

# Fenotypowy profil patogenności szczepów *Malassezia pachydermatis*

ANETA NOWAKIEWICZ, GRAŻYNA ZIÓŁKOWSKA

Zakład Mikrobiologii Weterynaryjnej Instytutu Chorób Zakaźnych i Inwazyjnych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej AR, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin

Nowakiewicz A., Ziółkowska G.

## Phenotypic profile of the pathogenicity of *Malassezia pachydermatis* strains

### Summary

Considering the fact that certain phenotypic properties found in *M. pachydermatis* strains can indirectly indicate their pathogenicity, we have evaluated the morphological traits of the fungus (cell size and shape as well as colony type), expression of extracellular hydrolases (API-ZYM) and the activity of catalase, urease, casein, beta-glucosidase, phospholipase and the Tween hydrolases: 20, 40, 60 and 80. Considering the source of the analyzed strains' origin as a differentiation criterium (animals clinically healthy and with otitis externa symptoms), it was found that the isolates obtained from the pathological material were generally (80%) characterized with a smooth growth type of light cream, large or medium-sized colonies, as well as high a activity of lipolytic enzymes, such as phospholipase and hydrolase Tween 80 and valine arylamidase, cystine arylamidase and basic phosphatase. Determining a profile of *M. pachydermatis* phenotypic characteristics may substantially facilitate defining the pathogenicity of the strains isolated directly from the clinical material.

**Keywords:** *Malassezia pachydermatis*, commensal, pathogenic strains

Grzyby z rodzaju *Malassezia* ze względu na wyraźną dichotomię w zakresie form współżycia z organizmem ludzi i zwierząt stanowią poważny problem zarówno diagnostyczny, jak i terapeutyczny. Drożdżaki te bytują na ogół jako komensale na błonach śluzowych i skórze większości organizmów stałocieplnych. Gatunki lipidozależne, jak: *M. furfur*, *M. sympodialis*, *M. slooffiae*, *M. globosa*, *M. obtusa*, *M. restricta* izolowane są najczęściej od ludzi (13, 14, 22), natomiast *M. pachydermatis*, jedyny gatunek lipidoniezależny związany jest z organizmem zwierząt. *M. pachydermatis* występuje głównie u dzikich i domowych zwierząt mięsożernych, jak: psy, koty, lisy, łasice (3, 11, 23), a także u świń, koni, bydła (4, 7, 9) i ptaków (16). Pozytywny odsetek izolacji u zdrowych klinicznie zwierząt jest bardzo wysoki i wynosi średnio około 49% (11), przy czym liczba ta zależy w dużym stopniu od miejsca pobrania materiału. W zewnętrznym kanale słuchowym *M. pachydermatis* wykazano u 32,5% badanych zwierząt (11), na błonach śluzowych pochwy i odbytu u około 40-52% (3, 11), a w przestrzeniach międzypalcowych u około 60% badanej populacji (11).

Pod wpływem zmian zachodzących w mikrośrodku gospodarza lub innych, trudnych do określenia przy obecnym stanie wiedzy czynników, *Malassezia* spp.

może ulec konwersji w formę patogenną, odpowiedzialną za szereg procesów chorobowych. Szczepy lipidozależne uczestniczą u ludzi, między innymi, w etiologii łupieżu pstrego, łojotokowego zapalenia skóry i mieszków włosowych oraz atopowego zapalenia skóry (13). U zwierząt, a zwłaszcza psów, rzadziej kotów, *M. pachydermatis* odpowiedzialny jest za 30-80% przypadków zapalenia zewnętrznego przewodu słuchowego (*otitis externa*) i za około 30% przypadków łojotokowego zapalenia skóry (*dermatitis*) (30).

W ostatnich latach obserwuje się wyraźną zmianę profilu gatunków *Malassezia* występujących u ludzi i zwierząt. Zoofilne szczepy *M. pachydermatis* izolowane są obecnie coraz częściej ze zmian skórnych, a nawet przypadków fungemii u ludzi (10, 20). Równocześnie lipidozależne gatunki *Malassezia* związane, jak się wydawało, z człowiekiem, pojawiają się u różnych gatunków zwierząt (9). Odnotowano nawet pojedyncze przypadki izolacji lipidozależnych szczepów *Malassezia* od psów z objawami *otitis externa* (8).

