

Mikrobiota grzybicza powłok zewnętrznych zwierząt wolno żyjących

GRAŻYNA ZIÓŁKOWSKA, MAGDALENA BUDZIWOJSKA,
ANETA NOWAKIEWICZ, PRZEMYSŁAW ZIĘBA*

Zakład Mikrobiologii Weterynaryjnej Instytutu Biologicznych Podstaw Chorób Zwierząt
Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UP, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin
*Zakład Higieny Weterynaryjnej, ul. Słowicza 2, 20-336 Lublin

Ziółkowska G., Budziwojska M., Nowakiewicz A., Zięba P.
Integumentary mycotic microbiota in wildlife animals

Summary

The objective of the research was to assess the presence of mycotic microbiota on the integument of wild boars and roe-deer, as well as to isolate and identify each species.

The research material comprised groin screening swabs collected from 13 wild boars and 56 roe-deer from the Lublin State Forests. The fungi were identified concurrently on the Sabouraud and MLNA medium at 25°C, 32°C and 37°C temperature for 14 days. Initial identification proceeded according to the conventional mycological procedures followed by the application of the commercial API Candida and API 20C Aux (bioMerieux) (Candida genus) tests and the phenotypic scheme developed by Guillot et al. (Malassezia genus). The present research has revealed that mycotic flora was recovered in all a total of 69 examined animals. The most frequently isolated fungi included *Penicillium* spp., *Alternaria* spp., *Cladosporium* spp. and *Malassezia* spp. and *Rhodotorula* spp. The species analysis of the isolated fungi has confirmed the presence of potential pathogens, such as *Malassezia sympodialis*, *Aspergillus fumigatus* and *Candida non-albicans*. The obtained results indicate that a population of free-living animals may constitute a critical link in the epidemiologic chain of mycotic infections.

Keywords: wildlife animals, yeast-like fungus, moulds

Zwierzęta wolno żyjące stanowią ważne ogniwo w łańcuchu epidemiologicznym chorób zakaźnych i inwazyjnych występujących u ludzi i zwierząt towarzyszących i hodowlanych. Wykazano, że mogą być one rezerwuarem między innymi takich patogenów, jak wirusy: *Enterovirus*, *Morbilivirus*, *Lyssavirus*, *Paramyxovirus*, *Pestivirus*, *Orbivirus* oraz bakterie: *Bacillus anthracis*, *Brucella* spp., *Mycobacterium bovis* (3).

Proces rozprzestrzeniania się chorób jest na ogół dwukierunkowy, tzn. potencjalne patogeny mogą przenosić się od zwierząt wolno żyjących na hodowlane lub towarzyszące i odwrotnie (32). Ze względu na obowiązujący do niedawna pogląd, że choroba w środowisku naturalnym jest elementem ekosystemu i odgrywa ważną rolę w selekcji naturalnej zwierząt, nadzór epidemiologiczny nad populacją zwierząt dzikich podejmowano jedynie w przypadku wybuchu infekcji charakteryzujących się gwałtownym przebiegiem, wysoką śmiertelnością i stanowiących zagrożenie zachorowania ludzi i zwierząt domowych (22). Szybko postępujące zmiany ekologiczne, obserwowane na świe-

cie w ostatnich latach, obejmujące między innymi drobnoustroje patogenne, ich wektory, a także potencjalnych gospodarzy (8), odpowiedzialne są za powstawanie nowych (emerging), niekiedy bardzo niebezpiecznych chorób w wolno żyjącej populacji zwierząt, jak na przykład gruźlica wywołwana przez *Mycobacterium bovis* u zwierząt mięsożernych lub infekcji wirusem FIV i wirusem nosówki u lisów i gatunków kotowatych (31). Ponadto populacja ta, jako asymptomatyczni nosiciele, może być źródłem tak groźnych zoonoz jak: gorączka krwotoczna różnego typu, hantawirusowego zespołu płucnego czy też choroby Lyme (31). W ostatnich dekadach, ze względu na dramatyczny wzrost infekcji grzybiczych obserwowany u ludzi i zwierząt hodowlanych oraz towarzyszących, wzrosło zainteresowanie tymi drobnoustrojami zarówno mikrobiologów klinicznych, lekarzy, jak i epidemiologów.

