnu duljinu inkubacije odabrana su 72 sata. Koristeći istu gustoću inokuluma PASQUETTI i sur. (2015.) na osnovu svojih rezultata odabrali su duljinu inkubacije od 48 sati. Važno je napomenuti da je navedena skupina istraživača koristila Christensenov urea bujon s dodatkom 0,1% Tween-a 80 i 0,5% Tween-a 40 za pripremu suspenzije inokuluma, što je vjerojatno pridonijelo nešto bržem rastu kolonija, a time i odabiru kraće inkubacije i ranije interpretacije rezultata. U ovom istraživanju suspenzija inokuluma pripremala se s dodatkom 0,04% Tween-a 80 (RINCÓN i sur., 2006.) koji je omogućio zadovoljavajući rast kolonija na MH-GM agaru, ali ipak nešto sporiji u odnosu na navedeno istraživanje. Zanimljivo je da su ROJAS i sur. (2016.) također interpretirali svoje rezultate nakon 72 sata, iako su koristili manju gustoću inokuluma priređenog samo s fiziološkom otopinom, a istraživali su osjetljivost vrsta *Malassezia* sp. ovisnih o izvoru masnih kiselina koje sporije rastu u odnosu na *M. pachydermatis*.

Odstupanja koja su utvrđena u dva istraživana soja, gdje su se zbog sporog rasta kolonija promjeri zona inhibicije mogli očitati nakon 72 sata, odnosno u jednog soja tek nakon 96 sati, mogu se pripisati postojanju atipičnih sojeva *M. pachydermatis* koji vjerojatno trebaju dodatan izvor masnih kiselina za svoj rast. Za dodatno objašnjenje bilo bi potrebno istražiti njihovu potencijalnu ovisnost o mastima (PUIG i sur., 2017.).

Do danas postoje različite znanstvene spoznaje o otpornosti *M. pachydermatis* na neke od antimikotika poput klotrimazola, mikonazola (BERNARDO i sur., 1998.) i itrakonazola (NIJIMA i sur., 2011.). Uz navedeno, utvrđeno je da su sojevi otporni na flukonazol bili unakrižno otporni na sve antimikotike iz skupine azola (JESUS i sur., 2011.). U ovom istraživanju osjetljivosti 60 sojeva *M. pachydermatis* po prvi puta je ustanovljeno da je jedan soj bio umjereno osjetljiv na mikonazol. Soj je potjecao od psa starog 14 godina, pasmine zapadno-škotski bijeli terijer koji je osim kronične upale zvukovoda imao i kožne promjene karakteristične za atopijski dermatitis te je dugotrajna terapija vjerojatno pridonijela razvoju otpornosti izoliranog soja. Preostalih ispitanih 59 sojeva bilo je osjetljivo na mikonazol, te su svi sojevi bili osjetljivi na klotrimazol i itrakonazol kao i u prethodnim istraživanjima (LYSKOVA i sur., 2007.; YURAYART i sur., 2013.; PASQUETTI i sur., 2015.). Važno je napomenuti da su za interpretaciju osjetljivosti korištene vrijednosti preporučene za kvasac *Candida* sp. i to na osnovu prethodnih brojnih farmakokinetičkih istraživanja i kliničkih studija u humanoj medicini (JOHNSON, 2008.). S obzirom na navedeno, teško je procijeniti stvaran klinički značaj interpretacije zona osjetljivosti dobivene za gljivicu *M. pachydermatis* na osnovu kriterija za drugu vrstu kvasca (CHIAVASSA i sur., 2014.).