Ustalenie czynnika etiologicznego infekcji wymaga w tej sytuacji nie tylko izolacji i identyfikacji grzyba, ale przede wszystkim wykazania jego patogenności. Badania prowadzone w tym kierunku znacznie utrudnia, obok podobieństwa morfologicznego i fizjologicznego występującego w obrębie lipidozależnych

gatunków *Malassezia*, wysoki stopień heterogenności i zmienność fenotypowa *M. pachydermatis*. Uwzględniając fakt, że zmienność w obrębie gatunku *M. pachydermatis* może być, między innymi, odzwierciedleniem stopnia ekspresji cech odpowiedzialnych za patogenność drobnoustrojów, celem badań było ustalenie fenotypowych cech grzyba, mogących mieć związek z jego chorobotwórczością.

### Materiał i metody

Badaniami objęto 40 szczepów *Malassezia pachydermatis*, wytypowanych z kolekcji własnej Zakładu Mikrobiologii Weterynaryjnej Instytutu Chorób Zakaźnych i Inwazyjnych Akademii Rolniczej w Lublinie oraz szczep referencyjny tego samego gatunku CBS 7925 pochodzący z kolekcji Centraalbureau voor Schimmelcultures Holandia.

Szczepy *M. pachydermatis* izolowane były z zewnętrznego kanału słuchowego od psów zdrowych klinicznie (n = 20) oraz z klinicznymi objawami stanu zapalnego (*otitis externa*) (n = 20). Szczepy pochodzące od zwierząt chorych typowano do badań jedynie w przypadku, kiedy izolowane były z materiału chorobowego w czystej kulturze, bez towarzyszącej flory bakteryjnej czy grzybiczej, a zastosowana u psów terapia przeciwgrzybicza przynosiła pozytywne efekty. Na tej podstawie przyjęto, że *M. pachydermatis* była w tych przypadkach czynnikiem etiologicznym *otitis externa*, a wyizolowane szczepy były patogenne.

Makromorfologię i mikromorfologię szczepów *M. pachydermatis* określono według schematu przedstawionego w pierwszej części pracy (24). Aktywność enzymatyczną badano w zakresie ekspresji: zewnątrzkomórkowych hydrolaz (API-ZYM), katalazy (12),  $\beta$ -glukozydazy (10), ureazy, kazeinazy, fosfolipazy (11) oraz hydrolaz Tweenów 20, 40, 60, 80 i Cremophoru EL (12, 14). Dokładna procedura badań oraz zasady interpretacji wyników przedstawione zostały we wcześniejszym opracowaniu (24).

### Wyniki i omówienie

Wysoki stopień zmienności fenotypowej w obrębie szczepów *M. pachydermatis* wykazany zarówno w badaniach własnych (32), jak i w pracach innych autorów (8, 11) był przesłanką do podjęcia prób ustalenia korelacji pomiędzy morfologicznymi i biochemicznymi cechami grzyba a jego patogennością. Badania morfologiczne wytypowanych szczepów wykazały, że izolaty pochodzące od psów z objawami *otitis externa* (szczepy patogenne) wytwarzały na ogół (80%) kolonie białe lub jasnokremowe, gładkie, średniej wielkości lub duże (tab. 1). Kolonie ciemnokremowe, szorstkie, małe lub średniej wielkości charakteryzowały w większości (60%) szczepy izolowane od zwierząt zdrowych klinicznie (tab. 1). Typ kolonii związany był prawdopodobnie z budową chemiczną ściany komórkowej, a dokładnie z zawartością i rodzajem nienasyconych kwasów tłuszczowych (30). Ponadto wysoka zawartość wydzieliny o charakterze lipidowym

Tab. 1. Makromorfologia szczepów *M. pachydermatis* pochodzących od zdrowych i chorych zwierząt

Szczepy pochodzące od zwierząt	Kolonie gładkie			Kolonie szorstkie		
	Małe < 1 mm	Średnie 1-2 mm	Duże > 2 mm	Małe < 1 mm	Średnie 1-2 mm	Duże > 2 mm
Zdrowych n = 20	27*, 66, 75, 76	23A, 40, 63	-	59, 65, 73, 86, 138, 141	26A, 64, 94, 124	16A, 44, 90
Chorych n = 20	-	26, 28, 32, 37, 46, 55, 78, 81, 133	14A, 36, 74, 89, 103, 104, 147	77	38, 43	47A

Objaśnienie: \* – numer szczepu

towarzysząca stanom zapalnym zewnętrznego przewodu słuchowego, zapewniając dogodne warunki do wzrostu drożdżaków i ich szybkiej proliferacji, umożliwia prawdopodobnie rozwój infekcji u tych zwierząt (3). Wykazano, że *M. pachydermatis* posiadając możliwość wbudowywania egzogennych kwasów tłuszczowych (15), ma zdolność wysokiej adaptacji do warunków środowiska. Należy przypuszczać, że skład i zawartość lipidów w skórze może w sposób istotny wpływać na metabolizm i wzrost komórek grzyba, a tym samym ułatwiać im kolonizację. Potwierdzeniem powyższej sugestii może być obserwacja, że infekcja na tle *Malassezia* spp. towarzyszy na ogół chorobom związanym ze zmianami w wydzielaniu i składzie łoju skóry (cukrzyca, nadczynność tarczycy, niedoczynność kory nadnerczy) (25).