Choroby wywołwane przez grzyby, zwłaszcza przez organizmy oportunistyczne, dotyczące pacjentów z zaburzeniami w funkcjonowaniu układu immunologicznego, mają na ogół ciężki przebieg, kończący się nierzadko zejściem śmiertelnym (30).

Trudności diagnostyczne występujące w przypadku grzybic komplikują dodatkowo permanentnie poszerzające się spektrum gatunków patogennych (20 nowych gatunków rocznie). Obok znanych dotychczas czynników etiologicznych grzybic, jak: *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Cryptococcus neoformans*, występują również *Candida* z grupy *non-albicans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus flavus*, a także *Fusarium spp.*, *Acremonium spp.*, grzyby z gromady *Zygomycota*, *Paecilomyces spp.* i inne (30). O ile prowadzone są badania monitoringowe odnośnie do bioty grzybiczej występującej w ontocenozach człowieka i w środowisku bytowania (domy mieszkalne, miejsca pracy, szpitale), o tyle prace z tego zakresu dotyczące zwierząt są stosunkowo nieliczne (30).

Celem przeprowadzonych badań było określenie mikrobioty grzybiczej występującej na skórze zwierzęcej płowej i dzików oraz jej analiza w aspekcie potencjalnej patogenności.

Materiał i metody

Badaniami objęto 69 zwierząt poddanych odstrzałowi (Lubelskie Lasy Państwowe na przełomie 2006 r.). Materiał w postaci wymazów z okolicy pachwin pobierano przy pomocy jałowych pałeczek bawełnianych od 56 saren i 13 dzików. Celem izolacji mikroflory występującej na skórze badanych zwierząt, pobrane próbki materiału wysiewano na stałe podłoże Sabourauda z dodatkiem chloramfenikolu, podłoże Sabourauda z dodatkiem chloramfenikolu oraz cykloheximidu, a także podłoże MLNA (skład: 2% glukozy, 1,5% peptonu, 0,5% glicerolu, 1% Tween 60, 1% oliwy z oliwek oraz 2% agaru). Inkubację posiewów prowadzono równolegle w temperaturze 25°C, 32°C (posiewy na podłożu MLNA) oraz 37°C przez okres 14 dni.

Wstępną klasyfikację grzybów przeprowadzono na podstawie oceny ich wymagań wzrostowych (podłoże, temperatura), makromorfologii kolonii i badań mikroskopowych. W identyfikacji gatunkowej grzybów drożdżopodobnych zastosowano klasyczne metody mikologiczne obejmujące: badanie mikroskopowe, test filamentacji, wytwarzanie chlamidospor, określenie zdolności grzybów do fermentacji (zymogram) oraz asymilacji (auksanogram) cukrów. Uzyskane wyniki zweryfikowano przy zastosowaniu komercyjnych testów API Candida i API 20C Aux (bioMerieux, Francja) oraz klucza identyfikacyjnego według Lodder i Kreger van Rij (2, 17). W przypadku grzybów zaklasyfikowanych wstępnie jako *Malassezia spp.* (charakterystyka makro- i mikromorfologiczna), w celu identyfikacji na poziomie gatunku zastosowano: Tween test (14), Cremophor EL-test (20), próbę na katalazę i β -glukozydazę (12, 20). Grzyby pleśniowe identyfikowano według klucza opracowanego przez de Hoog i wsp. (15).

