

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Identifikace druhu *Malassezia pachydermatis* molekulárně biologickými
metodami

Bc. Petr Jošt

Diplomová práce
2009

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Katedra biologických a biochemických věd
Akademický rok: 2008/2009

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Petr JOŠT**

Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**

Studijní obor: **Analýza biologických materiálů**

Název tématu: **Identifikace druhu *Malassezia pachydermatis* molekulárně biologickými metodami**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

- 1) Vypracování literární rešerše.
- 2) Izolace DNA ze vzorků získaných z otitid psů a koček.
- 3) Optimalizace metody PCR pro identifikaci druhu *Malassezia pachydermatis*.
- 4) Zpracování a druhová identifikace jednotlivých vzorků.
- 5) Diskuze a závěr.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

podle pokynu vedoucího diplomové práce

Vedoucí diplomové práce:

RNDr. Dita Královcová

Katedra biologických a biochemických věd

Konzultant diplomové práce:

Mgr. Petra Lysková


Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání diplomové práce:

1. října 2008


Termín odevzdání diplomové práce:

7. května 2009


prof. Ing. Petr Lošťák, DrSc.

děkan

L.S.


doc. RNDr. Zuzana Bílková, Ph.D.

vedoucí katedry

V Pardubicích dne 27. února 2009

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezentováním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 4. 5. 2009

Petr Jošt

Na tomto místě bych rád poděkoval vedoucí mé diplomové práce RNDr. Dítě Královcové za ochotu a pomoc při orientaci v laboratoři, za odborné vedení a za cenné rady při sepsování této práce.

Dále bych chtěl poděkovat své rodině a přátelům za podporu během mého studia.

Seznam zkratek

A	adenin, purinová báze
A ₂₆₀	absorbance p i vlnové délce 260 nm
AFLP	polymorfizmus délky amplifikovaných fragment (z angl. Amplified fragment length polymorphism)
AMV	pta í myeloblastický virus (z lat. <i>avian myeloblastosis virus</i>)
bp	páry bází (z angl. basis pairs)
C	cytosin, pyrimidinová báze
cDNA	komplementární DNA (z angl. complementary nebo copy DNA)
DNA	deoxyribonukleová kyselina (z angl. deoxyribonucleic acid)
dATP	deoxyadenintrifosfát
dCTP	deoxycytozintrifosfát
dGTP	deoxyguanintrifosfát
dNTP	deoxynukleotidtrifosfát
dTTP	deoxythymintrifosfát
dsDNA	dvou et zcová DNA (z angl. double-stranded DNA)
dT	deoxythymin
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
G	guanin, purinová báze
HCl	kyselina chlorovodíková
IGS	mezerníky mezi jednotlivými opakujícími se jednotkami rRNA (z angl. Intergenic Spacers)
ITS	mezerníky, které odd lují geny kódující ribosomální rRNA (z angl. Internal Transcribed Spacers)
KNS	koaguláza negativní stafylokok lambda, ozna ení vlnové délky
<i>M.</i>	<i>Malassezia</i>
M-MuLV	Molonyho reverzní transkriptáza z viru myší leukemie (z lat. <i>Moloney murine leukemia virus</i>)
mRNA	mediátorová RNA (z angl. messenger RNA)
PCR	polymerázová et zová reakce (z angl. Polymerase Chain Reaction)

RFLP	polymorfizmus délky restrikčních fragmentů (z angl. restriction fragment length polymorphism)
RNA	ribonukleová kyselina (z angl. ribonucleic acid)
rRNA	ribozomální RNA
SDS	dodecylsírán sodný (angl. sodium dodecyl sulfate)
sp.	z lat. species
ssDNA	jednoetřezcová DNA (z angl. single-stranded DNA)
subsp.	z lat. subspecies
syn.	synonymum
T	thymin, pyrimidinová báze
<i>Taq</i>	z lat. <i>Thermus aquaticus</i>
TBE	pufř Tris-kyselina boritá - EDTA
TE	pufř Tris-EDTA
Tween	ester polyoxyethylensorbitolu

Souhrn

Druh *Malassezia pachydermatis* je lipofilní, nikoliv však lipid-dependentní kvasinka lahvovitého tvaru z oddělení *Basidiomycota*. Je běžně nalézána jako součást komenzální kožní mikroflóry zdravých teplokrevných obratlovců. Za vhodných podmínek se ale může projevit jako oportunní patogen. *M. pachydermatis* je nejčastější fungální izolát asociovaný s rozvojem zánětlivého onemocnění zevního zvukovodu psů (lat. otitis externa).

Otitis externa je onemocnění s multifaktoriální etiologií, na jehož rozvoji se podílí, kromě patologicky zvýšeného množství bakterií a kvasinek ve zvukovodu, také řada dalších primárních, predispozičních a udržujících faktorů.

Práce je zaměřena na popis druhu *M. pachydermatis* a celého rodu *Malassezia* z hlediska taxonomie, morfologických a fyziologických vlastností. Dále se zabývá etiologií otitis externa, klinickými příznaky a druhy mikroorganismů podílejících se na vzniku tohoto onemocnění.

Molekulárně biologická detekce druhu *Malassezia pachydermatis* byla provedena metodou polymerázové řetězové reakce (PCR) ve vzorcích získaných výtřem zevního zvukovodu psů a koček. Z celkového počtu 114 vzorků bylo určeno jako druh *M. pachydermatis* 96 (84 %) vzorků a z celkového počtu 18 (16 %) negativních vzorků bylo 13 douráno doplnkovou kultivací.

Klíčová slova: *Malassezia pachydermatis*
Malassezia sp.
otitis externa
polymerázová řetězová reakce
PCR

Summary

Malassezia pachydermatis is lipophilic, but not lipodependent yeast with a bottle shape, belonging to the phylum *Basidiomycota*. It is commonly found as commensal element of cutaneous microflora healthy warm-blooded vertebrates. It can become opportunistic pathogen under appropriate conditions. *M. pachydermatis* is the most common fungal isolate associated with the development of inflammatory diseases of external ear canal of dogs.

Otitis externa is a disease with multifactorial etiology. In addition, pathologically increased amount of bacteria and yeast in the ear canal to the disease involved a number of other primary, predisposing and maintaining factors.

The aim of my thesis is focused to the description, taxonomy, morphological and physiological characteristics of genus *Malassezia* and especially of *M. pachydermatis* species. It also occupied by otitis externa etiology, clinical symptoms and types of microorganisms, involved in the emergence of this disease.

Molecular biological detection of *Malassezia pachydermatis* was performed using polymerase chain reaction (PCR) in samples obtained from swabs from external auditory duct of dogs and cats. From the total number of 114 samples were 96 (84%) identified by PCR method as *M. pachydermatis*. The rest of samples were negative and 13 of them were identified by cultivation as another types of microorganisms.

Keywords: *Malassezia pachydermatis*
Malassezia sp.
otitis externa
polymerase chain reaction
PCR

Obsah

Seznam zkratk.....	- 5 -
Souhrn.....	- 7 -
Summary.....	- 8 -
Obsah.....	- 9 -
1 Úvod.....	- 11 -
2 Teoretická část.....	- 12 -
2.1 Rod <i>Malassezia</i>	- 12 -
2.2 Taxonomické zařazení.....	- 12 -
2.3 Historický vývoj taxonomie a revize rodu <i>Malassezia</i>	- 12 -
2.4 Obecná charakteristika rodu <i>Malassezia</i>	- 14 -
2.4.1 Morfologické vlastnosti rodu.....	- 15 -
2.4.2 Fyziologické vlastnosti rodu.....	- 16 -
2.5 Zástupci rodu <i>Malassezia</i>	- 17 -
2.6 Otitis externa.....	- 26 -
2.6.1 Etiologie onemocnění.....	- 26 -
2.6.2 Klinické příznaky.....	- 27 -
2.6.3 Mikroorganismy podílející se nejvíce na rozvoji otitis externa.....	- 28 -
2.6.4 Bakterie.....	- 28 -
2.6.5 Houby.....	- 28 -
2.6.5.1 <i>Malassezia pachydermatis</i> a otitis externa.....	- 28 -
2.7 Molekulární biologická diagnostika.....	- 29 -
2.7.1 Polymerázová řetězová reakce.....	- 29 -
2.7.2 Princip metody.....	- 30 -
2.7.3 Teplotní profil.....	- 31 -
2.7.4 Význam reakčních komponent.....	- 32 -
2.7.5 Metody separace a detekce.....	- 33 -
2.7.6 Modifikace metody PCR a jejich využití.....	- 34 -
2.7.7 Publikované metody molekulární biologické detekce <i>Malassezia</i> sp.	- 35 -
3 Experimentální část.....	- 37 -
3.1 Přístroje a pomůcky.....	- 37 -
3.2 Použité chemikálie.....	- 37 -
3.3 Pracovní postupy.....	- 40 -
3.3.1 Odběr vzorků.....	- 40 -
3.3.2 Zpracování vzorků.....	- 40 -
3.3.3 Izolace DNA z referenčního kmene na kolonce Qiagen.....	- 41 -
3.3.4 Izolace DNA vzorků fenol – chloroformovou extrakcí.....	- 42 -
3.3.5 Elektroforéza amplikonů.....	- 43 -
3.3.6 Detekce amplikonů a dokumentace gelu.....	- 44 -
3.4 Metodika PCR stanovení.....	- 45 -
3.5 Optimalizace podmínek PCR.....	- 46 -
3.5.1 Testování optimální teploty annealingu.....	- 46 -
3.6 Parametry metody PCR.....	- 47 -
3.6.1 Určení specifity primerů.....	- 47 -
3.6.2 Stanovení detekčního limitu reakce.....	- 47 -
4 Výsledky.....	- 49 -
4.1 Testování optimální teploty annealingu.....	- 49 -
4.2 Stanovení detekčního limitu reakce.....	- 50 -
4.3 Stanovení specifity primerů.....	- 51 -

4.4	Detekce <i>Malassezia pachydermatis</i> v reálných vzorcích.....	- 53 -
5	Diskuze	- 58 -
6	Záv r.....	- 60 -
7	Seznam literatury	- 61 -

1 Úvod

Malassezia pachydermatis je lipofilní, non-lipid-dependentní kvasinka lahvovitého tvaru patřící do oddělení *Basidiomycota*. Jako součást běžné kožní mikroflóry se vyskytuje u teplokrevných, v tšinou masožravých obratlovců. Je však ale považována i za oportunní patogenní mikroorganismus. V případě oslabení imunitních mechanismů organismu, zejména z příčin atopie, alergie nebo jiného systémového onemocnění, způsobuje u zvířat vznik dermatitid, otitid a souvisejících symptomů jako jsou erytém a pruritus.

Zánět zevního zvukovodu (lat. otitis externa) je onemocnění multifaktoriální etiologie a kromě patologického množství kvasinek a bakterií ve zvukovodu se na něm podílí i řada dalších primárních, predispozičních a udržujících faktorů (Gbelec, 2003). V souvislosti s rozvojem tohoto zánětlivého onemocnění u psů je nejčastěji izolovanou bakterií *Staphylococcus intermedius*. Nejčastěji fungální izolát asociovaný s touto diagnózou je druh *Malassezia pachydermatis* (Oliveria a kol., 2008).

Cílem této práce bylo zavést a optimalizovat metodu PCR pro detekci druhu *Malassezia pachydermatis* izolovaného ze vzorků ušních výtoků psů a koček s otitis externa a potvrdit tak jeho kultivaci prokaz. Sběr vzorků byl proveden v rámci řešení několika diplomových prací zabývajících se mikrobiálními nálezy u psů a koček s zánětem zevního zvukovodu v letech 2004 až 2009.

2 Teoretická část

2.1 Rod *Malassezia*

Mikroorganizmy rodu *Malassezia* (*M.*) jsou lipofilní kvasinky, které patří mezi normální komenzální kožní mikroflóru především teplotokrevných obratlovců. Při působení vhodných predispozičních faktorů se mohou projevit i jako oportunní patogeny (Batra a kol., 2005).

Lipid-dependentní druhy jsou často přidružené s lidskými kožními poruchami, zatímco non-lipid-dependentní druh *Malassezia pachydermatis* je považována za oportunního patogena, který se vyskytuje na povrchu kůže a uvnitř zvukovodu psů a koček (Guillot a Bond, 1999; Chen a Hill, 2005). Tento rod tvoří celkem 13 druhů.

2.2 Taxonomické zařazení

Za více než 160 let od objevu prvního druhu *M. furfur* (1846) a popsání rodu *Malassezia* Baillonem v roce 1889, tedy o 43 let později od první zprávy, byla taxonomie rodu s rozvojem molekulárně biologických metod několikrát revidována (Kwon-Chung a Bennet, 1992). Současná taxonomická zařazení je následující (NCBI, Taxonomy Browser):

Doména: *Eukaryota*
 Říše: *Fungi* (houby)
 Oddělení: *Basidiomycota* (houby stopkovýtřusé)
 Třída: *Ustilaginomycetes* (snítí)
 Podtřída: *Exobasidiomycetidae*
 Řád: *Malasseziales*
 Rod: *Malassezia*

2.3 Historický vývoj taxonomie a revize rodu *Malassezia*

V roce 1846 popsal Eichstedt onemocnění pityriasis versicolor a izoloval ze seškrabu z lézí dosud neznámý mikroorganismus kvasinkového charakteru. Robin (1853) izoloval fungální elementy z lézí pityriázy a pojmenoval izolovaný mikroorganismus *Microsporium*

furfur s názorem, že jde o identický organizmus jako je dermatofytum *Microsporum audouinii*, a proto bylo toto onemocnění pojmenováno na tinea versicolor (Inamdar a kol., 2003).

Rivolta o několik málo let později v roce 1873 pozoroval kvasinky na pokožce, ale kultivace byla obtížná, protože nebyla dosud známa lipofilní povaha tohoto rodu. Malassez (1874) izoloval bučky kvasinkovitého tvaru ze šupin lidských lupů.

Následně byly popsány i kulovité a oválné formy této kvasinky. V roce 1889 Baillon zahrnul tuto skupinu kvasinek pod rod *Malassezia*. Sabouraud (1904) považoval tyto organizmy jako příčinu vzniku tvorby lupů a nově je pojmenoval jako *Pityrosporum malassez* (Inamdar a kol., 2003).