Za heterogenność szczepów *M. pachydermatis* w wysokim stopniu odpowiedzialny jest również ich garnitur enzymatyczny, zarówno w zakresie składu, jak i ekspresji poszczególnych elementów. Wiadomo, że różnego rodzaju endo- i egzoenzymy umożliwiają grzybom kolonizację organizmu gospodarza, a także odgrywają istotną rolę w jego patogenności. Hydrolazy rozkładając między innymi wiązania peptydowe białek (proteazy), lipidy (lipazy i fosfolipazy) i polisacharydy (glukozydazy), dostarczają grzybom niezbędnych składników odżywczych, a tym samym warunkują ich wzrost i namnażanie się, często przy ograniczonym dostępie do pożywienia. Enzymy o charakte-

Tab. 2. Biotypy szczepów *Malassezia pachydermatis* izolowanych od zdrowych i chorych zwierząt

Biotyp	Szczepy pochodzące od zwierząt	
	zdrowych	chorych
I	34*, 90	36, 78
II	63, 66, 76, 86	
III	16a, 26a	14a, 74, 89, 133
IV	59, 73, 138	55, 147, 37
V	23a, 27, 75, 124, 141	28, 32
VI		26, 46, 81, 103, 104
VIII	65, 94	38, 47a, 77
nieoznaczone	40, 64	43

Objaśnienie: jak w tab. 1.

Tab. 3. Profile enzymatyczne szczepów *M. pachydermatis* (n = 40)

Nr szczepu/stan kliniczny	Fosfataza zasadowa	Esteraza c4	Esteraza lipazy c8	Lipaza c14	Arylamidaza leucynowa	Arylamidaza walinowa	Arylamidaza cystynowa	Trypsyna	$\alpha$ -chymotrypsyna	Fosfataza kwasna	Naftaleno-AS-BI-fosfohydrolaza	$\alpha$ -galaktozydaza	$\beta$ -galaktozydaza	$\beta$ -glukuronidaza	$\alpha$ -glukozydaza	$\beta$ -glukozydaza	n-acetylo- $\beta$ -glukozamidaza	$\alpha$ -mannozydaza	$\alpha$ -fukozydaza	Aktywność szczepu (nmol)
16a	5	20	10	5	40	5	0	0	0	40	20	0	0	0	0	5	0	0	0	150
23a	20	20	10	5	40	5	10	0	0	40	5	0	0	0	0	5	0	0	0	160
26a	10	20	10	0	40	5	0	0	0	40	20	0	0	0	0	5	0	0	0	150
27	20	20	20	10	40	5	10	0	0	40	5	0	0	0	0	5	0	0	0	175
40	5	20	20	0	40	0	0	0	0	40	10	0	0	0	0	20	0	0	0	155
44	30	10	20	10	40	10	5	0	0	40	40	0	0	0	0	5	0	0	0	210
59	10	20	5	0	40	5	0	0	0	30	10	0	0	0	0	10	0	0	0	130
63	5	10	10	0	40	0	0	0	0	40	10	0	0	0	0	5	0	0	0	120
64	5	20	20	0	40	0	0	0	0	40	10	0	0	0	0	20	0	0	0	155
65	30	20	10	10	40	0	0	0	0	40	20	0	0	0	0	20	0	0	0	190
66	5	30	10	0	40	0	0	0	0	40	5	0	0	0	0	5	0	0	0	135
73	10	30	20	10	40	10	0	0	0	40	20	0	0	0	0	10	0	0	0	190
75	10	20	20	10	40	20	10	0	0	40	5	0	0	0	0	5	0	0	0	180
76	5	20	10	0	20	0	0	0	0	40	5	0	0	0	0	5	0	0	0	105
86	5	20	5	0	40	0	0	0	0	40	5	0	0	0	0	5	0	0	0	120
90	30	20	20	0	40	5	5	0	0	40	40	0	0	0	0	10	0	0	0	210
94	30	20	10	5	40	5	5	0	0	30	30	0	0	0	0	5	0	0	0	180
124	20	20	20	5	40	5	5	0	0	40	10	0	0	0	0	5	0	0	0	170
138	10	20	10	5	40	5	0	0	0	40	5	0	0	0	0	20	0	0	0	155
141	10	30	20	0	40	5	0	0	0	40	5	0	0	0	0	5	0	0	0	155
14a*	10	20	5	5	40	5	0	0	0	40	5	0	0	0	0	0	0	0	0	130
26*	30	20	20	5	40	10	5	0	0	40	20	0	0	0	0	0	0	0	0	190
28*	30	10	10	10	40	5	10	0	0	40	20	0	0	0	0	5	0	0	0	180
32*	5	20	10	5	40	10	10	0	0	40	10	0	0	0	0	5	0	0	0	155
36*	20	10	20	10	40	5	10	0	0	40	20	0	0	0	0	5	0	0	0	180
37*	10	30	20	5	40	5	5	0	0	40	20	0	0	0	0	10	0	0	0	185
38*	40	20	20	5	40	5	10	0	0	40	20	0	0	0	0	20	0	0	0	220
43*	20	10	10	10	40	10	10	0	0	20	5	0	0	0	0	5	0	0	0	140
46*	30	10	10	0	40	5	0	0	0	40	20	0	0	0	0	5	0	0	0	160
47a*	30	20	20	10	40	5	0	0	0	40	20	0	0	0	0	20	0	0	0	205
55*	10	30	20	10	40	10	0	0	0	40	20	0	0	0	0	10	0	0	0	190
74*	10	20	10	0	40	5	0	0	0	40	20	0	0	0	0	5	0	0	0	150
77*	30	20	10	0	40	5	5	0	0	40	20	0	0	0	0	20	0	0	0	190
78*	20	10	10	10	40	10	10	0	0	40	20	0	0	0	0	10	0	0	0	180
81*	40	10	20	5	40	20	5	0	0	40	10	0	0	0	0	5	0	0	0	195
89*	20	10	10	0	30	5	0	0	0	40	5	0	0	0	0	5	0	0	0	125
103*	20	10	10	0	40	20	10	0	0	40	20	0	0	0	0	5	0	0	0	175
104*	40	10	10	0	40	20	5	0	0	40	20	0	0	0	0	5	0	0	0	190
133*	10	10	10	5	40	5	0	0	0	40	20	0	0	0	0	5	0	0	0	145
147*	30	20	10	0	40	5	0	0	0	40	20	0	0	0	0	10	0	0	0	175
CBS 7925	30	20	20	5	40	10	10	0	0	40	10	0	0	0	0	20	0	0	0	205