Wyniki i omówienie

Skóra i jej wytwory stanowią, zarówno u ludzi, jak i u zwierząt, doskonałą niszę ekologiczną dla wielu gatunków grzybów. Kompozycja mikrobioty oraz jej gęstość jest zróżnicowana i zależy od gatunku gospo-

darza, a także warunków środowiska, w jakim żyje. Organizmy zasiedlające mają na ogół charakter komensalny, jednak pod wpływem pewnych, nie do końca poznanych czynników, mogą powodować infekcje oportunistyczne, stanowiące poważny problem medyczny zarówno dla gospodarza, jak i kontaktujących się z nim ludzi i zwierząt (21, 25).

Badania wykazały obecność na skórze zwierząt wolno żyjących mikrobioty grzybiczej, przy czym grzyby drożdżopodobne izolowano od 35 (50,7%), a grzyby pleśniowe od 62 (89,8%) osobników (tab. 1). Bez względu na gatunek badanych zwierząt, udział grzybów pleśniowych w wyizolowanej puli szczepów był dominujący i stanowił 63,4%, pozostałe szczepy (36,6%) zaklasyfikowano do grzybów drożdżopodobnych (tab. 1).

Najczęściej izolowano grzyby z rodzaju: *Penicillium spp.*, *Alternaria spp.*, *Cladosporium spp.* oraz *Malassezia spp.* i *Rhodotorula spp.*, podczas gdy obecność gatunków zaliczanych do *Candida spp.*, *Aspergillus spp.*

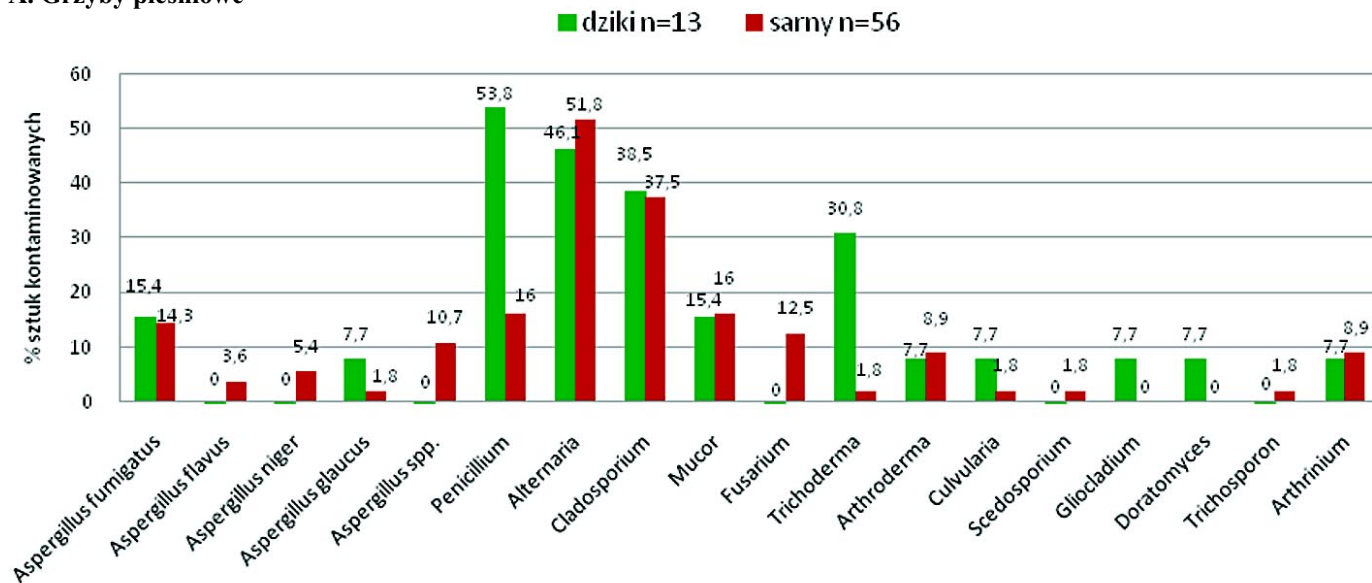
Tab. 1. Mikrobiota grzybicza izolowana ze skóry zwierząt wolno żyjących