V následujících letech však byly vedeny spory o rodový (generický) název těchto kvasinek – *Pityrosporum* nebo *Malassezia*? Sternberg a Keddie (1969) zjistili totožnost antigenních struktur *Pityrosporum ovale* a *Malassezia furfur* pomocí imunofluorescenčních technik. Pojmenování *Malassezia* bylo proto upraveno před názvem *Pityrosporum* a bylo přijato jako generický název rodu těchto kvasinek (1984). Byly tak identifikovány druhy v rodu *Malassezia*: *M. furfur* a *M. pachydermatis* (Inamdar a kol., 2003).

V roce 1990 Simmons a Guého definovali další druh *M. sympodialis* na základě molekulárně genetické analýzy obsahu G+C bazí a přítomnosti monopolárního puení (Simmons a Guého, 1990).

Cunningham a kol. (1990) rozlišoval tři sérovary *M. furfur* A, B a C, které byly v kultuře morfologicky rozdílné a odpovídaly sérologickým rozdílům povrchových buněčných antigenů. Saadatzaeh a kol. (1998) ale zjistil, že se jedná o samostatné druhy. Sérovar A odpovídá druhu *M. sympodialis*, sérovar B *M. globosa* a sérovar C druhu *M. restricta*.

Poátkem roku 1990 byla taxonomie rodu *Malassezia* stále ještě chaotická. Různé vdecké skupiny zaváděly vlastní klasifikační systémy, což znemožňovalo porovnávat jejich práce mezi sebou. Tento chaos byl nakonec rozhodnut s klíčovou publikací v roce 1995 od Guillot a Guého, kteří shromáždili 104 izolátů rodu *Malassezia* zahrnující všechny různé taxonomické klasifikace a provedli sekvenaci velké podjednotky rRNA a jaderné DNA. Na základě výsledků své práce definovali sedm druhů rodu *Malassezia*: *M. furfur*, *M. sympodialis*, *M. obtusa*, *M. globosa*, *M. restricta*, *M. slooffiae* a *M. pachydermatis* (Guého a kol., 1996).

Sugita a kol. (2002) izoloval a popsal druh *M. dermatitis* na základě sekvenční analýzy ribozomální DNA izolátů kvasinek kolonizujících kůže pacientů s atopickou dermatitidou.

Sugita a kol. (2003) popsal druh *M. japonica*. Pro identifikaci tohoto druhu provedl analýzu genu kódujícího ribozomální RNA pomocí metody nested - PCR. Tento druh se liší v pozitivní asimilaci Tweenu 40 a 80 a neschopností růstu při 40 °C.

Hirai a kol. (2004) definoval nový druh kvasinky rodu *Malassezia* ze zvířat v Japonsku a Brazílii, *M. nana*. S využitím molekulárně-biologických metod byla určení odlišnosti od příbuzných druhů *M. dermatis* a *M. sympodialis*, kterým se podobá svými morfologickými a fyziologickými vlastnostmi.

Sugita a kol. (2004) izoloval kvasinku *M. yamatoensis* z pacienta japonské národnosti se seboroickou dermatitidou. Detekce byla provedena pomocí nested - PCR s druhově specifickými primery.

Poslední, nejnovější zástupci rodu *Malassezia* byli popsáni v roce 2007 autory Cabañes a kol. a jsou to druhy *M. caprae*, izolovaný z koz, a *M. equina*, izolovaný z koní. Tyto dva druhy jsou fylogeneticky příbuzné druhu *M. sympodialis*. Mají podobnou morfologii a fyziologické vlastnosti, liší se však navzájem v pozitivní hydrolýze eskulinu (*M. caprae*). Identifikace druhů byla provedena na základě morfologických a fyziologických vlastností, analýzy rRNA a podjednotky I RNA polymerázy, restrikční analýzy a sekvenací genu pro chitin syntetázu (Cabañes a kol., 2007).

V současné době je tedy známo 13 druhů kvasinek zařazených do rodu *Malassezia*.

2.4 Obecná charakteristika rodu *Malassezia*

Kvasinky rodu *Malassezia* jsou známy jako zástupci běžné, komenzální kožní mikroflóry po více než 160 let. Bývají izolovány z kůže lidí i z kůže ostatních teplokrevných živočichů (Yarrow a Ahearn, 1984). Protože jsou, s výjimkou jednoho druhu, metabolicky závislé na lipidech, jsou často izolovány z oblastí bohatých na mazové žlázy, které jsou zdrojem lipidů (Nazarro-Porro a Passi, 1976). Pro zvířata, která jsou vystavena určitým predispozičním faktorům, se tyto kvasinky stávají potenciálně patogenními (Guillot a Guého, 1998).

2.4.1 Morfologické vlastnosti rodu

Při kultivaci na tuhých médiích tvoří tyto kvasinky malé, krémově až žluté kolonie, které jsou hladké nebo lehce zvrásněné. Povrch je lesklý nebo matný. Okraj kolonie může být rovný nebo laločnatý. Konzistence bývá máslová (Guého a kol., 1996).

Jako používané médium pro kultivaci je Sabouraudův dextrózový agar, který je vhodný pro záchyt mnoha druhů hub odpovědných za kožní nemoci u masožravců (*Microsporum canis* a další dermatofyty schopná metabolismu keratinu, *Malassezia pachydermatis* a *Candida* sp.).

Pro kultivaci kvasinek *Malassezia* sp. jsou navržena selektivní média suplementovaná lipidy – modifikovaný Dixonův agar (mDixon) (Guého a kol., 1996), Leeming-Notmanův agar (LNA) (Leeming a kol., 1989) a Ushijimasův agar (Ushijima, 1981). Tato média jsou vhodná pro izolaci všech druhů rodu *Malassezia*, bez ohledu na přítomnost lipidů v médiu.

Další způsob kultivace i identifikace na médiu „CHROMagar *Malassezia*“ popisuje ve své práci Kaneko a kol. (Kaneko a kol., 2007).

Kvasinky rodu *Malassezia* mohou vystupovat ve dvou formách (dimorfismus). Ve formě mycelia a ve formě kvasinek. Kvasinková forma nejprve kolonizuje zdravou kůži a převládá také při růstu v kultuře. U některých druhů se v kultuře vyskytují též i hyfy (Guého a kol., 1996). Myceliární forma kvasinek je charakteristická krátkými septovanými hýfami uspořádanými šikmo, nebo v jedné adhezi s oběma stranami v tvnění (Kwon-Chung a Bennet, 1992). Indukce tvorby hýf lze dosáhnout pomocí speciálních médií, a koliv ne všechny izoláty tohoto rodu jsou schopny této transformace (Saadatzađeh a kol., 1998).

Ultrastruktura

Buněná stěna kvasinek rodu *Malassezia* je velmi silná ve srovnání s ostatními kvasinkami (asi 0,12 μm) a představuje 26 až 37 % z buněčného objemu (Larocco a kol., 1998). Skládá se z mnoha vrstev, jejichž struktura se mění v závislosti na zdroji lipidů v médiu. Tato struktura je charakteristická pro houby stopkovýtrusé - *Basidiomycota* (Guillot a Bond, 1999). Hlavními složkami buněčné stěny jsou sacharidy (70 %), proteiny (10 %), lipidy (15 až 20 %) a malé množství dusíku a síry (Thompson a Colvin, 1970).

Cytoplazmatická membrána téměř kopíruje strukturu vnitřního povrchu buněčné stěny (Barfatani a kol., 1964; Swift a Dunbar, 1965; Wikler a kol., 1990). Jádro je ohraničeno

dvojitou membránou (Barfatani a kol., 1964). Počet a tvar mitochondrií se může v každé buňce lišit, mohou být kulatého nebo oválného tvaru (Keddie a Barajas, 1972). Vakuoly přítomné v buňce obsahují lipidy a jejich velikost je různá dle stáří buňky (Barfatani a kol., 1964).

Reprodukce

Kvasinky rodu *Malassezia* se množí opakovaným nepohlavním monopolárním pučením. Dceinná pučící buňka vyrůstá na širokém základu mateřské buňky. Charakteristické je utváření límečku kolem pučící buňky (David a kol., 2003). Po odloučení dceinné buňky vzniká v buněčné stěně mateřské buňky více nebo méně výrazná jizva.

Pohlavní reprodukce ani teleomorfní (pohlavní) stádium nebylo popsáno (Guého a kol., 1996).

2.4.2 Fyziologické vlastnosti rodu

Fyziologické vlastnosti rodu *Malassezia* byly zpočátku málo prozkoumané, protože dalšímu rozvoji v této oblasti bránila problematická kultivace a udržování kultur.

Již v roce 1939 Benham poznamenal, že zástupci rodu *Malassezia* nejsou schopny zkvašovat sacharidy (Benham, 1939). Kvasinky mohou využívat lipid jako jediného zdroje uhlíku (Nazarro-Porro a kol., 1976), k růstu nevyžadují vitamíny, stopové prvky, ani elektrolyty (Mayser a kol., 1998).

Upřednostují využití methioninu jako jediného zdroje síry, ale dokážou použít také cystin nebo cystein (Brotherton, 1967). Dovedou využít mnoho aminokyselin a jejich amoniakových solí jako zdroje dusíku (Mayser a kol., 1998).

Kvasinky, kultivované *in vitro* za aerobních podmínek, jsou schopny růstu při 10% obsahu kyslíku i za anaerobních podmínek (Faergemann a Bernander, 1981).

K laboratorní diagnostice se nejčastěji využívá biochemických testů na produkci enzymu katalázy (schopnost rozkladu 3% peroxidu vodíku), enzymu ureázy (schopnost hydrolyzovat močovinu na amoniak a oxid uhličitý), enzymu glukosidázy (test hydrolyzy eskulinu). Významným testem je také test schopnosti utilizace Tweenu 20, 40, 60 a 80 o různé koncentraci v médiu jako jediného zdroje lipidů a asimilace Cremophoru EL (polyethylenoxidový ricínový olej) (testy aktivity enzymu esterázy). Dále se provádí barvení mikroskopického preparátu diazoniovou modří B (za azení do oddělení hub stopkovýtusých

– *Basidiomycota*), zjištění limitní teploty růstu, zjištění tvorby precipitátu na modifikovaném Dixonov agaru a test lipid-dependentní povahy na Sabouraudov dextrózovém agaru, (Kaneko a kol., 2007).

2.5 Zástupci rodu *Malassezia*

❖ *Malassezia furfur* (Robin) Baillon 1889

Synonyma: *Microsporium furfur* Robin 1853, *Pityrosporium ovale* Castellani a Chalmers 1913, *Pityrosporium orbiculare* Gordon 1951

Morfologické vlastnosti: po 7 dnech inkubace při 32 °C na modifikovaném Dixonov agaru vyrůstají matné, hladké, vypouklé nebo lehce zvrásněné a konvexně zvýšené kolonie o velikosti 2 mm v průměru. Konzistence je jemná a drobná. Mikroskopicky jsou pozorovány oválné, kulovité a cylindrické buňky variabilní velikosti, která se pohybuje v mezích od 2,5 do 8 μm. Dceřiné buňky vyrůstají ze širokého základu. Hyfy mohou vyrůstat z jakéhokoliv bodu na povrchu buňky.

Fyziologické vlastnosti: prokaz katalázy, ureázy a barvení diazoniovou modifikací B jsou pozitivní. Dovede využít Tween 20, 40, 60 i 80 jako jediného zdroje lipidů v médiu. Dobře roste při 37 °C s maximem při 40 až 41 °C. Buňky přežívají lyofilizaci (Guého a kol., 1996).

Výskyt: *M. furfur* bývá izolována ze zdravé kůže lidí i kožních lézí pacientů s pityriasis versicolor, může způsobovat i systémové infekce. U zvířat je nalézána jako součást kožní mikroflóry (Guillot a kol., 2008).

❖ *Malassezia pachydermatis* (Weidman) Dodge 1925

Synonyma: *Pityrosporium pachydermatis* Weidman 1925, *Pityrosporium canis* Gustafson 1955

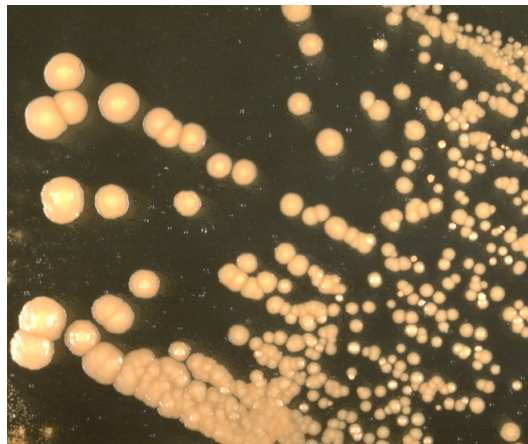
M. pachydermatis byla poprvé izolována v roce 1925 Weidmanem ze vzorku kožních šupin nosorožce indického (*Rhinoceros unicornis*) trpícího exfoliativní dermatitidou a pojmenována *Pityrosporium pachydermatis* (Weidman, 1925). Během následujících let byl Weidmanem nově popsán druh srovnávaný s dosud známými kmeny rostoucími na médiích bez přísady lipidů.

Gustafson (1955) popsal v izolátech z otitis externa u psů buňky lahovitého tvaru a typického pučení, které dle soudobých poznatků zařadil do kvasinek rodu *Pityrosporium*.

Tento kmen se ale lišil, od dosud popsaných *P. ovale* a *P. orbiculare* Gordon 1951 (= *M. furfur*), zejména na běžných médiích, a proto Gustafson vytvořil nový druh *Pityrosporum canis*.

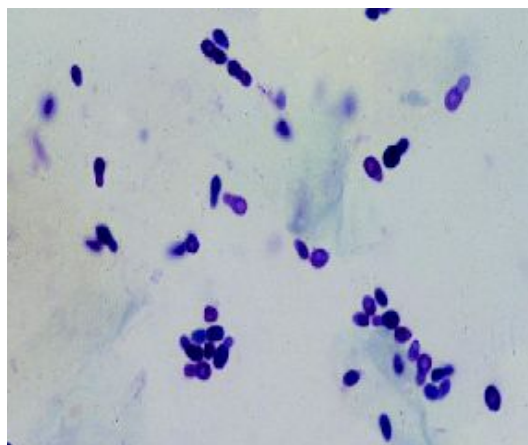
Vzniklo tak více synonym pro tento druh rodu *Malassezia*, popsaného Baillonem (1889) (Yarrow a Ahearn, 1984). Dodge (1935) navrhl název druhu *P. canis* jako synonymum druhu *Malassezia pachydermatis*.