Objaśnienie: \* – szczepy pochodzące od chorych zwierząt

rze lipolitycznym i proteolitycznym mogą ponadto wpływać destrukcyjnie na błony komórek gospodarza, umożliwiając rozprzestrzenianie się grzybów w organizmie (29). Interesującym więc wydawało się określenie współzależności między ustalonym w badaniach wcześniejszych (24) biotypem szczepu *M. pachydermatis* a jego pochodzeniem (właściwości patogenne). Wykazano (tab. 2), że stopień korelacji był w tym zakresie zróżnicowany i jedynie dwa biotypy grupowały jednorodnie pod względem pochodzenia szczepu. Biotyp II, charakteryzujący się szorstkim typem wzrostu i bardzo niską aktywnością metaboliczną, obejmował szczepy izolowane od zdrowych klinicznie psów, podczas gdy biotyp VI, cechujący się gładką formą dysocjacyjną kolonii i bardzo wysoką ekspresją aktywności enzymatycznej, grupował patogenne szczepy *M. pachydermatis* (tab. 2).

Szczegółowa analiza obu badanych grup grzybów (szczepy komensaliczne i szczepy patogenne) w zakresie ekspresji egzogennych hydrolaz (API-ZYM) pozwoliła ustalić, że bez względu na pochodzenie, *M. pachydermatis* cechuje wysoka aktywność arylamidazy leucynowej i fosfatazy kwaśnej oraz brak ekspresji trypsyny,  $\alpha$ -chymotrypsyny,  $\alpha$  i  $\beta$ -galaktozydazy,  $\beta$ -glukuronidazy, n-acetylo- $\beta$ -glukuronidazy,  $\alpha$ -mannozydazy i  $\alpha$ -fukozydazy (tab. 3). Uzyskane wyniki zgodne z wcześniejszymi danymi (17) sugerują, że powyższy profil enzymatyczny jest charakterystycznym wzorcem metabolicznym dla gatunku *M. pachydermatis*. Ekspresja pozostałych enzymów jest zróżnicowana (tab. 3) i zależna w pewnym stopniu od pochodzenia badanego szczepu. Szczepy patogenne wykazywały istotnie wyższą ( $p < 0,005$ ) aktywność w zakresie fosfatazy zasadowej, arylamidazy walino-wej i arylamidazy cystynowej, natomiast szczepy komensaliczne charakteryzowała wysoka ekspresja ( $p < 0,005$ ) esterazy C4 (tab. 4).