Gatunek zwierząt	Zwierzęta kontaminowane liczba/%		Wyizolowane szczepy liczba/%		
	Drożdże	Pleśnie	Drożdże	Pleśnie	Ogółem
Dziki n = 13	7/54	13/100	10/23,8	32/76,2	42
Sarny n = 56	28/50	49/87,5	72/39,6	110/60,4	182
Ogółem n = 69	35/50,7	62/89,8	82/36,6	142/63,4	224

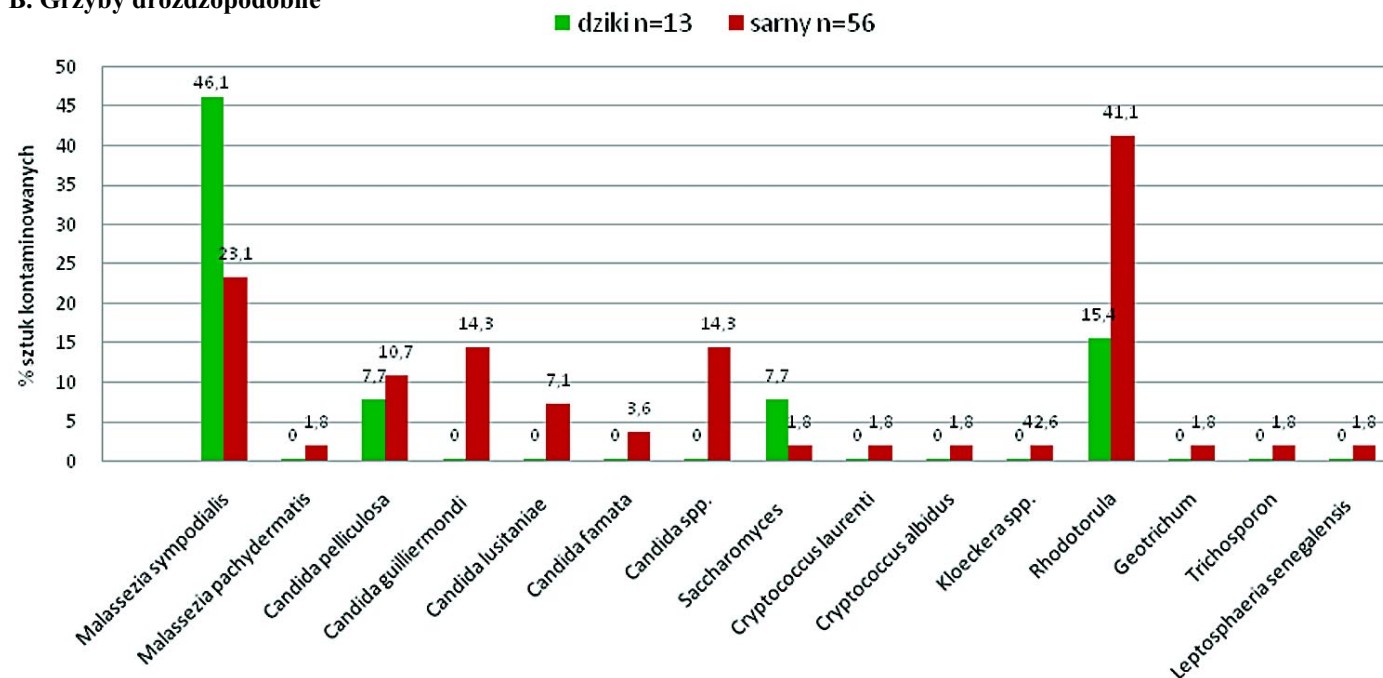
Tab. 2. Grzyby potencjalnie chorobotwórcze izolowane ze skóry zwierząt wolno żyjących (% sztuk kontaminowanych)