Morfologické vlastnosti: po 7 dnech inkubace při 32 °C na glukózo-peptonovém agaru jsou pozorovány matné, konvexní kolonie, obvykle vypouklé a zvrásněné, krémové barvy. Povrch je suchý a hladký. Velikost kolonií je 0,5 až 1 mm v průměru.



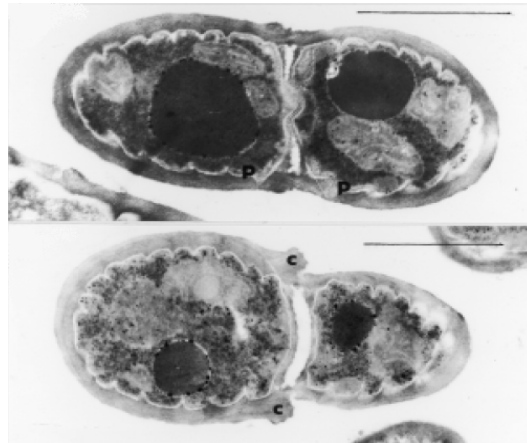
Obrázek 1 Kolonie *M. pachydermatis* na Sabouraudov agaru
(<http://www.pfdb.net/html/species/s38.htm#100>)

Mikroskopicky jsou pozorovány malé, oválné buňky 4 až 5 μm velké. Dceřiné buňky jsou formovány na širokém základu, který je nejširší z celého rodu.



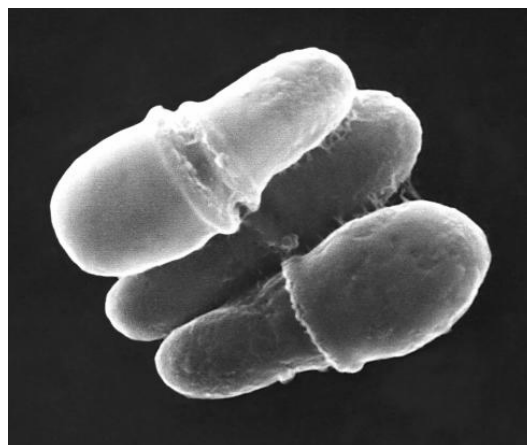
Obrázek 2 *M. pachydermatis*, světelný mikroskop, Gramovo barvení, 1000x zvětšeno
(<http://www.answers.com/topic/malassezia-1>)

Ultrastrukturní studie provedená transmisí elektronovou mikroskopií popisuje silnou vrstevnatou buněnou stěnu, která má na svém vnitřním povrchu zubovitou strukturu. V cytoplazmě jsou hojně přítomna granula glykogenu a vakuoly o různé velikosti. Jádro je pozorováno jen z řídka. Mateřská buňka je od dceřinné oddělena přepážkou (Kiss a kol., 1996).



Obrázek 3 *M. pachydermatis*, transmisí elektronový mikroskop (David a kol., 2003)

Pomocí skenovacího elektronového mikroskopu jsou buňky charakterizovány sametově hladkým povrchem, ovoidním tvarem a typickým utvářením límečků kolem dceřinné buňky.



Obrázek 4 *M. pachydermatis*, skenovací elektronový mikroskop

(http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Malassezia_lipophilis_3_lores.jpg)

Fyziologické vlastnosti: prokaz katalázy je obvykle pozitivní, ureáza a barvení diazoniovou modří B je také pozitivní. Produkce indolu a acetoinu nebyla prokázána. Aktivita lecitinázy byla prokázána na žlutkovém agaru. Aktivita peroxidázy je výrazně pozitivní. Proteolytická aktivita, která byla testována ztekucením koagulovaného Löfflerova séra,

je pozitivní. Na krevním agaru vyrůstají variabilně po 72 hodinách a neprobírají jeho hemolýzu (Kiss a kol., 1996).

Přídavek Tweenu 20 do glukózo-peptonového agaru inhibuje růst. Jako jediná z celého rodu vyrůstá na Sabouraudově agaru při 32 °C. Dobře roste při 37 °C s maximem při 40 až 41 °C. Buňky přetrvávají lyofilizací (Guého a kol., 1996).

Výskyt: *M. pachydermatis* je často izolována z domestikovaných i divokých masožravců jako jsou psi, kočky, medvědi, fretky a lišky. Její výskyt byl také zaznamenán u nosorožců, prasat, primátů, tuleňů, koní i ptáků (Gustafson, 1960; Midgley a Clayton 1969). Oproti tomu nebyla nikdy izolována z hlodavců a zajíců (Guillot a kol., 1994).

U kožních lézí se vyskytuje v souvislosti s otitidami a seboroickými dermatitidami u psů. U lidí může vyvolat i systémové infekce (Guillot a kol., 2008).

Na lidské kůži se vyskytuje zcela výjimečně (Guillot a Bond, 1999).

❖ *Malassezia sympodialis* Simmons a Guého 1990

Synonyma: *Pityrosporum ovale* form 3 Midgley 1989, *Malassezia furfur* sérovar A Cunningham a kol. 1990, *Malassezia ovalis* form 3 Midgley

Morfologické vlastnosti: po 7 dnech inkubace při 32 °C na modifikovaném Dixonově agaru vyrůstají lesklé, hladké, ploché nebo centrálně zvýšené kolonie. Průměr kolonií je 5 mm a konzistence je hladká. Mikroskopicky jsou pozorovány ovoidní až kulovité buňky 2,5 až 6 µm velké. Půlčí dce inná buňka vyrůstá na užším základu mateřské buňky, který je stejně široký jako samotná dce inná buňka. Monopolární půlení může probíhat i opakovaně z jedné buňky.

Fyziologické vlastnosti: prokazatel katalázy, ureázy a barvení diazoniovou modří B je pozitivní. Jako zdroj lipidů nedokáže využít Tween 20. Růst byl pozorován až v přítomnosti Tweenu 40, 60 a 80. Dobře roste při 37 °C s maximem při 40 až 41 °C. Lyofilizací buňky přetrvávají (Guého a kol., 1996).

Výskyt: *M. sympodialis* kolonizuje zdravou kůži a kožní léze v souvislosti s atopickou dermatitidou u lidí i u zvířat, kde způsobuje otitis externa (popsáno u koček) (Guillot a kol., 2008).

❖ *Malassezia globosa* Midgley, Guého & Guillot 1996

Synonyma: *Pityrosporum orbiculare* Gordon 1951, *Malassezia furfur* sérovar B Cunningham a kol. 1990, *Malassezia furfur* sensu Midgley Midgley 1993

Morfologické vlastnosti: po 7 dnech inkubace při 32 °C na modifikovaném Dixonov agaru jsou pozorovány zvýšené, zvrásněné a hrubé kolonie o velikosti 4 mm v průměru. Konzistence je hrubá a křehká. Mikroskopicky jsou pozorovány kulovité buňky 2,5 až 8 μm velké. Dceinná buňka připomíná na úzké bázi. Jizva po pučení není výrazná. Krátké hyfy, někdy vřetené, jsou pozorovány v místech pučení.

Fyziologické vlastnosti: prokaz katalázy, ureázy a barvení diazoniovou modifikací B je pozitivní. Nedokáže využít Tween jako zdroj lipidů. Při 37 °C neroste, nebo jen velmi slabě. Buňky nepodléhají lyofilizaci. Teleomorfy nebyly pozorovány (Guého a kol., 1996).

Výskyt: *M. globosa* se vyskytuje na zdravé kůži a kožních lézích v souvislosti s pityriasis versicolor a seboroickou dermatitidou u lidí. U zvířat způsobuje otitidy (kozy) a kolonizuje i zdravou kůži (Guillot a kol., 2008).

❖ *Malassezia obtusa* Midgley, Guillot & Guého 1996

Synonyma: *Pityrosporum ovale* form 2 Midgley 1989, *Malassezia ovalis* form 2 Midgley 1993

Morfologické vlastnosti: po 7 dnech inkubace při 32 °C na modifikovaném Dixonov agaru vyrůstají hladké a ploché kolonie 4 mm v průměru. Konzistence je lepkavá. Mikroskopicky jsou pozorovány velké až 6 μm dlouhé cylindrické buňky, které při pučení dosahují délky až 10 μm. Dceinná buňka je formována na široké bázi. Přítomné hyfy mohou vyrůstat z jakéhokoli bodu mateřské buňky a mohou být vřetené.

Fyziologické vlastnosti: prokaz katalázy, ureázy, barvení diazoniovou modifikací B je pozitivní. Nedokáže využít Tween 20, 40, 60 ani 80 jako jediného zdroje lipidů. Růst je pozorován při 37 °C s maximem při 38 °C. Buňky podléhají krátkou lyofilizaci (Guého a kol., 1996).

Výskyt: *M. obtusa* bývá izolována z kožních lézí i ze zdravé kůže u lidí (Guillot a kol., 2008).

❖ *Malassezia restricta* Guého, Guillot & Midgley 1996

Synonyma: *Malassezia furfur* sérovar C Cunningham a kol. 1990

Morfologické vlastnosti: po 7 dnech inkubace při 32 °C na modifikovaném Dixonov agaru jsou pozorovány matné, hladké, s měkkou okrajem hrubé kolonie 3 mm v průměru. Konzistence je tvrdá a křehká. Mikroskopicky jsou pozorovány kulovité nebo oválné buňky o délce 2,5 až 4 μm. Báze pučení je relativně úzká.

Fyziologické vlastnosti: pro kvasení katalázy je negativní, barvení diazoniovou modí a pro kvasení ureázy jsou pozitivní. Nedokáže využít Tween 20, 40, 60 ani 80 jako jediného zdroje lipidů. Dobře roste při 37 °C s maximem 38 až 39 °C. Buňky přežívají krátkou lyofilizaci (Guého a kol., 1996).

Výskyt: *M. restricta* se vyskytuje na zdravé kůži a v kožních lézích v souvislosti se seboroickou dermatitidou u lidí (Guillot a kol., 2008).

Název *restricta* vystihuje omezené fyziologické vlastnosti této kvasinky *in vitro* (Guého a kol., 1996).

❖ *Malassezia slooffiae* Guillot, Midgley & Guého 1996

Synonyma: *Pityrosporum ovale* form 1 Midgley 1993, *Malassezia furfur* sérovar Y Leeming datum nepublikováno

Morfologické vlastnosti: po 7 dnech inkubace při 32 °C na modifikovaném Dixonov agaru jsou pozorovány hrubé kolonie velké 3 mm v průměru s jemnými rýhami. Mikroskopicky jsou pozorovány krátké cylindrické buňky o délce 2 až 4 μm s širokou bází pučení.

Fyziologické vlastnosti: pro kvasení katalázy, ureázy a barvení diazoniovou modí B je pozitivní. Na glukózo-peptonovém agaru je růst pozorován v přítomnosti Tweenu 40 a 60 jako jediného zdroje lipidů. Neroste v prostředí s Tweenem 80 a variabilně s Tweenem 20. Roste dobře při 37 °C s maximem 40 °C. Buňky přežívají lyofilizaci (Guého a kol., 1996).

Výskyt: *M. slooffiae* bývá izolována ze zdravé kůže a kožních lézí, zdravé kůže prasat a z kožních lézí při otitidách. U lidí se vyskytuje na zdravé i patologicky změněné kůži (Guillot a kol., 2008).

Kvasinka byla pojmenována na počest Wilheminy C. Slooffiové, která se zabývala studiem lipofilních kvasinek (Guého a kol., 1996).

❖ *Malassezia dermatis* Sugita a kol. 2002

Synonyma: nejsou

Morfologické vlastnosti: po 7 dnech kultivace na Leeming Notman agaru (LNA) (10 g polypeptonu; 5 g glukózy; 0,1 g kvasniňného extraktu; 8 g volské žluči; 1 mg glycerinu; 0,5 g stearátu glycerinu; 0,5 mg Tweenu 60; 10 ml kravského mléka a 12 g agaru, voda do 1 l) při 32 °C jsou pozorovány nažloutlé kolonie, matné a konvexní, máselnaté konzistence. Okraj je rovný nebo laloňatý. Mikroskopicky jsou pozorovány kulovité, oválné nebo eliptické

bučky (2 až 8 µm), monopolární puení a někdy je pozorována i tvorba hyf tvořených v oblasti p vodního puení.

Fyziologické vlastnosti: na glukózo-peptonovém agaru, s p ídavkem 0,1; 0,5; 1,0; 5,0, nebo 10 % Tweenu 20, 40, 60 a 80 jako jediného zdroje lipidů, je pozorován pozitivní r st. Kataláza a barvení diazoniovou mod í B je pozitivní. Teleomorfy nejsou pozorovány.

Výskyt: *M. dermatis* byla poprvé izolována z kožního poranění pacienta s atopickou dermatitidou v Tokiu (Japonsko). Vyskytuje se na zdravé k ži i v kožních lézích u lov ka.

Druhé jméno pochází z latinského názvu pro k ži, kterou p ednostn kolonizuje (Sugita a kol., 2002).

❖ *Malassezia japonica* Sugita a kol. 2003

Synonyma: nejsou

Morfologické vlastnosti: po kultivaci na LN agaru p í 32 °C jsou pozorovány po 6 dnech bledé až nažloutlé, matné a vrás ité kolonie, máselnaté konzistence. Okraj kolonií je rovný nebo lalo natý. Mikroskopicky jsou pozorovány kulovité, oválné až vej ité bučky o velikosti 2 až 5 µm, které monopolárn pu í.

Fyziologické vlastnosti: r st na glukózo-peptonovém agaru s 0,5 % Tweenu 40 a 60 jako jediný zdroj lipidů je pozitivní. Pr kaz katalázy a barvení diazoniovou mod í B je pozitivní. Teleomorfy nebyly pozorovány (Sugita a kol., 2003).

Výskyt: *M. japonica* byla poprvé izolována z levého p edloktí zdravé 22leté japonské ženy v Tokyu (Sugita a kol., 2003). Byla také nalezena u pacientů s atopickou dermatitidou (Guillot a kol., 2008).

❖ *Malassezia nana* Hirai a kol. 2004

Synonyma: nejsou

Morfologické vlastnosti: po 7 dnech kultivace na modifikovaném Dixonov agaru vyr stají krémov žluté, matné a konvexní kolonie. Mají 2 mm v pr m ru. Konzistence je m kká a viskózní. Mikroskopicky jsou pozorovány kulovité až ovoidní bučky s monopolárním pu ením na užším konci.