W przypadku rodzaju *Malassezia* udział enzymów proteolitycznych w kolonizacji organizmu gospodarza oraz patogenności zarazka jest stosunkowo mało poznany. Prado i wsp. (26) w badaniach *in vitro* wykazały ekspresję tych enzymów u większości szczepów *Malassezia* i przez analogię z rodzajem *Candida* czy *Cryptococcus* sugerowali ich istotną rolę w patogenezie infekcji poprzez degradację elementów układu odpornościowego, takich jak immunoglobuliny, składowe dopełniacza, laktoperoksydaza czy cytokiny (1, 21).

W przypadku grzybów z rodzaju *Malassezia*, poza informacją, że proteazy stymulują proliferację keratynocytów *in vitro* (28) i mogą być czynnikami oddziałującymi drażniąco na zakończenia nerwów czuciowych w skórze, wywołując świąd (28), brak bliższych danych na ten temat.

Istotnie statystycznie wyższa aktywność szczepów *Malassezia* wyizolowanych z przypadków chorobowych, w zakresie fosfatazy zasadowej może świadczyć o znaczącej roli tego enzymu nie tylko w procesach metabolicznych, ale także w patogenności

Tab. 4. Aktywność enzymatyczna *Malassezia pachydermatis* w zależności od źródła pochodzenia szczepu (nmol)

Enzym	Szczepy pochodzące od zwierząt	
	zdrowych	chorych
Fosfataza zasadowa	13,75 (9,7)	22,75* (11,1)**
Esteraza C4	20,05* (5,1)	16,00 (6,8)
Esteraza lipazy C8	14,00 (5,7)	13,25 (5,1)
Lipaza C14	3,75 (4,1)	4,75 (4,1)
Arylamidaza leucynowa	38,00 (2,2)	39,50 (4,4)
Arylamidaza walino- wa	4,50 (4,8)	8,50* (5,4)
Arylamidaza cystynowa	2,50 (3,8)	4,75* (4,4)
Fosfataza kwaśna	39,00 (3,0)	39,00 (4,4)
Naftaleno-AS-BI-fosfohydrolaza	14,00 (11,4)	16,75 (5,9)
$\beta$ -glukozydaza	8,75 (6,0)	7,75 (4,6)
Ogółem	158,25 (13,1)	173,00 (12,8)

Objaśnienia: \* – różnica istotna statystycznie ( $p < 0,005$ ), \*\* – odchylenie standardowe

drożdżaków (2), między innymi przez supresyjne oddziaływanie na produkcję nadtlenu wodoru w trakcie wybuchu tlenowego w neutrofilach (27).

Poszerzenie charakterystyki fenotypowej szczepów *Malassezia pachydermatis* o badanie ich aktywności w zakresie testów stosowanych jako kryteria różnicowania międzygatunkowego dla rodzaju *Malassezia* (12) umożliwiło dokładniejsze ustalenie stopnia i zakresu ich heterogenności. Wyniki przedstawione w tab. 5 wskazują na zróżnicowany stopień aktywności grzybów w tym zakresie, jednak ze względu na trudności w analizie porównawczej danych, a także celem ułatwienia ich interpretacji i obiektywizacji, oznaczenia „+” lub „-” zastąpiono cyframi przy założeniu, że + = 1, ++ = 2, +++ = 3, ++++ = 4, -- = -1, --- = -2, ---- = -3, ----- = -4, bw (bez wpływu) = 0. Wykazano, że szczepy izolowane od psów z objawami *otitis externa* charakteryzowały się istotnie wyższą ( $p < 0,005$ ) aktywnością sumaryczną w badanym zakresie, w porównaniu do szczepów komensalicznych (tab. 6). Podwyższona ekspresja dotyczyła głównie enzymów lipolitycznych, jak fosfolipaza, enzymów hydrolizujących Tween 80, a także, w znacznie mniejszym stopniu Tween 40 i 60. Wrażliwość na inhibicyjne działanie Tweenu 20 i Cremophoru EL była nieznacznie podwyższona w stosunku do szczepów patogennych (tab. 5 i 6).