Prilikom provjere ponovljivosti rezultata u istraživanju osjetljivosti, ustanovljene su određene razlike u veličinama zona inhibicije za mikonazol i itrakonazol između duplikata istog soja na isti antimikotik. Iako statistički nisu bile značajne, najveće razlike između duplikata utvrđene su kod klotrimazola. Navedeno se može pripisati pomalo otežanoj interpretaciji zona inhibicije zbog „nazubljenog“ izgleda granice zone inhibicije koji nastaje zbog velikog broja sitnih kolonija uz sam rub zone, a koje se uključuju u njeno mjerenje (ANONIMUS, 2011.). YURAYART i sur. (2013.) su također opisali da granice zone inhibicije nisu bile jasno ograničene kod istraživanja osjetljivosti *M. pachydermatis*, ali kod itrakonazola i ketokonazola.

Uspoređujući aktivnosti istraživanih antimikotika u ovom istraživanju utvrđena je statistički značajno veća zona inhibicije kod klotrimazola u odnosu na mikonazol i itrakonazol. Dobiveni rezultati bili su u skladu s rezultatima ustanovljenim u nedavnom istraživanju gdje se također koristio disk difuzijski postupak (PASQUETTI i sur., 2015.). U istraživanjima u kojima se koristila mikrodilucija u bujonu opisana je veća aktivnost mikonazola u odnosu na itrakonazol (PEANO i sur., 2012.; CHIAVASSA i sur., 2014.). Manja zona inhibicije odnosno manja aktivnost antimikotika mogla bi biti posljedica češćeg terapijanja životinja određenim antimikotikom. S obzirom da je ovdje najčešće riječ o

lokalnoj terapiji sluznice zvukovoda gdje se preparat primjenjuje izravno na epitel zvukovoda višekratno osiguravajući na taj način kumulativan učinak preparata, manja aktivnost određenog antimikotika najvjerojatnije neće dovesti do neuspjeha u liječenju (CHIAVASSA i sur., 2014.).

Rezultati ovog istraživanja upućuju na potrebu daljnjih istraživanja osjetljivosti vrste *M. pachydermatis* u rutinskim laboratorijskim pretragama koristeći disk difuzijski postupak prilagođen u ovom istraživanju. Naime, u bližoj budućnosti bilo bi poželjno standardizirati metodu istraživanja osjetljivosti u vidu konsenzusa CLSI ili EUCAST smjernica, ustanoviti povezanost *in vitro* rezultata s kliničkim istraživanjima učinka terapije na infekcije uzrokovane gljivicom *M. pachydermatis* te odrediti referentne zone interpretacije osjetljivosti za navedenu gljivicu.

## 7. ZAKLJUČCI

U ovom istraživanju po prvi puta su uspoređene različite optičke gustoće izmjerene u McF jedinicama i vrijednosti brojeva kolonija u jednom mililitru za *M. pachydermatis*, a u svrhu standardizacije inokuluma za disk difuzijski postupak. S obzirom da do sada ne postoje takvi podaci u znanstvenoj literaturi, dobiveni rezultati predstavljaju nove spoznaje povezanosti tih dviju varijabli u ovom znanstvenom području.

Prilikom standardizacije protokola pripreme inokuluma ustanovljena je umjerena do dobra povezanost između McF i CFU/mL što je rezultiralo očekivanim prosječnim srednjim vrijednostima broja kolonija u mililitru priređenog inokuluma.

MH-GM agar pokazao se kao odgovarajuća hranjiva podloga za upotrebu u disk difuzijskom postupku jer je pogodovao rastu gljivice *M. pachydermatis* kada je suspenzija inokuluma bila pripremljena s dodatkom 0,04% Tween-a 80 kao izvorom lipida. Istodobno, granice zone inhibicije bile su jasno vidljive, što je znatno olakšalo njihovo mjerenje te značajno smanjilo mogućnost pogreške prilikom njihove interpretacije. Optimalna duljina inkubacije za tumačenje izmjerenih zona inhibicije bila je 72 sata.

Istraživanjem osjetljivosti po prvi puta je ustanovljena umjerena osjetljivost jednog soja *M. pachydermatis* na mikonazol izoliranog iz vanjskog zvučnika u pasa s kroničnom upalom, dok je ostalih 59 sojeva bilo osjetljivo na sva tri istraživana antimikotika: mikonazol, klotrimazol i itrakonazol kada su korištene zone interpretacije za kvasac *Candida* sp.