Rodzaj/gatunek	Dziki (n = 13)	Sarny (n = 56)	Ogółem (n = 69)
<i>Malassezia</i>	46,1	25,0	71,1
<i>M. sympodialis</i>	46,1	23,2	69,3
<i>M. pachydermatis</i>	–	1,8	1,8
<i>Aspergillus</i>	23,1	35,8	58,9
<i>A. fumigatus</i>	15,4	14,3	29,7
<i>A. flavus</i>	–	3,6	3,6
<i>A. niger</i>	–	5,4	5,4
<i>A. glaucus</i>	7,7	1,8	9,5
<i>Aspergillus spp.</i>	–	10,7	10,7
<i>Candida</i>	7,7	50,0	57,7
<i>C. pelliculosa</i>	7,7	10,7	18,4
<i>C. guilliermondi</i>	–	14,3	14,3
<i>C. lusitaniae</i>	–	7,1	7,1
<i>C. famata</i>	–	3,6	3,6
<i>Candida spp.</i>	–	14,3	14,3

A. Grzyby pleśniowe



B. Grzyby drożdżopodobne



Ryc. 1. Profil gatunkowy mikroflory grzybiczej występującej na skórze zwierząt wolno żyjących

i *Trichoderma spp.* utrzymywały się na poziomie istotnie niższym (ryc. 1a, b). Identyfikacja gatunkowa przeprowadzona w obrębie drobnoustrojów o potencjalnie oportunistycznym wzorcu patogenności wykazała w badanej populacji obecność głównie *Malassezia sympodialis* (69,3%) oraz *Aspergillus fumigatus* (29,7%), *Candida pelliculosa*, *Candida guilliermondi* i *Candida lusitanae* (ryc. 1a, b, tab. 2).

Grzyby z rodzaju *Malassezia* zaliczane są do lipofilnych składników mikrobioty skóry i błon śluzowych większości zwierząt stałocieplnych i człowieka, które w określonych warunkach mogą być również odpowiedzialne za infekcje oportunistyczne (5-7). Do niedawna uważano, że *M. pachydermatis* (gatunek lipidoniezależny) kolonizuje skórę zwierząt, głównie mię-

sożernych, podczas gdy lipidozależne gatunki *Malassezia* związane są z człowiekiem (13, 19). Badania ostatnich lat wykazały wyraźną zmianę tego profilu. Lipidozależne gatunki *Malassezia* izolowano od przeżuwaczy i koni, przy czym częstotliwość ich występowania była znacznie wyższa niż *M. pachydermatis* (10). Koty i psy, zarówno zdrowe kliniczne, jak i z objawami otitis externa czy dermatitis wykazywały obecność *M. furfur*, *M. globosa* i *M. sympodialis* (4, 23). U ludzi natomiast odnotowywano przypadki fungemii na tle *M. pachydermatis* (9).

Obecne badania wskazują, że podobnie jak u zwierząt hodowlanych w mikrobiocie skóry zwierząt wolno żyjących (dziki, sarny), znaczący udział mają lipidozależne gatunki *Malassezia*. *M. sympodialis* izolo-

wano od 46,1% badanej populacji dzików i 23,2% saren, podczas gdy szczep *M. pachydermatis* stwierdzono w jednym przypadku (1,8%) (tab. 2). Występowanie *M. sympodialis* u znacznego odsetka owiec, kóz, bydła, koni i świń, a także wolno żyjących gatunków kotowatych odnotowywali również inni autorzy (1, 10, 11, 24).