W przypadku grzybów z rodzaju *Malassezia* enzymy lipolityczne zapewniają możliwość przeżycia za-

Tab. 5. Aktywność enzymatyczna szczepów *Malassezia* – testy dodatkowe (n = 40)

Nr szczepu	Katalaza	Ureaza	Kazeinaza	$\beta$ -glukozydaza	Fosfolipaza	Cremophor EL	Hydroliza Tweenu			
							20	40	60	80
16a	++	+	-	++	-	----	---	+	++	b.w.
23a	++++	+	+	++++	-	----	---	++	++	+++
26a	+++	++++	+	++	-	---	---	++	+	+/-
27	++++	+++	++++	++	-	---	-	++++	++++	+++
40	+++	++	++	++	-	----	---	+	+++	+
44	++++	++	++++	++++	++	----	---	++	+++	+
59	+++	+++	+	++	++	--	b.w.	++++	+++	+
63	++++	+++	+	++++	-	---	--	+++	++	+
64	++	++++	++++	++	-	--	-	+++	+++	++++
65	+++	++	++	++++	++	----	---	++	++	++
66	+++	++	+	++	++	----	--	+++	+++	+
73	++++	+++	+	++++	-	--	----	+++	++++	++
75	++	+++	++++	++++	-	---	---	++	++	+
76	++	+++	++++	++	-	----	---	+++	++++	++
86	++++	++++	-	++++	-	--	---	++	+++	++
90	++++	+++	++++	++++	++++	----	----	++	+	++
94	++++	+++	+	++++	++	----	----	++++	++++	++
124	++++	+++	+	++++	-	----	b.w.	+++	+++	++
138	+++	+++	+	++	-	--	---	++	+++	++
141	++++	+++	++++	++	-	---	---	+++	+++	+++
14a*	++++	++++	++++	-	++++	----	---	++++	+	+++
26*	++++	++	++	-	++++	----	---	++	+++	++++
28*	++	++	+	++++	-	--	---	+++	++++	+++
32*	++++	+++	++++	++++	-	-	b.w.	+++	+	b.w.
36*	++++	+++	++++	++++	++	----	--	+++	+++	++
37*	++	+++	+	++++	++	----	----	+++	+++	+++
38*	++++	+	+	++++	-	---	----	++++	++++	++++
43*	+++	+++	+	++	-	---	b.w.	++++	+++	+++
46*	+++	++	++++	++	++	-	---	+++	++++	++
47a*	++++	++++	+	++	++	---	--	++	++++	+++
55*	++++	++	++++	++++	++	--	---	+++	+++	++
74*	++++	+++	+	++	++++	---	---	+++	+++	+++
77*	++	+++	++++	++++	++	----	b.w.	++	+++	+++
78*	++	+++	++++	++++	-	--	---	+++	+++	++++
81*	++++	+++	++++	++	++++	---	---	+++	+++	+++
89*	+++	++++	++++	++	++	--	---	++	++	++
103*	++++	+++	++++	++	++	----	b.w.	++	++	+++
104*	+++	++++	++++	++	++	--	b.w.	+++	+++	+++
133*	++++	+++	-	++	-	----	---	++++	++++	++++
147*	++++	++	++++	++++	++	--	---	+++	+++	++
CBS 7925	++++	+++	++++	++++	++	--	---	++	+++	+++

Objaśnienie: \* – szczepy pochodzące od chorych zwierząt

równy w środowisku zewnętrznym, jak i w organizmie gospodarza (10, 14, 19), jednocześnie mogą odgrywać istotną rolę w jego patogenności. Degradacja powierzchniowych lipidów skóry nie tylko dostarcza grzybom składników niezbędnych do wzrostu, ale również może ekspozycjonować receptory na komórkach gospodarza. Dostępność receptorów oraz silne właściwości hydrofobowe grzyba (31) znacznie ułatwiają proces jego adherencji, a następnie kolonizację makroorganizmu, co może umożliwić pierwsze stadium infekcji (31). Ponadto uwolnione podczas hydrolizy wolne kwasy tłuszczowe wywierają wielokierunkowy wpływ na układ immunologiczny gospodarza; działają między innymi hamująco na proliferację limfocytów T, co w efekcie obniża ich cytotoksyczną aktywność (18), hamują aktywację fagocytów oraz stymulują stan zapalny poprzez drażniące oddziaływanie na skórę (18). Lipaza obniża ponadto wewnątrzkomórkowe procesy zabijania granulocytów oraz hamuje ich chemotaksję (31).