Fyziologické vlastnosti: kataláza a barvení diazoniovou mod í B je pozitivní. Neroste na Sabouraudov dextrózovém agaru bez p ídavku lipidů. R st je pozorován na glukózo-peptonovém agaru s p ídavkem Tweenu 40 nebo 80 (0,5 %). Neroste na glukózo-peptonovém

agaru s Cremophorem EL. Hydrolýza eskulinu je negativní. Píťomna je tvorba precipitátu na modifikovaném Dixonov agaru. Dob e roste p i 37 °C. Teleomorfy nebyly pozorovány.

Výskyt: *M. nana* byla poprvé izolována z ko ky s otitis externa v Hyogu (Japonsko) (Hirai a kol., 2002). Další 4 izoláty byly získány z hov zího dobytka (krávy). Dva byly izolovány z ušního mazu zdravých krav a dva z ušního výtoku krav trpících otitis externa na farm Minas Gerais v Brazílii (Hirai a kol., 2004).

❖ *Malassezia yamatoensis* Sugita a kol. 2004

Synonyma: nejsou

Morfologické vlastnosti: po kultivaci p i 32 °C, trvající 6 dn , vyr stají bílé až nažloutlé kolonie, mírn lesklé, vrás ité až ob as z asené s lalo natým okrajem. Konzistence je máslová. Mikroskopicky jsou pozorovány oválné a ovoidní pu ící bu ky velké 2 až 5 µm.

Fyziologické vlastnosti: je pozorován pozitivní r st na glukózo-peptonovém agaru s p ídavkem Tweenu 20 (10 %), 40 (0,5 %), 60 (0,5 %) a 80 (0,1 %) jako jediného zdroje lipid . Dob e roste p i 37 °C, neroste p i 40 °C. Barvení diazoniovou mod í B a pr kaz katalázy je pozitivní. Teleomorfy nejsou pozorovány.

Výskyt: *M. yamatoensis* byla poprvé izolována z k že japonského pacienta s atopickou dermatitidou.

Druhový název kvasinky byl vytvo en od starov kého názvu japonské provincie Yamato (Sugita a kol., 2004).

❖ *Malassezia equina* Cabanes a kol. 2007

Synonyma: nejsou

Morfologické vlastnosti: po 7 dnech inkubace p i 32 °C na modifikovaném Dixonov agaru pomalu vyr stají malé kolonie o velikosti 1,3 mm. Po prodloužené inkubaci na 21 dní za stejných podmínek dor stají kolonie do velikosti 0,5 až 2 mm. Mikroskopicky jsou pozorovány vej íté bu ky, které monopolárn pu í na široké bázi.

Fyziologické vlastnosti: r st na glukózo-peptonovém agaru je velmi špatný a variabilní. Je pozorován slabý variabilní r st v píťomnosti Tweenu 40, 60 a 80 se sou asnou tvorbou inhibi ní zóny kolem zdroje Tweenu. V píťomnosti Tweenu 20 je inhibi ní zóna nejv tší a ve v tšin píťad je pozorována úplná inhibice r stu. To poukazuje na toxické úinky Tweenu ve vyšších koncentracích. Pr kaz katalázy je pozitivní a hydrolýza eskulinu negativní. Asimilace Cremophoru EL je negativní. Neroste p i 40 °C.

Výskyt: *M. equina* byla izolována p edevším z koní zdravých, ale i s kožními lézemi (Cabañes a kol., 2007).

❖ ***Malassezia caprae*** Cabanes a kol. 2007

Synonyma: nejsou

Morfologické vlastnosti: po 7 dnech inkubace p i 32 °C na modifikovaném Dixonov agaru pomalu vyr stají malé kolonie o velikosti 1 mm. Po prodloužené inkubaci na 21 dní za stejných podmínek dor stají kolonie do velikosti 0,5 až 2 mm. Mikroskopicky jsou pozorovány eliptické bu ky, které monopolárn pu í na široké bázi.

Fyziologické vlastnosti: r st na glukózo-peptonovém agaru je velmi špatný a variabilní. Je pozorován slabý variabilní r st v p ítomnosti Tweenu 40, 60 a 80 se sou asnou tvorbou inhibi ní zóny kolem zdroje Tweenu. V p ítomnosti Tweenu 20 je inhibi ní zóna nejv tší a ve v tšin p ípad je pozorována úplná inhibice r stu. To poukazuje na toxické úinky Tweenu ve vyšších koncentracích. Asimilace Cremophoru EL je negativní. Neroste p i 40 °C. Hydrolýza eskulinu je pozitivní a kataláza je pozitivní.

Výskyt: *M. caprae* byla poprvé izolována ze zdravé k Źe koz (Cabañes a kol., 2007).

Tabulka 1 Fyziologické vlastnosti druh Źe rodu *Malassezia* (p evzato z Sugita a kol., 2004)

Druh	R st na SDA ¹ p i 32 °C	R st na mDix ² p i			Kataláza	Utilizace Tweenu			
		32 °C	37 °C	40 °C		20 (10 %)	40 (0,5 %)	60 (0,5 %)	80 (0,1 %)
<i>M. furfur</i>	-	+	+	-	+	+	+	+	+
<i>M. pachydermatis</i>	+	+	+	+	+/-, +	-	+	+	+
<i>M. sympodialis</i>	-	+	+	+	+	-	+	+	+
<i>M. globosa</i>	-	+	+/-, -	-	+	-	-	-	-
<i>M. obtusa</i>	-	+	+/-, +	-	+	-	-	-	-
<i>M. restricta</i>	-	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>M. slooffiae</i>	-	+	+	+	+	+, +/-	+	+	-
<i>M. dermatis</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>M. japonica</i>	-	+	+	-	+	-	+/-	+	-
<i>M. nana</i>	-	+	+	+/-	+	+/-	+	+	+/-
<i>M. yamatoensis</i>	-	+	+	-	-	+	+	+	+
<i>M. equina</i>	-	+	-, +/-	-	+	-	+/-	+/-	+/-
<i>M. caprae</i>	-	+	+/-	-	+	-	-, +/-	+/-	-

1 Sabouraud v dextrózový agar

2 modifikovaný Dixon v agar

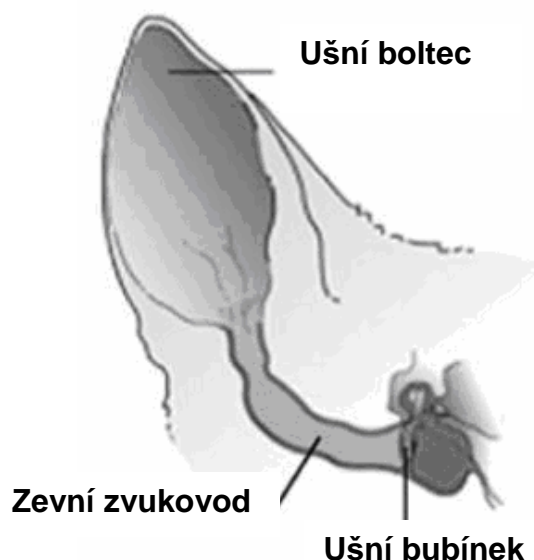
+ pozitivní

- negativní

+/- variabilní

2.6 Otitis externa

Pojmem otitis externa je označován zánět sliznice zevního zvukovodu, který postihuje oblast od ušního boltce k bubínku (Charlotti, 1991; White, 1999). Je to běžný problém malých zvířat a nejedná se o život ohrožující onemocnění (Logas, 1994; Blanco a kol., 1996; Kuera, 2000).



Obrázek 5 Anatomické části ucha (<http://hubpages.com/hub/Dog-Ear-Infection>)

Prevalence otitis externa u psů je udávána od 5 do 20 % (Charlotti, 1991; Logas, 1994; Kiss a kol., 1997). V menší míře 2 až 10 % postihuje kočky (Charlotti, 1991). Výskyt zánětu zevního zvukovodu je častější v letních a podzimních měsících (Rybníček, 1997).

Mezi plemena psů, která bývají nejčastěji postižena patří kokršpaněl, retrívr, pudl, německý ovčák, foxteriér a kolie. Tato náchylnost je spojována s jejich anatomickou stavbou ucha (Charlotti, 1991; Kuera, 2000; Kumar a kol., 2002).

2.6.1 Etiologie onemocnění

Otitis externa je onemocnění s multifaktoriální etiologií (Doyle a kol., 2004; Fernández a kol., 2006). Příčiny vzniku onemocnění Rybníček (1997) a Crespo a kol. (2000) na predispoziční, primární a udržující. Akutní a zejména chronické procesy vznikají vzájemným působením těchto faktorů (Rybníček, 1997; Gbelec, 2003).

Působením primárních faktorů dochází k rozvoji otitis externa i bez působení jiných vlivů. Predispoziční faktory vytvářejí vhodné podmínky pro vznik zánětu, ale samy o sobě

onemocnění nezpůsobují. Významným predispozičním faktorem je velikost a tvar ušního boltce, zejména dlouhé a povislé uši mají vliv na udržování vlhkosti a tepla ve zvukovodu. Dochází tak k vytvoření podmínek pro pomnožení bakterií a kvasinek (Yoshida a kol., 2002). Na rozvoji a přetrvávání zánětu zvukovodu se podílejí udržující faktory (Doyle a kol., 2004).

Tabulka 2 Faktory podmiňující rozvoj otitis externa (Doyle a kol., 2004)

Primární faktory	Predispoziční faktory	Udržující faktory
Alergie	Anatomické zvláštnosti	Bakterie
Paraziti	Vlhkost a teplota	Kvasinky
Cizí tělesa	Chyby v ošetřování	Kontaktní alergie
Poruchy keratinizace	Obstruktivní onemocnění ucha	Otitis media
Autoimunitní onemocnění	Systémové onemocnění	Progresivní patologické změny

2.6.2 Klinické příznaky

Zánět zevního zvukovodu může probíhat v akutní, nebo chronické formě (Charlotti, 1991; Logas, 1994). Kiss a kol. (1997) a Charlotti (1991) dělí otitis externa na katarální a hnisavý zánět. Toto dělení je z hlediska klinických příznaků přesnější.

Akutní katarální zánět se projevuje zarudnutím a otokem kůže zevního zvukovodu, zvýšenou produkcí hustého ušního mazu (tzv. cerumenu), svěděním a bolestivostí (Gbelec, 2003; Kiss a kol., 1997). Tento typ zánětu způsobují především kvasinky (Bernardo a kol., 1998).

Akutní hnisavý zánět zvukovodu se zpočátku rovněž projevuje zarudnutím a otokem, zvýšenou tvorbou ušního mazu a hromaděním hnisu v ušním kanálu, který charakteristicky zapáchá a může být různě zbarvený (Kiss a kol., 1997). Typická je bolestivost postižené oblasti, která může vést k agresivitě pacienta (Charlotti, 1991; Kiss a kol., 1997). V kůži zvukovodu se mohou vytvářet abscesy až vředy (Gbelec, 2003). Akutní hnisavý zánět zvukovodu je bakteriálního původu (Bernardo a kol., 1998).

Přetrvávají-li příznaky zánětu, které jsou i přes terapii delší než dva měsíce, nebo dojde-li po přerušení léčby k recidivě, jedná se o chronickou otitidu (White, 1999). Komplikací těchto případů bývá zduření a zesílení sliznice, což může vést až k uzavření dutiny zvukovodu a následnému zhoršení sluchu, v krajním případě až k hluchotě (Gbelec, 2003).

2.6.3 Mikroorganismy podílející se nej častěji na rozvoji otitis externa

Jako nej častější patogeni otitis externa u malých zvířat jsou uváděny mikroorganismy *Staphylococcus intermedius* a *Malassezia pachydermatis* (Kiss a kol., 1997), a koliv bylo popsáno mnoho dalších patogenů (Oliveria a kol., 2008).

2.6.4 Bakterie

Mezi nej častější bakteriální izoláty patří *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*.

Bakterie, které jsou méně často izolovány ze zvukovodu psi jeho zánětu, uvádí Oliveria a kol. (2008) ve své komparativní studii. Jsou to *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus hyicus*, *Staphylococcus aureus* subsp. *anaerobicus*, *Enterobacter* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans*, *Streptococcus* sp., *Staphylococcus* sp., *Escherichia coli*.

2.6.5 Houby

Z fungálních izolátů bývá dle Oliveria a kol. (2008) nej častěji izolovaným druhem *Malassezia pachydermatis*. V mnohem menší míře je pak zastoupena *Candida albicans*, *Aspergillus* sp., *Candida parapsilosis* a *Candida tropicalis*.

2.6.5.1 *Malassezia pachydermatis* a otitis externa

Za normálních podmínek může být sporadicky a v malém počtu vyizolováno ze zevního zvukovodu mnoho druhů kvasinek (Muller a kol., 1985). *M. pachydermatis* kolonizuje stratum corneum zdravého zvukovodu jen velmi málo (Kennis a kol., 1996), ale při patologických a chronických stavech je její výskyt dominující (Muller a kol., 1985; Moris, 1999; Muse, 2000).

Zánět zvukovodu způsobený kvasinkou *M. pachydermatis* je charakterizován vazkým voskovitým exudátem, který má hnědou nebo žlutou barvu. Přítomnost erytému a svědění je variabilní (Griffin, 1993).

Gustafson jako první navrhl, že *M. pachydermatis* může být patogen zodpovědný za otitis externa u psů. Toto tvrzení vyplývalo z pokusu, ve kterém byl indukován vznik otitis externa

u zdravého psa experimentální infekcí zevního zvukovodu kvasinkou *M. pachydermatis*, zatímco po infekci kvasinkou *Pityrosporum ovale* (= *M. furfur*), která kolonizuje především lidskou kůži, k zánětu zvukovodu nedošlo (Gustafson, 1955).

Fraser porovnával frekvenci výskytu izolát *M. pachydermatis* u zdravých psů a u psů s otitis externa. Zjistil, že u psů s otitis externa je četnost výskytu kvasinek v ušním mazu vyšší (Fraser, 1961).



Obrázek 6 Otitis externa způsobená *Malassezia* sp.

(http://www3.unileon.es/personal/wwdmvjrl/dermatopatias/alimentos_9.jpg)

2.7 Molekulární biologická diagnostika

Rod *Malassezia* zahrnuje celkem 13 druhů, které ne vždy mohou být spolehlivě a jednoznačně určeny na základě fenotypových vlastností. Identifikace metodami molekulární biologie je rychlá a specifická.