Do grupy potencjalnych patogenów oportunistycznych zaliczyć należy także szczepy z grupy *Candida non-albicans*, wykazywane u około 50% badanych saren. Najczęściej izolowane gatunki z tej grupy to: *Candida guillermonti* (14,3%), *Candida pelliculosa* (10,7%) i *Candida lusitanae* (7,1%). W grupie badanych dzików grzyby z rodzaju *Candida* izolowano jedynie od 7,7% osobników i była to *Candida pelliculosa* (ryc. 1b). Ponadto wykazano również obecność grzybów rodzaju *Aspergillus* (sarny 35,8%, dziki 23,1%), przy czym gatunkiem dominującym był *Aspergillus fumigatus* (ryc. 1a). Obie grupy drobnoustrojów, tj. *Candida non-albicans* oraz *Aspergillus fumigatus* i *A. non-fumigatus* stanowią obecnie duże zagrożenie zdrowia zwierząt hodowlanych, ptaków, a przede wszystkim ludzi (18, 26, 27). *Candida spp.* zajmuje trzecie miejsce wśród czynników odpowiedzialnych za grzybicę inwazyjną u ludzi, dotyczącą układu krwionośnego (28), a *Aspergillus spp.* stanowi najwyższe zagrożenie życia dla biorców szpiku kostnego (29).

Biorąc pod uwagę fakt, że około 60% patogenów odpowiedzialnych za infekcje u ludzi pochodzi od zwierząt (16), wykazanie w obecnych badaniach stosunkowo wysokiego zakażenia powłok zewnętrznych zwierząt wolno żyjących gatunkami grzybów o oportunistycznym wzorcu patogenności wskazuje, że mogą one stanowić ważne ogniwo w łańcuchu epidemiologicznym zakażeń grzybiczych.

Piśmiennictwo

1. *Acqua Coutinho dall S., Fedullo J. D., Correa S. H.*: Isolation of *Malassezia spp.* from cerumen of wild felids. *Med. Mycol.* 2006, 44, 383-387.
2. *Barnett J. A., Payne R. W., Yarrow D.*: Yeasts: Characteristic and Identification. University Press, Cambridge 1990.
3. *Bengis R. G., Kock A. K., Fischer J.*: Infectious animal diseases: the wildlife/livestock interface. *Rev. Sci. Tech. OIE* 2002, 21, 53-65.
4. *Bond R., Howell S. A., Haywood P. J., Lloyd D. H.*: Isolation of *Malassezia sympodialis* and *Malassezia globosa* from healthy pet cats. *Vet. Rec.* 1997, 141, 200-201.
5. *Cafarchia C., Gallo S., Danesi P., Capelli G., Paradies P., Traversa D., Gasser R. B., Otranto D.*: Assessing the relationship between *Malassezia* and leishmaniasis in dogs with or without skin lesions. *Acta Trop.* 2008, 107, 25-29.
6. *Cafarchia C., Gallo S., Romito D., Capelli G., Chermette R., Guillot J., Otranto D.*: Frequency, body distribution, and population size of *Malassezia* species in healthy dogs with localized cutaneous lesions. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2005, 17, 316-322.
7. *Castella G., Hernandez J. J., Cabanes F. J.*: Genetic typing of *Malassezia pachydermatis* from different domestic animals. *Vet. Microbiol.* 2005, 108, 291-296.
8. *Chivian E.*: Environment and health: 7. Species loss and ecosystem disruption- the implications for human health. *JAMC* 2001, 164, 66-69.
9. *Chryssanthou E., Broberger U., Petrini B.*: *Malassezia pachydermatis* fungaemia in neonatal intensive care unit. *Acta Paediatr.* 2001, 90, 323-327.
10. *Crespo M. J., Abarca M. L., Cabanes F. J.*: Occurrence of *Malassezia spp.* in horses and domestic ruminants. *Mycoses* 2002, 45, 333-337.
11. *Garau M., del Palacio A., Garcia J.*: Prevalence of *Malassezia spp.* in healthy pigs. *Mycoses* 2005, 48, 17-20.