Fosfolipaza odpowiedzialna za uszkodzenie błon komórkowych gospodarza wydaje się jednym z istotnych markerów patogenności grzybów z rodzaju *Malassezia* (6). Jej ekspresja wzrasta wraz ze wzrostem fosfolipidów w środowisku, co może być następstwem toczącego się procesu zapalnego (26). Zwiększona aktywność fosfolipazy, cechująca szczepy wyizolowane z przypadków *otitis externa* w obecnych badaniach, potwierdzona również przez innych autorów (5, 29), wskazuje na bezpośredni udział tego enzymu w patogenie schorzeń wywoływanych przez *M. pachydermatis*.

Reasumując należy stwierdzić, że szczepy *M. pachydermatis* izolowane od psów z klinicznych przypadków *otitis externa* i spełniające ogólnie przyjęte kryteria patogenności dla tego gatunku grzyba, charakteryzowały się na ogół gładkim typem wzrostu o jasnokremowych, dużych lub średnich koloniach oraz wysoką ekspresją enzymów lipolitycznych, jak fosfolipaza i hydrolaza Tweenu 80, a także aryamidazy walinowej

**Tab. 6. Aktywność enzymów *Malassezia pachydermatis* w testach dodatkowych w zależności od źródła pochodzenia szczepów – wartości średnie**

Szczepy izolowane od zwierząt:	Katalaza	Ureaza	Kazeinaza	$\beta$ -glukozydaza	Fosfolipaza	Cremophor EL	Tween 20	Tween 40	Tween 60	Tween 80	Suma
Zdrowych	3,3	2,75	2,0	3,0	0,6*	-3,25	-2,6	2,6	2,8	1,8*	13,00 (2,3)**
Chorych	3,4	2,85	2,8	2,7	1,8	-2,80	-2,1	3,0	3,0	2,8	17,45 (2,2)

Objaśnienia: \* – różnica istotna statystycznie ( $p < 0,005$ ), \*\* – odchylenie standardowe

i cystynowej (aminopeptydazy) i fosfatazy zasadowej. Powyższy profil fenotypowych cech *M. pachydermatis* może stanowić znaczne ułatwienie w oznaczaniu patogenności szczepów izolowanych z materiału klinicznego.

### Piśmiennictwo

1. Antul Z., Rasheed M., Choudhary M. J., Rosanne S., Khan K. M., Rahman A.: Kinetics of novel competitive inhibitors of urease enzymes by a focused library of oxadiazoles, thiazidiazoles and triazoles. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004, 319, 1053-1063.
2. Baca O. G., Roman M. J., Glew R. H.: Acid phosphatase activity in *Coxiella burnetii*: a possible virulence factor. *Infect. Immun.* 1993, 61, 4232-4239.
3. Bond R., Lamport A. J., Lloyd D. H.: Colonization status of *Malassezia pachydermatis* on the hair and in the hair follicle of healthy beagle dogs. *Res. Vet. Sci.* 2000, 68, 291-293.
4. Breuer-Strosberg R., Hocheithner M., Kuttin E. S.: *Malassezia pachydermatis* isolation from a scarlet maceaw. *Mycoses* 1990, 33, 247-250.
5. Cafarchia C., Otranto D.: Association between phospholipase production by *Malassezia pachydermatis* and skin lesions. *J. Clin. Microbiol.* 2004, 42, 4868-4869.
6. Coutinho S. D., Paula C. R.: Proteinase, phospholipase, hyaluronidase and chondroitin-sulphatase production by *Malassezia pachydermatis*. *Med. Mycology* 2000, 38, 73-76.
7. Crespo M. J., Abarca M. J., Cabanes F. J.: Occurrence of *Malassezia* spp. in horses and domestic ruminants. *Mycoses* 2002, 45, 333-337.
8. Crespo M. J., Abarca M. L., Cabanes F. J.: Atypical lipid-dependent *Malassezia* species isolated from dogs with otitis externa. *J. Clin. Microbiol.* 2000, 38, 2383-2385.
9. Duarte E. R., Melo M. M., Hahn R. C., Hamdan J. S.: Prevalence of *Malassezia* species in the ears of asymptomatic cattle with otitis in Brasil. *Med. Mycology* 1999, 37, 159-162.
10. Gueho E., Boeghout T., Ashbee H. R., Guillot J., Van Belkum A., Faergemann J.: The role of *Malassezia* species in the ecology of human skin and as pathogens. *Med. Mycology* 1998, 36, 220-229.
11. Guillot J., Bond R.: *Malassezia pachydermatis*: a review. *Med. Mycology* 1999, 37, 295-306.
12. Guillot J., Gueho E., Lesourd M., Midgley G., Chevrier G., Dupont B.: Identification of *Malassezia* species: A practical approach. *J. Mycol. Med.* 1996, 6, 133-110.
13. Gupta A. K., Batra R., Bluhm R., Boekhout T., Dawson T. I.: Skin diseases associated with *Malassezia* species. Gupta A. K., Batra R., Bluhm J. *Am. Acad. Dermatol.* 2004, 51, 785-798.
14. Gupta A. K., Kohli Y., Faergemann J., Summerbell R. C.: Epidemiology of *Malassezia* yeasts associated with pityriasis versicolor in Ontario, Canada. *Med. Mycology* 2001, 39, 199-206.
15. Huang H. P., Little C. J. L.: Effects of fatty acids on the growth and composition of *Malassezia pachydermatis* and their relevance to canine otitis externa. *Res. Vet. Sci.* 1993, 55, 119-123.
16. Inamader A. C., Palit A.: The genus *Malassezia* and human disease. *Indian J. Dermatol.* 2003, 69, 265-270.
17. Mancianti F., Rum A., Nardoni S., Carazza M.: Extracellular enzymatic activity of *Malassezia* species. *Mycopathologia* 2000, 149, 131-135.
18. Masuda A., Sukegawa T., Mizumoto N., Tani H., Miyamoto T., Sasai K., Baba E.: Study of lipid in the ear canal in canine otitis externa with *Malassezia pachydermatis*. *J. Vet. Med. Sci.* 2000, 62, 1177-1182.