2.7.1 Polymerázová řetězová reakce

Polymerase Chain Reaction (PCR), polymerázová řetězová reakce, byla jako laboratorní metoda vyvinuta v roce 1983 v laboratořích Cetus Corporation v Kalifornii, Kary B. Mullisem, v rámci řešení exponenciální amplifikace oligonukleotidů v tzv. beta-globinovém programu (Rabinow, 1996).

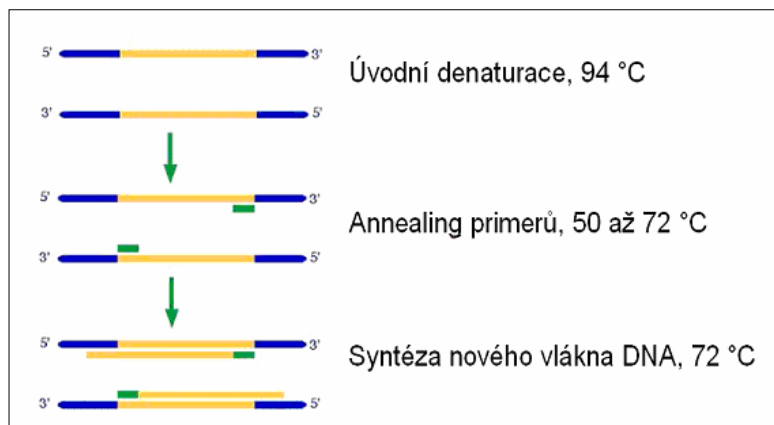
V roce 1993 obdržel Nobelovu cenu za chemii „za příspěvky k rozvoji metod v chemii DNA“ a „za vynález polymerázové řetězové reakce (PCR)“ (<http://nobelprize.org>).

2.7.2 Princip metody

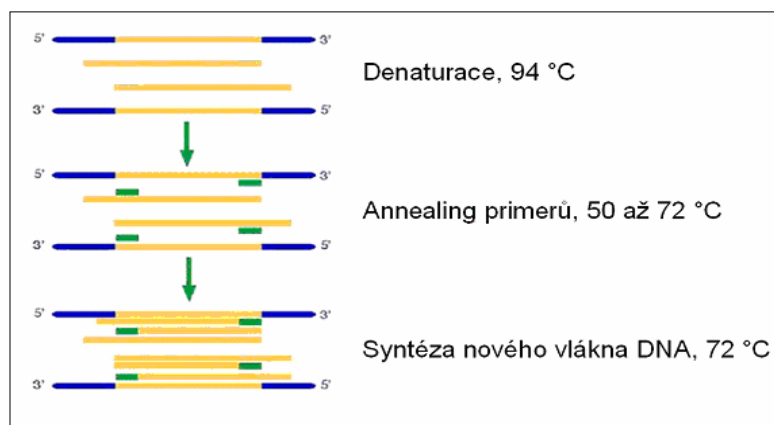
Polymerázová reakce (PCR) je enzymatická metoda sloužící k syntéze jednoho nebo i více definovaných úseků DNA *in vitro* bez účasti živého organismu (Křiváček a Běláček, 1993).

Metoda PCR využívá jednak princip hybridizace a jednak enzymatické syntézy nového kódu DNA.

Při reakci dochází ke třem cyklickým změnám teploty reakce, které postupně aktivují její jednotlivé komponenty. V každém cyklu se podle výchozích zvolených sekvencí matricové DNA zdvojnásobí. Po třech cykly se volí 25 až 35, lze tak teoreticky získat z jednoho amplifikovaného úseku až desítky miliard kopií. S rostoucími počty cyklů stoupá i množství nespecifických produktů (Šmarda a kol., 2005).



Obrázek 7 První cyklus PCR (<http://www.sesep.uvsq.fr/formation/PCR4.JPG>)



Obrázek 8 Následující cykly PCR (<http://www.sesep.uvsq.fr/formation/PCR4.JPG>)

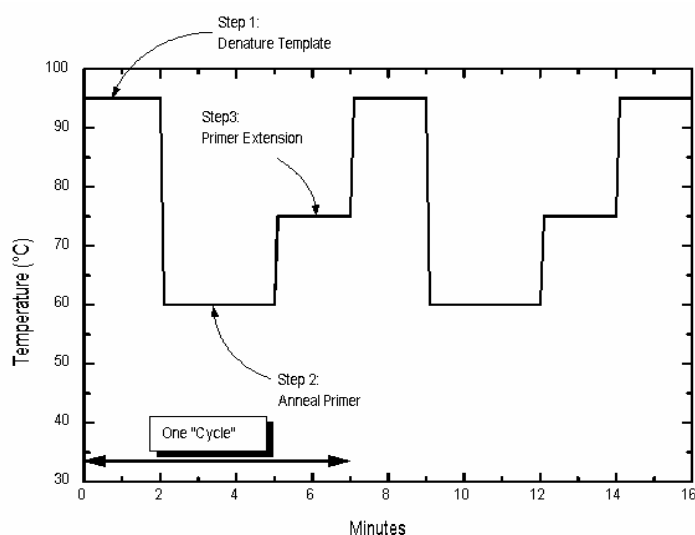
2.7.3 Teplotní profil

Cyklickému stídání teplot předchází samostatný **úvodní denaturační krok**, který trvá několik minut. Účelem je dokonalá denaturace delších molekul DNA. Každý další cyklus PCR pak začíná **denaturací** DNA. Ta probíhá při teplotách nad 90 °C, kdy dochází k porušení vodíkových vazeb mezi bázemi dsDNA a vznikají jednotlivé matricové molekuly ssDNA. Denaturace trvá obvykle 1 minutu, protože vznikající menší fragmenty jsou rychleji denaturovány.

Druhým teplotním krokem cyklu je **annealing** („nasednutí, připojení“) páru primerů, které spontánně hybridizují s templátem ssDNA. Tímto je oboustranně vymezen amplifikovaný úsek. Annealing probíhá při ochlazení směsi na 50 až 72 °C. Teplotu annealingu je třeba vždy pečlivě optimalizovat, protože se jedná o důležitý parametr specifičnosti PCR. Nízká teplota podstatně snižuje specifičnost, vysoká teplota zamezuje amplifikaci. Annealing probíhá po dobu 30 sekund až 2 minut.

Třetím krokem je **extenze** (polymerace, syntéza DNA, elongace). Probíhá při teplotním optimu pro termostabilní DNA polymerázu, tj. 72 °C, která za přítomnosti homologických iontů a typu deoxynukleotidtrifosfát provede syntézu nového vlákna DNA, které je komplementární se sekvencí templátu. Syntéza začíná na 3' konci primeru a trvá 1 minutu a více, dle délky syntetizovaného úseku.

Posledním krokem je **závěrečná extenze**, během které se dokončí syntéza všech neelongovaných matric a předejde se tak výskytu krátkých neúplných fragmentů (Pavlík, 1999; Krámař a Běláček, 1993).



Obrázek 9 Teplotní a časový profil PCR (www.ufrgs.br/depbiot/blaber/section5/section5.htm)

2.7.4 Význam reakčních komponent

Reakce je prováděna v plastických tenkostěnných zkumavkách o objemu 200 µl typu „Eppendorf“ s certifikátem zaručujícím nepřítomnost DNáz a RNáz. Objem směsi se volí obvykle 20 až 50 µl z důvodu rychlé změny teploty, což omezuje vznik nespecifických reakcí.

Reakční směs se připravuje v podobě tzv. „MasterMixu“, tedy smícháním celkového objemu všech komponent, mimo DNA, v jedné zkumavce pro všechny vzorky a kontroly a následným rozpipetováním po alikvotních podílech. Tímto postupem se omezí chyby v pipetování a práce s objemy v řádech desetin mikrolitru.

Základními komponenty PCR směsi jsou: termostabilní *Taq* polymeráza, hořelivé ionty v podobě $MgCl_2$, deoxynukleotidtrifosfáty (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), dvojice primerů a reakční pufr (Pavlík, 1999).

Termostabilní DNA polymeráza je enzym, který katalyzuje reakci. Dnes se používá výhradně *Taq* polymeráza. To přináší mnoho výhod oproti dříve používanému Klenowovu fragmentu DNA polymerázy I z *E. coli*, který byl nepschopný i každém denaturacním kroku. Tato skutečnost bránila v automatizaci metody a zvyšovala riziko kontaminace. *Taq* polymeráza je enzym pocházející z termofilní bakterie *Thermus aquaticus*, který si zachovává svoji aktivitu i při teplotách, přesahujících 90 °C. Enzym je dodáván komerčně a vyrábí se pomocí rekombinantních biotechnologií.

Pro spolehlivou funkci *Taq* polymerázy je důležitá koncentrace **hořelivých iontů**, které mají funkci koenzymu. Jejich nedostatek nebo přebytek způsobí inhibici reakce (Křížová a Běláček, 1993).

Nové vlákno DNA je syntetizováno z **deoxynukleotidtrifosfátů** přítomných ve směsi. Syntéza probíhá směrem 5' → 3'. Nukleotidy jsou spojovány fosfodiesterovou vazbou v pořadí dle komplementarity s templátem.

Primery jsou krátké syntetické oligonukleotidy. Obsahují zpravidla 15 až 25 nukleotidů, komplementárně se azených dle analyzované sekvence na templátu DNA. Primer nasedá na 5' konec templátu a od 3' konce primeru začíná syntéza nového vlákna (Pavlík, 1999).

Vhodné reakční prostředí zajišťuje **reakční pufr**. Pufr obsahuje detergenty a aditiva usnadňující denaturaci a zvyšující stabilitu komplexu templátu a primeru. Omezuje také vznik sekundárních struktur (Pavlík, 1999).

2.7.5 Metody separace a detekce

Základní technikou dlelení a išt ní produkt PCR (amplikon) je gelová elektroforéza. Amplikony se separují podle své relativní molekulové hmotnosti a velikosti náboje. Molekuly DNA mají povahu polyaniont p i pH blízkému 7. V elektrickém poli migrují od katody k anod . Fragmenty o stejné velikosti mají stejnou elektroforetickou mobilitu a v gelu se pohybují společně. Amplikony o menší velikosti pronikají póry v gelu snáze a rychleji. Jako separa ní médium se používá agarózový nebo polyakrylamidový gel (Křmáčková a Běláček, 1993).

Do agarózového gelu, který se připravuje rozva ením agarózy v TBE pufru, se před ztuhnutím přidává ethidium bromid. Toto mutagenní fluorescen ní barvivo se interkaluje mezi nukleotidy. Komplex barviva a DNA vykazuje intenzivní oranžovo červenou fluorescenci p i excita ních vlnových délkách 260 až 300 nm. Po elektroforéze se gely prohlížejí a fotograficky dokumentují na UV transiluminátoru.

Pro p ímé, ale orienta ní, sledování průběhu elektroforézy se produkty PCR mísí ještě před vlastní elektroforézou s vkladacím pufrém. Ten obsahuje 2 barviva, která vymezují oblast pohybu nejrychlejších a nejpomalejších fragmentů.

Rozlišovací schopnost agarózového gelu je desítky pár bází (bp). Koncentrace agarózy, a tedy i rozlišovací schopnost gelu, je volena podle velikosti separovaných amplikonů. Nej častěji se používají koncentrace 0,8 až 3 % agarózy.

Druhým nej častěji používaným elektroforetickým médiem je polyakrylamidový gel. Připravuje se polymerací reakcí akrylamidu a bisakrylamidu. V tomto gelu lze separovat produkty, které se liší pouze o 1 až 2 bp.

Jinou možností, která také využívá gelové separace amplikonů a jejich následného přenesení na membránu, je tzv. Southern blotting. Amplikony jsou z gelu přeneseny na nitrocelulóзовou membránu pomocí difúze, vakua nebo elektrického pole. Se zafixovanou DNA na membráně lze poté provádět hybridizaci se zna enými sondami. Zna ením může být provedeno metodami enzymatickými nebo přímou chemickou vazbou. V obou případech se pak používá zna ení radioaktivní (izotopy ^{32}P , ^{35}S , ^3H , ^{131}I) a neizotopové (fluorescenční, nebo protilátkou zna enou enzymem). Výsledkem je barevná změna, vznik fluorescence, nebo autoradiografický záznam membrány.

Alternativní metodou separace i detekce amplikonů je kapilární elektroforéza. Tato metoda je rychlá a vyžaduje minimální množství vzorku (Práška, 1997).

2.7.6 Modifikace metody PCR a jejich využití

Nested - PCR je PCR využívající vnitřních a vnějších primerů. V porovnání s klasickou PCR je vysoce citlivá. Amplifikace se provádí ve dvou krocích. V prvním kroku vzniká po 15 až 30 cyklech produkt vymezený párem tzv. vnějších primerů. Tento produkt je převeden do druhé zkumavky pro amplifikační krok s tzv. vnitřním párem primerů specifických pro vnitřní sekvenci. Po provedení dalších 15 až 30 cyklů je produkt elektroforeticky analyzován.

Single-tube nested PCR je obdoba nested – PCR provedená v jedné zkumavce. Reakční směs pro druhý amplifikační krok je oddělena pipetážkou z minerálního oleje a po druhém kroku se obsahy smísí mikrocentrifugací. Alternativou je použití dvou párů primerů s různou teplotou annealingu.

Obě tyto metody lze aplikovat pro rodové a druhové identifikaci bakteriálních i fungálních patogenů (Průša, 1997; Pavlík, 1999).

Multiplex PCR, neboli mnohonásobná PCR. V reakční směsi je obsaženo několik párů primerů, které rozpoznávají a vymezují více cílových sekvencí, což umožňuje detekci několika genů souasně. Pro mnohonásobnou amplifikaci je nutno optimalizovat podmínky krok za krokem. Výhodou této modifikace jsou nižší cenové náklady než při samostatných amplifikacích. Používá se pro vyhledávání mutací na dlouhých úsecích DNA a k testování vzájemně nesouvisejících oblastí DNA metodou vnitřní pozitivní kontroly (Průša, 1997).

Real-time PCR je metoda kvantitativní, kterou se stanovuje počet výchozích molekul DNA (cDNA) ve vzorku. Při real-time PCR se měří intenzita fluorescence po každém cyklu PCR. V reakční směsi jsou kromě standardních složek obsaženy fluorescenční značené sondy, které po vazbě na amplikon emitují záření. Real-time PCR se využívá ke kvantifikaci genové exprese, genotypizaci, detekci a kvantifikaci mikroorganismů (Generi Biotech s.r.o., 2009).