Unatoč umjerenom do dobrom koeficijentu determinacije i nemogućnosti postizanja izvrsne povezanosti optičke gustoće i broja kolonija gljivice *M. pachydermatis* u mililitru suspenzije inokuluma, disk difuzijskim postupkom dobiveni su konzistentni rezultati ukazujući na mogućnost njegove upotrebe u rutinskoj mikološkoj dijagnostici.

Navedeno istraživanje potrebno je proširiti na veći broj uzoraka, posebice s prethodno terapiраних životinja antimikotičnim pripravcima te istražiti njihovu osjetljivost. Daljnja istraživanja u kojima bi se usporedile vrijednosti disk difuzijskog postupka s rezultatima postupka mikrodilucije u bujonu uključili bi se u trenutno aktualna istraživanja koja imaju za cilj stvaranje referentnih vrijednosti za interpretaciju osjetljivosti *M. pachydermatis*.

## **8. ZAHVALE**

Posebno zahvaljujem mentorici doc. dr. sc. Suzani Hađini na motivaciji, uloženom trudu i vremenu koja je svojom stručnošću, strpljenjem i voljom uvelike doprinijela izradi ovog rada.

Najljepše zahvaljujem voditeljici laboratorija prof. dr. sc. Ljiljani Pinter što mi je omogućila boravak i korištenje laboratorijske opreme Mikološkog laboratorija Zavoda za mikrobiologiju i zarazne bolesti s klinikom Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Zahvaljujem veterinarskoj tehničarki Maji Štrkalj na pomoći oko pripreme hranjivih podloga i precjepljivanju izolata.

Također zahvaljujem Ivanu Vlaheku, dr. med. vet. i dr. sc. Maji Maurić na pomoći oko statističke analize pri korištenju računalnog programa Statistica.

Zahvaljujem se i osoblju Zavoda za patološku fiziologiju na pomoći u korištenju njihovog spektrofotometra.



## 9. POPIS LITERATURE

ANONIMUS (2011): Susceptibility testing of yeasts 2011. Agar Diffusion Method with Neo-Sensitabs. Rosco, Taastrup, Danska.

BERNARDO, F. M., H. M. MARTINS, M. LÍGIA MARTINS (1998): A survey of mycotic otitis externa of dogs in Lisbon. *Rev. Iberoam. Micol.* 15, 163-165.

BOND, R., R. M. ANTHONY (1995): Characterization of markedly lipid-dependent *Malassezia pachydermatis* isolates from healthy dogs. *J. Appl. Bacteriol.* 78, 537-542.

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, V. COLAO, M. T. MONTAGNA, D. OTRANTO (2012): *In vitro* evaluation of *Malassezia pachydermatis* susceptibility to azole compounds using E-test and CLSI microdilution methods. *Med. Mycol.* 50, 795-801.

CELIS, A. M., H. A. B. WÖSTEN, S. TRIANA, S. RESTREPO, H. DE COCK (2017): *Malassezia* spp. beyond the mycobiota. *SMD J.* 3, 1019.

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.

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.

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

CLSI (2009): Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts; approved guideline, 2<sup>nd</sup> ed., M44-A2. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.

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

CRESPO, M. J., M. L. ABARCA, F. J. CABAÑES (2000): Atypical lipid-dependent *Malassezia* species isolated from dogs with otitis externa. *J. Clin. Microbiol.* 38, 2383-2385.

EUCAST (2017): Definitive Document EDef 7.3.1: Method for the 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.

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. Maysers, A. Velegraki, ur.). Springer, New York. str. 17-63.

HENSEL, P., M. AUSTEL, R. E. WOOLEY, D. KEYS, B. W. RITCHIE (2009): *In vitro* and *in vivo* evaluation of a potentiated miconazole aural solution in chronic *Malassezia* otitis externa in dogs. *Vet. Dermatol.* 20, 429-434.