12. *Gueho E., Boekhout T., Ashbee H. R., Guillot J., Belkum A., Faergemann J.*: The role of *Malassezia* species in the ecology of human skin and as pathogens. *Med. Mycol.* 1998, 36, 220-229.
13. *Guillot J., Bond R.*: *Malassezia pachydermatis*: a review. *Med. Mycol.* 1999, 37, 295-306.
14. *Guillot J., Gueho E., Lesourd M., Midgley G., Chevrier G., Dupont B.*: Identification of *Malassezia* species. A practical approach. *J. Mycol. Med.* 1996, 6, 103-110.
15. *Hoog de G. S., Guarro J., Gené J., Figueras M. J.*: Atlas of Clinical Fungi. Centraalbureau voor Schimmelcultures and Universitat Rovira i Virgili, Utrecht, the Netherlands and Reus, Spain 2000.
16. *Kahn L. H.*: Managing zoonotic disease risks: need for greater physician and veterinarian collaboration. *J. Chinese Clin. Med.* 2007, 2, 105-109.
17. *Lodder J., Kreger van Rij N. J. W.*: The Yeasts: A Taxonomic Study. Science 1953, 117, 237.
18. *Maertens J., Vrebos M., Boogaerts M.*: Assessing risk factors for systemic fungal infections. *Eur. J. Cancer Care* 2001, 10, 56-62.
19. *Mason K. V., Evans A. G.*: Dermatitis associated with *Malassezia pachydermatis* in 11 dogs. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 1991, 27, 13-20.
20. *Mayser P., Haze P., Papavassilis C., Pickel M., Gruender K., Gueho E.*: Differentiation of *Malassezia* species: selectivity of Cremophor EL, Castor oil and ricinoleic acid for *M. furfur*. *Br. J. Dermatol.* 1997, 137, 208-213.
21. *Meyer W., Neurand K., Tanyolac A.*: General anti-microbial properties of the integument in fleece producing sheep and goats. *Small Ruminant Res.* 2001, 41, 181-190.
22. *Mörner T., Obendorf D. L., Artois M., Woodford M. H.*: Surveillance and monitoring of wildlife diseases. *Rev. Sci. Tech. OIE* 2002, 21 (1), 67-76.
23. *Nardoni S., Mancianti F., Corazza M., Rum A.*: Occurrence of *Malassezia* species in healthy and dermatologically diseased dogs. *Mycopathologia* 2004, 157, 383-388.
24. *Nell A., James S. A., Bond C. J., Hunt B., Herrtage M. E.*: Identification and distribution of a novel *Malassezia* species yeast on normal equine skin. *Vet. Rec.* 2002, 150, 395-398.
25. *Outerbridge C. A.*: Mycologic disorders of the skin. *Clin. Tech. Small Anim. Pract.* 2006, 21, 128-134.
26. *Pfaller M. A., Diekema D. J.*: Rare and emerging opportunistic fungal pathogens: concern for resistance beyond *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. *J. Clin. Microbiol.* 2004, 42, 4419-4431.
27. *Rochette F., Engelen M., Bossche H. V.*: Antifungal agents of use in animal health-practical applications. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* 2003, 26, 31-53.
28. *St-Germain G., Laverdiere M., Pelletier R., Rene P., Bourgault A. M., Lemieux C., Libman M.*: Epidemiology and antifungal susceptibility of bloodstream *Candida* isolates in Quebec: Report on 453 cases between 2003 and 2005. *Can. J. Dis. Med. Microbiol.* 2008, 19, 55-62.
29. *Walsh T. J., Groll A., Hiemenz J., Fleming R., Roilides E., Anaissie E.*: Infections due to emerging and uncommon medically important fungal pathogens. *Clin. Microbiol. Infect.* 2004, 10, 48-66.
30. *Walsh T. J., Groll A. H.*: Emerging fungal pathogens: evolving challenges to immunocompromised patients for the twenty-first century. *Transpl. Infect. Dis.* 1999, 1, 247-261.
31. *Williams E. S., Yuill T., Artois M., Fischer J., Haigh S. A.*: Emerging infectious diseases in wildlife. *Rev. Sci. Tech. OIE* 2002, 21, 139-157.
32. *Wobeser G.*: Disease management strategies for wildlife. *Rev. Sci. Tech. OIE.* 2002, 21, 159-178.

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