RT – PCR je metoda určená k amplifikaci RNA. RNA nemůže být použita jako templát pro PCR, a proto musí být převedena pomocí reverzní transkriptázy (RT) do cDNA. Reverzní

transkriptáza je získávána ze zvířecích retrovirů např. M-MuLV nebo AMV. Vzniklá cDNA je následně použita jako výchozí templát pro PCR se dvěma primery standardním postupem. Nevýhodou je malá tepelná stabilita reverzní transkriptázy. Výhodou je možnost samostatné optimalizace reverzní transkripce a PCR a také syntéza delších produktů.

Dnešní technika RT - PCR využívá termostabilní *Tth* DNA-polymerázu, která má za přítomnosti manganatých iontů RNA-dependentní DNA-polymerázovou aktivitu při teplotě 72 °C. Reverzní transkripci lze zahájit třemi způsoby: a) oligo(dT) primerem, který rozeznává poly(A) konec mRNA, b) náhodnými hexamery v případě že mRNA není polyadenylována, c) dvojicí specifických primerů vymezujících různé velké produkty na templátu mRNA a genomové DNA, která vzorky mRNA často kontaminuje. RT - PCR se používá při studiu genové exprese a k diagnostice virové RNA (Průša, 1997; Pavlík, 1999).

PCR – RFLP (syn. PCR – REA) (polymorfismus délky restrikčních fragmentů u produktu PCR) je modifikace používaná pro typizaci cílové sekvence genu obsahující sekvenci polymorfismus. Zvolená sekvence je po amplifikaci podrobena úniku restrikční endonukleázy, a poté elektroforeticky analyzována. Přítomnost sekvence polymorfismu zamezuje restrikčnímu štěpení. Vzorky jsou typizovány dle svých RFLP vzorů (Průša, 1997).

2.7.7 Publikované metody molekulární biologické detekce *Malassezia* sp.

Sugita a kol. (2001) použil pro identifikaci sedmi druhů *Malassezia* sp. metodu nested - PCR. Ve své studii o analýze druhů *Malassezia* sp. u pacientů s atopickou dermatitidou a u zdravých lidí použil dvojici vnějších, rodově specifických primerů odvozených z oblasti ITS, která se nachází mezi geny kódujícími ribozomální RNA. V druhém cyklu PCR použil dvojici druhově specifických primerů. Identifikaci provedl dle různých délek jednotlivých ampliconů.

Cantheros a kol. (2007) ve své studii provedla porovnání mezi fenotypickou a genotypickou analýzou v identifikaci osmi druhů rodu *Malassezia*. Ke genotypizaci použila metodu PCR - RFLP. Provedla klasickou PCR s rodově specifickými primery vymezujícími sekvenci genu velké podjednotky ribozomální RNA. Sekvence primerů jsou 5'-GCGGAGGAAAAGAACT-3' a 5'-GCGCGAAGGTGTCCGAAG-3'. Vzniklý amplicon o velikosti přibližně 600 bp byl následně podroben restrikčnímu štěpení pomocí enzymu

BamI, *HaeII* a *MspI*. Po elektroforetické separaci byly jednotlivé druhy identifikovány dle svých restrikních profilů.

Gupta a kol. (2000) provedl rozlišení sedmi druhů rodu *Malassezia* amplifikací oblasti genu velké podjednotky ribozomální RNA, oblasti ITS, α -tubulinového genu a genu kódujícího lipázu v kombinaci s RFLP.

V další publikaci (2004) tento autor popisuje identifikaci a typizaci jednotlivých druhů rodu *Malassezia* metodou polymorfizmu délky amplifikovaných fragmentů (AFLP), sekvenční analýzou oblasti ITS a sekvenční analýzou oblasti genu, kódující D1 a D2 hlavní velké podjednotky ribozomální DNA.

Tajima a kol. (2008) uvádí ve své studii detekci zástupců rodu *Malassezia* pomocí nested-PCR s rodově specifickými primery popsány Sugitou a kol. (2001) a druhově specifickými primery navrženými dle sekvence ITS I a IGS I v oblasti genu kódujícího rRNA. Metodou real-time PCR s hydrolyzujícími sondami typu TaqMan provedl kvantitativní stanovení u druhů *M. globosa* a *M. restricta* izolovaných z pacientů se seboroickou dermatitidou.

Cabañes a kol. (2007) použil pro diferenciaci a objevování nových druhů *M. caprae* a *M. equina* sekvenční analýzu genu pro D1 a D2 26S rRNA a genu pro ITS-5,8S rRNA, genu kódujícího podjednotku RNA polymerázy I, genu pro chitin syntetázu a metodu polymorfizmu délky amplifikovaných fragmentů AFLP.

3 Experimentální část

3.1 Pístroje a pomůcky

Thermocykler, RoboCycler Gradient 69, Stratagene, USA

Spektrofotometr, UV 1101, WPA, Velká Británie

Centrifuga HERMLE Z300K, Labortechnik, Německo

Chladnička s mrazničkou, Electrolux ERB 34003 W8 Intuition, Švédsko

Laminární box Jouan HOTTE MSG.9 STANDARD, Francie

Suché teplo, Block Heaters SBH 200D, Stuart, Balworld scientific, Velká Británie

Mikrovlnná trouba, Kor - 8167, Daewoo, Korea

Elektromagnetické míchadlo, MagMix, Denley, USA

Digitální váha, PK-601, Denver instrument, USA

Elektroforetická vana, B1A, OWL Separation Systems Inc., USA

Zdroj napětí pro elektroforézu, OSP-300, OWL Separation Systems Inc., USA

UV transiluminátor s CCD kamerou, Vilber-Lourmat, Francie

Osobní počítač se softwarem Bio-Capt, Schoeller Pharma Praha, s.r.o., ČR

Automatické mikropipety Finnpiette, Labystems, Finsko

Parafilm, Structure Probe, Inc., USA

Zkumavky typu Eppendorf

Laboratorní sklo a pomůcky

3.2 Použité chemikálie

Transportní média

Ameisovo transportní médium - komerčně dodávaná souprava pro odběr vzorku vatovým tampónem (Dispolab, s.r.o., ČR).

Stuartovo transportní médium - postup přípravy: Médium bylo připraveno z komerčně dodávané směsi *Stuart transport Medium* (Oxoid, Velká Británie; č. 14050835).

Kultivační média

Sabouraud v dextrózový agar – postup přípravy: médium bylo připraveno z komerčně dodávané směsi *Sabouraud dextrose Agar* (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., Indie; č.š. YL226) dle přiloženého návodu.

„Malassezia“ agar – postup přípravy: ve 100 ml destilované vody byl rozpuštěn 1 g peptonu (HIMEDIA Laboratories Pvt. Ltd., Indie; č.š. 96018), 4 g glukózy, 0,01 g kvasničného extraktu, 0,2 ml glycerolu, 0,2 ml Tweenu 80 (HIMEDIA Laboratories Pvt. Ltd., Indie; č.š. 5-1113), 50 mg kyseliny stearové (olivový olej), 2 g agaru (HIMEDIA Laboratories Pvt. Ltd., Indie; č.š. 3-0003). Půda byla sterilizována v autoklávu při 121 °C, 15 min.

Složení média doporučila Ing. Elena Slavíková, CSc. ze *Zbierky kultúr kvasiniek* (CCY) v Bratislavě (Slovenská republika).

Izolace DNA

Fenol-chloroformová extrakce:

Tris, Sigma-Aldrich, Inc., USA

HCl, Penta, R

EDTA, Sigma-Aldrich, Inc., USA

sodium dodecyl sulfát (SDS), Carl Roth GmbH & Co., Německo

Směs fenol-chloroform-izoamylalkohol (25:24:1), AppliChem GmbH, Německo

Chloroform, Penta, R

izoamylalkohol, Penta, R

NaCl, Penta, R

95% ethanol, Penta, R

Izolace na kolonkách Qiagen:

DNeasy Blood & Tissue Kit, Qiagen, Německo

PCR směs

Voda, Aqua pro injectione medicamenta, Medicamenta Vysoké Mýto a.s., R

10x PCR pufr (10 mM Tris - HCl, 50 mM KCl, pH 8,3), TAKARA Bio Inc., Japonsko

Směs dNTP (2,5 mM dATP, dTTP, dCTP, dGTP), TAKARA Bio Inc., Japonsko

MgCl₂ (25 mM), TAKARA Bio Inc., Japonsko

Primer m-I (*323A5); 39,59 nmol, Generi-Biotech, s.r.o., R

Primer m-II (*323A6); 39,55 nmol, Generi-Biotech, s.r.o., R

Rekombinantní Taq DNA polymeráza (5 U/μl), TAKARA Bio Inc., Japonsko

Elektroforetická separace

Destilovaná voda

Agaróza, Agarose SERVA für DNA Elektrophorese, Serva, N mecko

PCR ethidium bromid TB (10 mg/ml), Top-Bio s.r.o., R

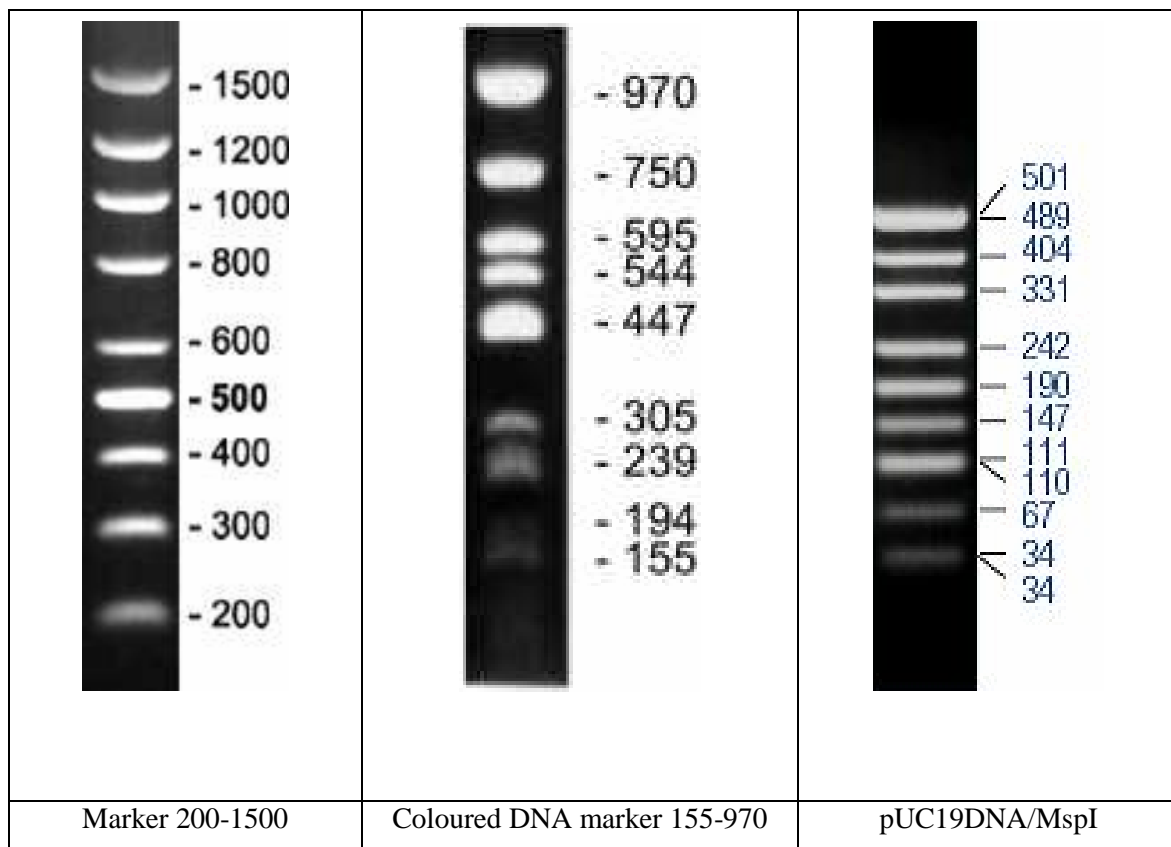
PCR vkládací pufr^{TB}, Top-Bio s.r.o., R

Markery molekulových hmotností:

DNA Marker 200-1500, Top-Bio s.r.o., R

Coloured DNA marker 155-970, Top-Bio s.r.o., R

pUC19DNA/MspI (HpoII) Marker, 23, Fermentas, Kanada



Obrázek 10 Použité markery molekulových hmotností

3.3 Pracovní postupy

3.3.1 Odběr vzorků

Vzorky byly shromažďovány od roku 2004 v rámci řešení diplomových prací zabývajících se mikrobiálními nálezy u psů a koček s otitis externa. Odběry vzorků byly provedeny výtěrem zevního zvukovodu psů a koček s klinickými příznaky otitis externa sterilním tampónem.

Odběr materiálu byl prováděn na Veterinární klinice MVDr. V. Tluhoše, Veterinární klinice MVDr. J. Beránka, Veterinární klinice MVDr. J. Žabky v Pardubicích a část vzorků byla odebrána samostatně od psů známých chovatelů.

Vtšina vzorků byla kultivována do 2 hodin po odběru. Pro potřebu delšího uchování (maximálně 24 hodin) bylo použito Stuartovo nebo Ameisovo transportní médium (Kučerová, 2009; Vanátová, 2007; Rejfková, 2006; Kupcová, 2005).

3.3.2 Zpracování vzorků

Výtěry byly otkovány na krevní agar, Sabouraudův dextrózový agar a Endův agar. Při izolacích prováděných v roce 2008/09 byla použita média: krevní agar, „Malassezia“ agar, MacConkeyho a Slanetz-Bartleyho agar. Po inokulaci 1/3 živného média bylo inokulum rozotkováno bakteriologickou kličkou na zbývající plochu média.

Po 24 hodinách inkubace při 37 °C bylo provedeno první hodnocení nárstu kolonií. V inkubaci bylo pokračováno dalších 24 hodin při 37 °C, případně déle. Pro tuto práci byly vybrány kmeny narostlé na Sabouraudově dextrózovém agaru a na „Malassezia“ agaru, které byly inkubovány 2 až 5 dnů při 37 °C.

U narostlých kolonií byl hodnocen tvar, velikost, barva a zápach. Podezřelé kolonie byly podrobeny subkultivaci do získání čistých kultur.

Vtšina kmenů byla identifikována na základě morfologických a biochemických vlastností (produkce katalázy, ureázy, utilizace Tweenu 20, 40, 60 a 80) do druhu *Malassezia pachydermatis*. U izolovaných kmenů byla stanovena citlivost na antimykotika (Kučerová, 2009; Vanátová, 2007; Rejfková, 2006; Kupcová, 2005).