19. Mayser P., Haze P., Papavassilis C., Mickel M., Gruender K., Gueho E.: Differentiation of *Malassezia* species: selectivity of Cremophor EL, castor oil and ricinoleic acid for *Malassezia furfur*. *Br. J. Dermatol.* 1997, 137, 208-213.
20. Mickelsen P. A., Viano-Paulson M. C., Stevens D. A., Diaz P. S.: Clinical and microbiological features of infection with *Malassezia pachydermatis* in high-risk infant. *J. Infect. Dis.* 1988, 6, 1163-1168.
21. Miyoshi S., Shinoda S.: Microbial metalloproteases and pathogenesis. *Microbes Infect.* 2000, 2, 91-98.
22. Nakabayashi A., Sei Y., Guillot J.: Identification of *Malassezia* species

- isolated from patients with seborrheic dermatitis, atopic dermatitis, pityriasis versicolor and normal subjects. *Med. Mycology* 2000, 38, 337-341.
23. Nakagaki K., Hata K., Iwata E., Takeo K.: *Malassezia pachydermatis* isolated from a South American Sea Lion with dermatitis. *J. Vet. Med. Sci.* 2002, 62, 901-903.
  24. Nowakiewicz A., Ziolkowska G.: Fenotypowa charakterystyka szczepów *Malassezia pachydermatis*. *Medycyna Wet.* (Praca przyjęta do druku L. Dz. 110/2005).
  25. Patterson A. D., Frank L. A.: How to diagnose and treat *Malassezia* dermatitis in dogs. *Vet. Medicine* 2002, 8, 612-622.
  26. Prado M. R., Brito E. H. S., Giroto M. O., Monteiro A. J., Sidrim J. J. C., Rocha M. F. G.: Higher incidence of *Malassezia pachydermatis* in the eyes of dogs with corneal ulcer than in healthy dogs. *Vet. Microbiol.* 2004, 100, 115-120.
  27. Reilly J. J., Baron G. S., Nano F. E.: Characterization and sequence of a respiratory burst inhibiting acid phosphatase from *Francisella tularensis*. *J. Biol. Chem.* 1996, 271, 10973-10983.
  28. Richard Ch. T., Halliwell E. W., Hill P. B.: Failure to extract from *Malassezia pachydermatis* to stimulate canine keratinocyte proliferation in vitro. *Vet. Dermatol.* 2002, 13, 323-329.
  29. Serda Kantarciogolu A., Yickel A.: Phospholipase and protease activities in clinical *Candida* isolates with reference to the sources of strains. *Mycoses* 2002, 45, 160-165.
  30. Staroniewicz Z., Król J., Cierpisz J.: Flora bakteryjna i grzybicza w otitis externa u psów. *Medycyna Wet.* 1995, 51, 667-670.
  31. Stehr F., Kretschmar M., Kroger C., Hube B., Schafer W.: Microbial lipases as virulence factor. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* 2003, 22, 347-355.
  32. Ziolkowska G., Nowakiewicz A.: Występowanie grzybów z rodzaju *Malassezia* w zewnętrznym kanale słuchowym u psów. *Medycyna Wet.* 2004, 60, 310-313.

Adres autora: dr hab. Grażyna Ziolkowska prof. AR, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin; e-mail: g.ziolkowska@ar.lublin.pl