HOMBACH, M., F. P. MAURER, T. PFIFFNER, E. C. BÖTTGER, R. FURRER (2015): Standardization of operator-dependent variables affecting precision and accuracy of the disk diffusion method for antibiotic susceptibility testing. *J. Clin. Microbiol.* 53, 3864-3869.

JAGIELSKI, T., E. RUP, A. ZIÓLKOWSKA, K. ROESKE, A. B. MACURA, J. BIELECKI (2014): Distribution of *Malassezia* species on the skin of patients with atopic dermatitis, psoriasis, and healthy volunteers assessed by conventional and molecular identification methods. *BMC Dermatol.* 14, 3.

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.

JOHNSON, E. M. (2008): Issues in antifungal susceptibility testing. *J. Antimicrob. Chemother.* 61, 13-18.

JUNTACHAI, W., T. OURA, S. Y. MURAYAMA, S. KAJIWARA (2009): The lipolytic enzymes activities of *Malassezia* species. *Med. Mycol.* 47, 477-484.

LAUTENBACH, E., I. NACHAMKIN, M. G. SCHUSTER (1998): *Malassezia pachydermatis* infections. *N. Engl. J. Med.* 339, 270.

LORENZINI, R., R. MERCANTINI, F. DE BERNARDIS (1985): *In vitro* sensitivity of *Malassezia* spp. to various antimycotics. *Drugs Exp. Clin. Res.* 11, 393-395.

LYSKOVA, P., M. VYDRZALOVA, J. MAZUROVA (2007): Identification and antimicrobial susceptibility of bacteria and yeasts isolated from healthy dogs and dogs with otitis externa. *J. Vet. Med. A* 54, 559-563.

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.

MILLER, W. H., C. E. GRIFFIN, K. L. CAMPBELL (2013): *Malassezia dermatitis*. U: Muller and Kirk's small animal dermatology. 7<sup>th</sup> edn. (MILLER W. H., C. E. GRIFFIN, K. L. CAMPBELL, ur.). Philadelphia, WB Saunders. str. 243-249.

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

NAKANO, Y., M. WADA, H. TANI, K. SASAI, E. BABA (2005): Effects of beta-thujaplicin on anti-*Malassezia pachydermatis* remedy for canine otitis externa. J. Vet. Med. Sci. 67, 1243-1247.

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

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.

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.

PEÑUELAS-URQUIDES, K., L. VILLARREAL-TREVIÑO, B. SILVA-RAMÍREZ, L. RIVADENEYRA-ESPINOZA, S. SAID-FERNÁNDEZ, M. BERMÚDEZ DE LEÓN (2013): Measuring of *Mycobacterium tuberculosis* growth. A correlation of the optical measurements with colony forming units. Braz. J. Microbiol. 44, 287-289.

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.

RINCÓN, S., M. C. CEPERO DE GARCÍA, A. ESPINEL-INGROFF (2006): A modified Christensen's urea and CLSI broth microdilution method for testing susceptibilities of six *Malassezia* species to voriconazole, itraconazole, and ketoconazole. J. Clin. Microbiol. 44, 3429-3431.

RODRÍGUEZ-TUDELA, J. L., M. CUENCA-ESTRELLA, T. M. DÍAZ-GUERRA, E. MELLADO (2001): Standardization of antifungal susceptibility variables for a semiautomated Methodology. J. Clin. Microbiol. 39, 2513-2517.

ROJAS, F. D., S. B. CÓRDOBA, M. DE LOS ÁNGELES SOSA, L. C. ZALAZAR, M. S. FERNÁNDEZ, M. E. CATTANA, L. R. ALEGRE, A. J. CARRILLO-MUÑOZ, G. E. GIUSIANO (2016): Antifungal susceptibility testing of *Malassezia* yeast: comparison of two different methodologies. Mycoses 60, 104-111.