Všechny takto izolované a identifikované kmeny byly shromážděny. Kolonie téže kultury kvasinky byly suspendovány v 1 ml sterilního fyziologického roztoku a zamraženy pro následnou identifikaci metodou PCR.

3.3.3 Izolace DNA z referenčního kmene na kolonce Qiagen

Referenční kmen *M. pachydermatis* CCY 85-1-5 byl získán ze *Zbierky kultúr kvasiniek* (CCY) v Bratislavě (Slovenská republika).

1. Ke 250 µl lyzovacího pufru bylo přidáno několik kolonií referenčního kmene.
2. Suspenze byla vortexována pro úplnou homogenizaci.
3. Inkubace 15 min. při 100 °C.
4. Centrifugace byla provedena při 8000 rpm po dobu 5 min.
5. Do nové ependorfky bylo napipetováno 20 µl proteinázy K, přidáno 200 µl sedimentovaného vzorku a 200 µl pufru AL.
6. Vortexování 15 s.
7. Inkubace při 56 °C po dobu 10 min.
8. Byla provedena krátká centrifugace pro odstranění kapky ze spodní strany víčka zkumavky.
9. Bylo přidáno 200 µl ethanolu (96 až 100%) a směs byla vortexována.
10. Opět byla provedena krátká centrifugace, kterou byly odstraněny kapky ze spodní strany víčka.
11. Celý objem směsi byl přenesen na kolonku která byla centrifugována při 8000 rpm 1 min.
12. Kolonka byla přenesena do nové ependorfky a plovodní byla vyhozena.
13. Bylo přidáno 500 µl pufru AW1 a provedena centrifugace při 8000 rpm 1 min.
14. Bylo přidáno 500 µl pufru AW2 a provedena centrifugace při 14000 rpm 3min.
15. Kolonka byla přenesena do nové ependorfky a plovodní byla vyhozena.
16. Bylo přidáno 200 µl pufru AE, inkubováno 1 až 5 min. při laboratorní teplotě, a poté byla provedena centrifugace při 8000 rpm 1 min.
17. Pro dlouhodobé uchování byla DNA skladována při -20 °C.

3.3.4 Izolace DNA vzork fenol – chloroformovou extrakcí

1. Ke 250 μ l vzorku suspenze kvasinek bylo přidáno 250 μ l lyzovacího pufru.
2. Inkubace 15 min. při 100 °C.
3. K tomuto hrubému lyzátu bylo přidáno 500 μ l směsi fenol-chloroform-izoamylalkohol (25:24:1).
4. Třepání bylo prováděno 10 min., následná centrifugace 5 min. při 6000 ot./min., a poté 2 min. při 12000 ot./min.
5. Vrchní fáze byla odsáta do nových mikrozkušavek a bylo přidáno 500 μ l směsi chloroform-izoamylalkohol (24:1).
6. Třepání bylo prováděno 10 min. Následná centrifugace byla prováděna 10 min. při 6000 ot./min.
7. Body 5 a 6 byly opakovány.
8. Vrchní fáze byla odsáta do nových mikrozkušavek, přidáno 50 μ l 4 M NaCl a srážení bylo provedeno 500 μ l 95% ethanolu.
9. Obsah zkumavky byl promíchán a centrifugován při 14 000 ot./min. 15 min.
10. Po odsátí 95% ethanolu byla vysrážená DNA propláchnuta 100 μ l 70% ethanolu.
11. Centrifugace 15 min. při 14 000 ot./min.
12. Po odsátí 70% ethanolu byl jeho zbytek ponechán volně odpařit v suché lázni při 50 °C.
13. DNA byla rozpuštěna v 50 μ l TE pufru a uložena 1 až 2 dny pro rozpouštění v lednici. Vyizolovaná DNA byla uskladněna při -20 °C.

Příprava lyzovacího pufru

1) Zásobní roztok 1 M Tris-HCl (pH 8.0) – 1000 ml

Tris base	121,1 g
destilovaná voda	800 ml

Složky byly smíchány, koncentrovaná HCl byla přidána podle požadovaného pH 8,0 (42 ml). Roztok se nechá vychladnout na laboratorní teplotu a provede se konečná úprava pH. Po doplnění do 1000 ml destilovanou vodou se roztok sterilizuje autoklávováním.

2) Zásobní roztok 0,5 M EDTA (pH 8,0) – 1000 ml

EDTA	186,1 g
------	---------

Destilovaná voda 800 ml

Složky byly smíchány a na magnetické míchačce byl roztok intenzivně míchán. Během míchání bylo upraveno pH na 8,0 pomocí NaOH (asi 20 g). EDTA se rozpouští až při pH blízkém 8,0. Po doplnění destilovanou vodou na 1000 ml byl roztok autoklávován.

3) Zásobní roztok 10% SDS – 100 ml

SDS 10 g

Navážené množství SDS bylo rozpuštěno v 80 ml destilované vody a zahřáto na 66 °C za obecného míchání. Po rozpuštění bylo pH upraveno na 7,2 pomocí několika kapek koncentrované HCl. Objem se doplní destilovanou vodou na 100 ml. Roztok není třeba sterilizovat.

4) Příprava lyzovacího pufru – 100 ml

1 M Tris-HCl 10 ml

0,5 M EDTA 6 ml

10% SDS 5 ml

Roztok byl doplněn do 100 ml destilovanou vodou.

Příprava 10x TE pufru - 100 ml

1 M Tris-HCl (pH 7,4) 10 ml

0,5 M EDTA (pH 8,0) 20 ml

destilovaná voda 70 ml

3.3.5 Elektroforéza amplikon

Příprava 10x TBE pufru (zásobní roztok) 1000 ml

Tris base 108 g

kyselina boritá 55 g

0,5 M EDTA (pH 8,0) 40 ml

Destilovaná voda do 1000 ml

Složky byly smíchány a roztok byl intenzivně míchán na magnetické míchačce. Po rozpuštění všech složek byl roztok doplněn do 1000 ml destilovanou vodou.

Příprava 1x TBE pufru (pracovní roztok) 1000 ml

1 díl zásobního roztoku 10x TBE byl smíchán s 9 díly destilované vody.

Příprava 2% agarózového gelu

1. Na papírových vážkách bylo naváženo 1,2 g agarózy a vsypáno do baňky s 60 ml 1x TBE pufru a 5 ml destilované vody.
2. Za občasného promíchání byl gel vařen v mikrovlnné troubě (stupeň 2) dokud se všechna agaróza nerozvaříla.
3. Baňka byla zchlazena studenou vodou na přibližně 50 °C, byly přidány 4 µl ethidium bromidu a obsah promíchán.
4. Gel byl nalit do formy s předem vloženým hřebíčkem.
5. Po ztuhnutí gelu byl hřebíček opatrně vytažen a gel i s formou umístěn do elektroforetické vany.
6. Gel byl převrstven 1x TBE pufrům, tak aby hladina pufru sahala asi 3 mm nad gel.

Aplikace vzorků

1. Na parafilmu bylo pomocí pipety smícháno 3 µl vkladacího pufru a 10 µl produktu PCR.
2. Promíchaný vzorek byl vnesen do jamky v gelu převrstveného 1x TBE pufrům.
3. Do poslední volné jamky bylo vneseno 7 µl markeru molekulových hmotností.
4. Uzavřená elektroforetická vana byla připojena ke zdroji stejnosměrného napětí.
5. Zdroj byl nastaven na napětí 70 V, čas 45 minut a spuštěn.

3.3.6 Detekce amplikonů a dokumentace gelu

1. Po ukončení elektroforézy byla vana odpojena od zdroje a forma s gelem vyjmuta.
2. Gel byl osušen papírovou utěrkou a vložen na UV transiluminátoru.
3. Pomocí CCD kamery napojené na osobní počítač byla pozorována fluorescence produktů PCR v gelu, a také provedena i fotografická dokumentace s vložením popisku k jednotlivým elektroforetickým drahám.

3.4 Metodika PCR stanovení

Při detekci druhu *Malessezia pachydermatis* pomocí PCR bylo využito publikace Sugita a kol. (2001). Pro PCR byly použity primery m-I a m-II syntetizované, dle sekvence převzaté z výše zmíněné publikace, firmou Generi Biotech, s.r.o. v Hradci Králové.

Primery jsou druhově specifické a jsou navrženy z oblasti genu kódující rRNA (Makimura a kol., 2000).

Délka ampliconu je 220 bp (Sugita a kol., 2001).

Tabulka 3 Sekvence primer m-I a m-II

Primer	Sekvence primeru
m-I	5'-CTG CCA TAC GGA TGC GCA AG-3'
m-II	5'-TTC GCT GCG TTC TTC ATC GA-3'

Teplotní profil z publikace Sugita a kol., 2001:

úvodní denaturace	94 °C/ 3 minuty	
denaturace	94 °C/ 30 sekund	} 30 cyklů
annealing	62 °C/ 1 minutu	
extenze	72 °C/ 40 sekund	
závěrečná extenze	72 °C/ 10 minut	

Tabulka 4 Složení reakční směsi

Reagencie	Koncentrace v 25 µl	Objem (µl)
Voda	-	15,75
10x PCR pufr	1x	2,5
Směs dNTP (2,5 mM každého)	0,2 mM každého	2
MgCl ₂ (25 mM)	2 mM	2
Primer m-I (50 pmol/µl)	0,5 pmol/µl	0,25
Primer m-II (50 pmol/µl)	0,5 pmol/µl	0,25
Taq polymeráza (5 U/µl)	0,005 U/µl	0,25
DNA	-	2
		25 µl

3.5 Optimalizace podmínek PCR

3.5.1 Testování optimální teploty annealingu

Pro zajištění citlivosti a specifity reakce je nutno optimalizovat podmínky, za kterých bude PCR probíhat. Jedním ze základních a klíčových požadavků PCR, jakožto metody využívající mimo jiné i mechanismu hybridizace nukleových kyselin, je optimalizace 2. teplotního kroku – annealingu. Při tomto kroku dochází k ochlazení reakční směsi o několik stupňů, což způsobí hybridizaci primerů k denaturovanému šablonu dsDNA dle pravidla komplementarity bází.

Teplotní rozmezí je voleno na základě teploty tání primerů.

Pro páry primerů m-I a m-II bylo zvoleno teplotní rozmezí 56 až 66 °C. Test byl proveden při teplotách: 56, 58, 60, 62, 64, 66 °C.

Testovaný teplotní profil:

Úvodní denaturace	94 °C/ 3 minuty	
Denaturace	94°C/ 30 sekund	} 30 cyklů
Teplotní gradient annealingu:	56 – 66 °C/ 1 minuta	
Extenze	72 °C/ 50 sekund	
Závěrečná extenze	72 °C/ 10 minut	

Po elektroforetické separaci a vizualizaci pod UV zářením byla hodnocena intenzita fluorescence produktů reakce v jednotlivých drahách elektroforézy. Nejintenzivnější fluorescence byla pozorována u produktu, který byl získán za optimální teploty annealingu.

Takto stanovená teplota hybridizace primerů (annealingu) byla použita při všech PCR stanoveních.

3.6 Parametry metody PCR

3.6.1 Ověření specifity primer

Z důvodu relativně pestrého zastoupení druhů normální i patologické bakteriální mikroflóry v zevním zvukovodu ps je nutno ověřit specifitu reakce, která je založena na pravidlech komplementarity purinových a pyrimidinových bazí sekvence templátové DNA a primeru.

Cílem ověřování specifity primerů je zjistit, zda navržená sekvence páru primerů specificky hybridizuje s cílovou oblastí DNA mikroorganismu, pro který byly primery navrženy, tj. pro *M. pachydermatis*.

Pro srovnání byly použity vzorky DNA mikroorganismů, které bývají často izolovány společně s *M. pachydermatis*, jmenovitě: *Malassezia furfur*, *Streptococcus canis*, *Streptococcus dysgalactiae* ssp. *equisimilis*. Amplifikace, separace a detekce produktů reakce byla provedena standardním způsobem.

3.6.2 Stanovení detekčního limitu reakce

K orientačnímu zjištění nejmenšího množství templátové DNA vkládané do reakce slouží metoda stanovení detekčního limitu reakce.

Pro stanovení detekčního limitu byla použita DNA izolovaná pomocí fenol-chloroformové extrakce ze vzorku č. 460, u kterého bylo metodou PCR potvrzeno, že se jedná o druh *Malassezia pachydermatis*.

Pro zjištění koncentrace DNA bylo použito měření absorbance (A) při vlnové délce $\lambda = 260$ nm. Výpočet koncentrace byl proveden dle obecného vztahu pro spektrofotometrii dsDNA: pokud je $A_{260} = 1$, pak koncentrace dsDNA je rovna 50 $\mu\text{g/ml}$. Před měřením byl vzorek 20x zředěn, aby bylo zamezeno použití příliš vysoké koncentrace DNA, pro kterou nepřestává platit Lambert-Beerův zákon (Křmář a Bicháček, 1993).

Pro praktický výpočet bylo použito vztahu:

$$C_{DNA} = A_{260} \cdot 50 \cdot f_z$$

kde A_{260} je absorbance měřené DNA při $\lambda = 260$ nm, 50 je koncentrace DNA v $\mu\text{g/ml}$, která

odpovídá hodnotě absorpce $A_{260} = 1$, f_z je faktor zedání $\left(f_z = \frac{V_{H_2O} + V_{DNA}}{V_{DNA}}\right)$. Tento vztah lze použít za předpokladu, že optická dráha kyvety je 1 cm.

Takto zmíněný vzorek byl použit pro přípravu desítkové řady a koncentrace v jednotlivých zkumavkách byla dopřesněována.

Ukázka byla tedy získána z 8 vzorků DNA o sestupné koncentraci, které byly použity jako výchozí šablona do PCR reakce. Amplifikace byla provedena výše zmíněným standardním postupem. Po elektroforetické separaci produktů reakce byla na gelu hodnocena intenzita pruhů tvořené amplicony. Koncentrace DNA ve vzorku, která ještě poskytne pozitivní výsledek, byla hodnocena jako limitní detekční koncentrace.