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. WOEHLÉ, B. BOISRAMÉ (2005): A comparative study of two antimicrobial/anti-inflammatory formulations in the treatment of canine otitis externa. Vet. Dermatol. 16, 299-307.

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.

VANDEBOSSCHE, I., M. VANEECHOUTTE, M. VANDEVENNE, T. DE BAERE, G. VERSCHRAEGEN (2002): Susceptibility testing of fluconazole by the NCCLS macrodilution method; E-test and disk diffusion methods. J. Clin. Microbiol. 40, 918-921.

WANG, Q. M., B. THEELEN, M. GROENEWALD, F. Y. BAI, T. BOEKHOUT (2014): *Moniliellomyces* and *Malasseziomyces*, two new classes in *Ustilaginomycotina*. Persoonia-Mol. Phylogeny Evol. Fungi 33, 41-47.

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.

YURAYART, C., N. NUCHNOUL, P. MOOLKUM, S. JIRASUKSIRI, W. NIYOMTHAM, A. CHINDAMPORN, S. KAJIWARA, N. PRAPASARAKUL (2013): Antifungal agent susceptibilities and interpretation of *Malassezia pachydermatis* and *Candida parapsilosis* isolated from dogs with and without seborrheic dermatitis skin. Med. Mycol. 51, 721-730.

## 10. SAŽETAK

Iva Benvin

Primjena disk difuzijskog postupka u ispitivanju osjetljivosti sojeva gljivice *Malassezia pachydermatis* izdvojenih iz pasa s kroničnom upalom zvukovoda

Gljivica *Malassezia pachydermatis* predstavlja najčešćeg uzročnika upale sluznice vanjskog zvukovoda u pasa koja vrlo često rezultira kroničnim tijekom i recidivirajućim terapijama antimikoticima, najčešće iz skupine azola. Posljednjih godina spominje se njena smanjena osjetljivost na antimikotike ne samo u veterinarskoj, već i u humanoj medicini. S obzirom da ne postoji standardizirani postupak za istraživanje osjetljivosti vrste *M. pachydermatis* postavlja se pitanje postojanja stvarne klinički značajne otpornosti ove gljivice. Opći cilj ovog istraživanja stoga je bio prilagoditi disk difuzijski postupak za istraživanje osjetljivosti gljivice *M. pachydermatis* na osnovu standardiziranog postupka za kvasac *Candida* sp. propisanog dokumentom CLSI M44-A2. Specifičan cilj bio je istražiti osjetljivost 60 sojeva *M. pachydermatis* izdvojenih iz pasa s kroničnom upalom sluznice vanjskog zvukovoda na tri različita antimikotika iz skupine azola: mikonazol, klotrimazol i itrakonazol. Suspenzija inokuluma ovim istraživanjem optimizirana je na optičku gustoću od 3,5 McF s prosječnom srednjom vrijednosti od  $1,27 \times 10^7$  CFU/mL. Mueller-Hintonov agar s dodatkom 2% glukoze i 0,5 µg/l metilenskog modrila pogodovao je rastu gljivice kada je suspenzija inokuluma pripremljena s dodatkom 0,04% Tween-a 80 kao izvorom lipida. Istodobno granice zone inhibicije bile su jasno vidljive, a optimalno vrijeme očitavanja zona inhibicije bilo je nakon 72 sata. Istraživanjem osjetljivosti ustanovljeno je da je jedan soj gljivice *M. pachydermatis* bio umjereno osjetljiv na mikonazol, dok su svi preostali sojevi bili osjetljivi na mikonazol, klotrimazol i itrakonazol. Najveća aktivnost uočena je u primjeni klotrimazola, zatim itrakonazola, a najmanja u mikonazola. Rezultatima ovih istraživanja optimizirali smo postupak koji je primijenjiv u rutinskoj mikološkoj dijagnostici istraživanja osjetljivosti gljivice *M. pachydermatis*.

**Ključne riječi:** *Malassezia pachydermatis*, psi, kronična upala sluznice zvukovoda, disk difuzijski postupak, antimikotik

## 11. SUMMARY

Iva Benven

The performance of disk diffusion method for susceptibility testing of *Malassezia pachydermatis* strains isolated from dogs with chronic otitis externa

*Malassezia pachydermatis* is the most common causative agent of canine otitis externa which often evolves into chronic inflammation and long-term treatments with various antifungal drugs, mainly azoles. In recent years, resistance to different antifungals has been increasingly reported, not only in veterinary but also in human medicine. Since there is no standardized method for antifungal susceptibility testing of *M. pachydermatis*, it is often questioned whether a real clinical resistance to this yeast infection exist. The first aim of this study was to modify antifungal disk diffusion method M44-A2 standardized by the Clinical and Laboratory Standards Institute for *Candida* sp. in order to test antifungal susceptibility of *M. pachydermatis*. The second aim was to investigate the susceptibility of 60 strains of *M. pachydermatis* isolated from dogs with chronic otitis externa to three different azole derivatives: miconazole, clotrimazole and itraconazole. Inoculum suspensions adjusted to 3.5 McF standard corresponded to the average of  $1.27 \times 10^7$  CFU/mL. Mueller-Hinton agar supplemented with 2% glucose and 0.5 µg/l methylene blue supported the growth of *M. pachydermatis* when the yeast inoculum was prepared with 0.04% Tween 80, as the lipid source. At the same time, it provided clearly visible zone edges. Optimal time for reading inhibition zone diameters was at 72 hours. One tested *M. pachydermatis* strain was intermediately susceptible to miconazole, while all remaining strains were susceptible to miconazole, clotrimazole and itraconazole. Clotrimazole showed the highest antifungal activity, followed with itraconazole, while miconazole demonstrated the lowest activity. On the basis of reported results, disk diffusion method was optimized for the routine diagnostic purposes of susceptibility testing of *M. pachydermatis*.

**Keywords:** *Malassezia pachydermatis*, dogs, chronic otitis externa, disk diffusion method, antifungal agents



## 12. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 01.07.1994. u Rijeci. Završila sam opću gimnaziju u Malom Lošinj u te 2013. godine upisala Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Od početka studija, aktivna sam članica studentske udruge IVSA. Osim toga, članica sam Povjerenstva za medije i odnose s javnošću te glavna urednica znanstveno-stručnog časopisa studenata veterinarske medicine „Veterinar“. Za vrijeme studiranja, bila sam demonstrator na Zavodu za kemiju i biokemiju, Zavodu za anatomiju, histologiju i embriologiju, zatim na Zavodu za mikrobiologiju i zarazne bolesti s klinikom te na Klinici za unutarnje bolesti. Dobitnica sam Dekanove nagrade 2015. godine. Dodatno praktično iskustvo stekla sam kroz volontiranje na Klinici za unutarnje bolesti na Veterinarskom fakultetu. Od izvanfakultetskih aktivnosti, pohađam tečaj njemačkog jezika i trenutno sam stupanj B2.1. Sudjelovala sam na brojnim kongresima i seminarima: Short Lipizzan Excursion 2015., Beč; 3. hrvatski kongres veterinarima male prakse 2016., Zagreb; seminar „Shelter Medicine“ 2016., Zagreb; 6. hrvatski mikrobiološki kongres 2016., Sv. Martin na Muri; 65. IVSA kongres 2016., Beč; European Veterinary Students Seminar (EVSS) 2016., Utrecht; 4. hrvatski kongres veterinarima male prakse 2017., Zagreb; 66. IVSA kongres 2017., Malezija; VII. međunarodni kongres Veterinarska znanost i struka 2017., Zagreb; Veterinarski dani 2017., Opatija; ASAE 2017., Beograd.