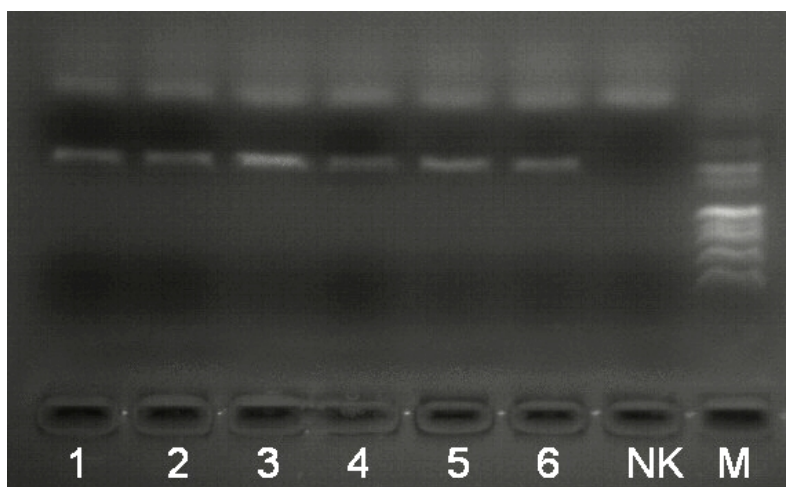
4 Výsledky

4.1 Testování optimální teploty annealingu

Byl proveden test optimální teploty annealingu primer m-I a m-II. Jako templát byla použita DNA referenčního kmene *Malassezia pachydermatis* CCY 85-1-5. Teplota annealingu byla testována v rozmezí 56 - 66 °C. Test byl proveden při teplotách: 56, 58, 60, 62, 64, 66 °C.

Velikost amplikonu je 220 bp.

Optimální teplota annealingu byla určena dle intenzity fluorescence amplikonu, která zhruba odpovídá množství amplikonu, a tedy i výživnosti reakce.



Obrázek 11 Test optimální teploty annealingu

Legenda:

dráha . 1 – teplota 56 °C, pozitivní amplikon 220 bp

dráha . 2 – teplota 58 °C, pozitivní amplikon 220 bp

dráha . 3 – teplota 60 °C, pozitivní amplikon 220 bp

dráha . 4 – teplota 62 °C, pozitivní amplikon 220 bp

dráha . 5 – teplota 64 °C, pozitivní amplikon 220 bp

dráha . 6 – teplota 66 °C, pozitivní amplikon 220 bp

NK – negativní kontrola

M – marker molekulových hmotností: Coloured DNA marker 155- 970

Nejintenzivnější fluorescence byla subjektivně vyhodnocena u ampliconu v dráze . 3. Pro další PCR stanovení byla zvolena teplota annealingu 60 °C.

4.2 Stanovení detekčního limitu reakce

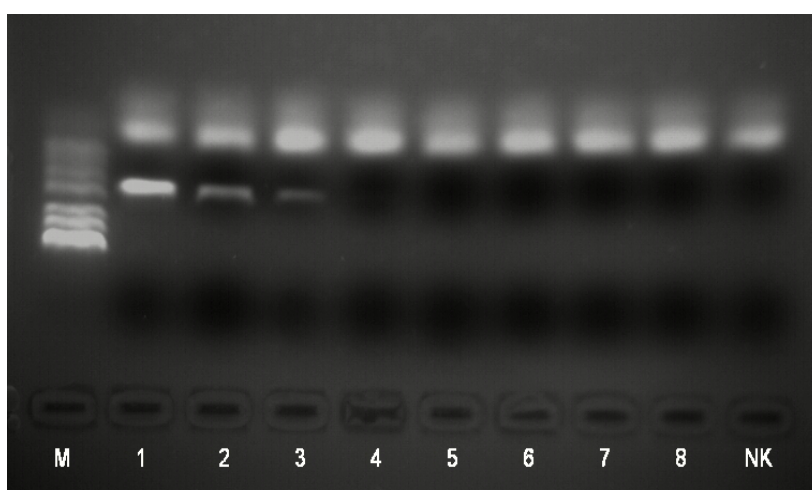
Pro stanovení detekčního limitu byla použita DNA ze vzorku . 460, u kterého bylo metodou PCR potvrzeno, že se jedná o druh *Malassezia pachydermatis*.

Pro měření koncentrace byl vzorek DNA naředěn 20x vodou (Aqua pro injectione medicamenta). Jako blank byla použita voda (Aqua pro injectione medicamenta). Na UV spektrofotometru byla změněna absorbance naředěného vzorku oproti blanku při vlnové délce 260 nm.

Tabulka 5 Hodnota absorbance, koncentrace vzorku

Vzorek .	A ₂₆₀	C _{DNA} (μg/ml)
460	0,186	186

Z takto změněného vzorku byla vytvořena koncentrační řada pomocí desítkového ředění. Do reakce byly použity 2 μl templátové DNA, takže výsledná detekovatelná hmotnost DNA byla dvojnásobná. Amplifikace, separace a detekce byla provedena standardním způsobem. Délka ampliconu je 220 bp. Výsledek stanovení byl odečten z fotografie gelu.



Obrázek 12 Stanovení detekčního limitu

Legenda:

M – marker molekulových hmotností: pUC19DNA/MspI

dráha . 1 – pozitivní amplikon 220 bp

dráha . 2 – pozitivní amplikon 220 bp

dráha . 3 – pozitivní amplikon 220 bp

dráha . 4 – negativní

dráha . 5 – negativní

dráha . 6 – negativní

NK – negativní kontrola

Tabulka 6 Stanovení detekčního limitu

Dráha .	C _{DNA} vz. . 460	Množství DNA	Amplikon
1	186 ng/μl	372 ng	+
2	18,6 ng/μl	37,2 ng	+
3	1,86 ng/μl	3,72 ng	+
4	186 pg/μl	372 pg	-
5	18,6 pg/μl	37,2 pg	-
6	1,86 pg/μl	3,72 pg	-
7	186 fg/μl	372 fg	-
8	18,6 fg/μl	37,2 fg	-

Hodnota detekčního limitu byla stanovena na 3,72 ng DNA druhu *Malassezia pachydermatis*.

4.3 Stanovení specifity primer

U dvojice primer m-I a m-II byla ověřena specifita hybridizace s templátovou DNA druhu *Malassezia pachydermatis* a vznik produktu PCR o délce 220 bp.

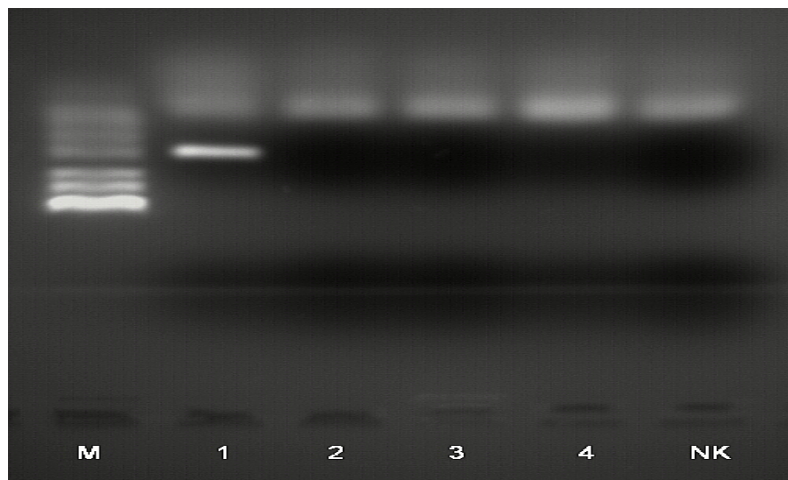
K porovnání specifity byla testována hybridizace primer se vzorky DNA mikroorganism, které se často komenzálně vyskytují s *M. pachydermatis* v zevním zvukovodu zdravých i nemocných zvířat.

Byla použita DNA mikroorganism : *Malassezia furfur*

Streptococcus canis

Streptococcus dysgalactiae ssp. *equisimillis*.

Amplifikace, separace a detekce produkt reakce byla provedena standardním způsobem.



Obrázek 13 Stanovení specifity primer

Legenda:

M – marker molekulových hmotností: pUC19DNA/MspI

dráha . 1 – *Malassezia pachydermatis*, pozitivní amplikon 220 bp

dráha . 2 – *Malassezia furfur*, negativní

dráha . 3 – *Streptococcus canis*, negativní

dráha . 4 – *Streptococcus dysgalactiae* ssp. *equisimillis*, negativní

NK – negativní kontrola

Použitý pár primer m-I a m-II specificky hybridizuje pouze s templátovou DNA druhu *Malassezia pachydermatis*.

4.4 Detekce *Malassezia pachydermatis* v reálných vzorcích

Vyšetřeno bylo celkem 114 vzorků DNA izolované z kvasinek, zařazených dle morfologických a biochemických vlastností do rodu *Malassezia*. Tyto vzorky byly shromážděny v průběhu let 2004 až 2009 v rámci řešení diplomových prací týkajících se mikrobiálních nálezů při otitis externa u malých zvířat.

Kultivační techniky použité v letech 2004 až 2007 byly zaměřeny na záchyt širšího spektra mikroorganismů. Izolace kvasinek rodu *Malassezia* byla z důvodu použití Sabouraudova dextrózového agaru podstatně omezena na non-lipid-dependentní druh *Malassezia pachydermatis*. Lipofilní zástupci tohoto rodu nemají vhodné podmínky pro růst.

Izoláty kvasinek, získané v rámci řešení diplomové práce v roce 2008/09, zaměřené na mikrobiální nálezy při zánětech zevního zvukovodu u psů a koček, byly kultivovány na „*Malassezia*“ agaru, kde byly podmínky pro nárůst lipid-dependentních i non-lipid-dependentních druhů již příznivé (Kučerová, 2009).

Pro pozdější účely izolace DNA a identifikace metodou PCR byly kolonie suspendovány v 1 ml sterilního fyziologického roztoku a uloženy při -20 °C.

Izolace DNA byla provedena u všech vzorků metodou fenol-chloroformové extrakce a vysrážená DNA byla rozpuštěna v TE pufru. DNA referenčního kmene byla izolována na kolonkách Qiagen.

V letech 2004 až 2007 bylo shromážděno 81 kmenů s podezřením, že se jedná o *M. pachydermatis*. Z tohoto počtu bylo kultivováno 70 (86,4 %) uraženo jako *M. pachydermatis* zbývajících 11 jako neznámé kmeny. Po analýze metodou PCR bylo u všech kmenů kultivovaných jako *M. pachydermatis* potvrzeno, že se jedná o tento druh. Ze zbývajících 11 kmenů bylo dalších 6 zařazeno do druhu *M. pachydermatis*. Metodou PCR bylo tedy identifikováno 76 (93,8 %) kmenů jako *M. pachydermatis*. Zbývajících 5 kmenů nebylo uraženo. Lze u nich pouze vyloučit, že se jedná o tento druh. Metoda PCR se tedy potvrdila jako citlivá metoda pro detekci *M. pachydermatis* ve vzorcích, u kterých kultivační vyšetření nebylo jednoznačné.

Tabulka 7 Výsledky analýzy vzorků izolovaných v letech 2004 až 2007

Vzorek .	Výsledek	Vzorek .	Výsledek	Vzorek .	Výsledek
1M	pozitivní	28	negativní	345	pozitivní
2M	pozitivní	29	pozitivní	349	pozitivní
3M	pozitivní	30	negativní	351	pozitivní
4M	pozitivní	385	pozitivní	355	pozitivní
5M	pozitivní	396	pozitivní	365	pozitivní
6M	pozitivní	398	pozitivní	374	pozitivní
7M	pozitivní	399	pozitivní	452A	pozitivní
8M	pozitivní	432	pozitivní	452B	pozitivní
9M	pozitivní	402	pozitivní	455	pozitivní
10M	pozitivní	442	pozitivní	457	pozitivní
11M	pozitivní	407	pozitivní	462 L	pozitivní
12M	pozitivní	444	pozitivní	467 R	pozitivní
13M	pozitivní	410	pozitivní	470	pozitivní
14M	pozitivní	416	pozitivní	460	pozitivní
15M	pozitivní	428	pozitivní	463	pozitivní
16M	pozitivní	320	pozitivní	458 P	pozitivní
17M	pozitivní	324	pozitivní	464 I.	pozitivní
18M	pozitivní	325	pozitivní	489	pozitivní
19M	pozitivní	328	pozitivní	466 p	pozitivní
20	pozitivní	330	pozitivní	461 II	pozitivní
21	negativní	332	pozitivní	473	pozitivní
22	pozitivní	334	pozitivní	481 L	pozitivní
23	pozitivní	338	pozitivní	482 L	pozitivní
24	pozitivní	342	pozitivní	500 P	pozitivní
25	pozitivní	344	pozitivní	492	pozitivní
26	negativní	358	pozitivní	497	pozitivní
27	negativní	366	pozitivní	471	pozitivní

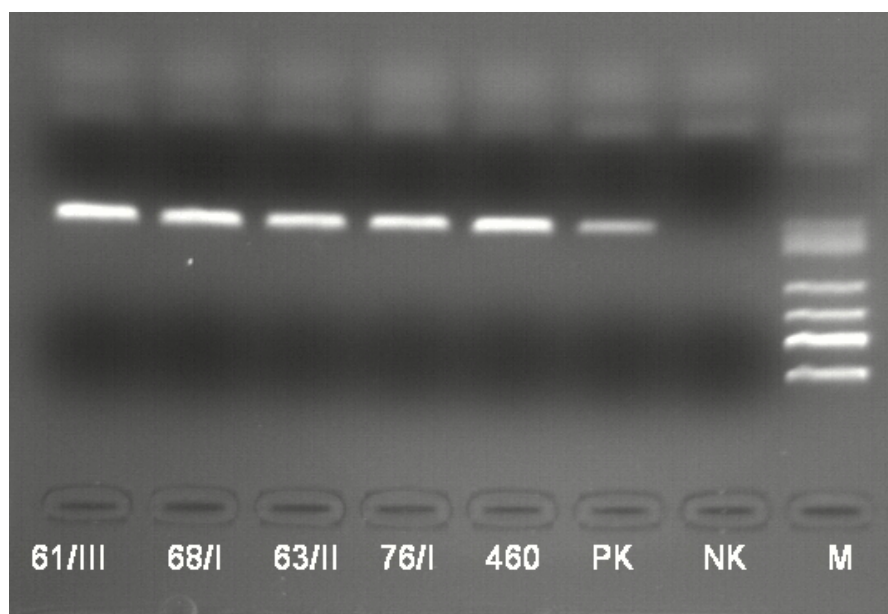
V letech 2008 až 2009 bylo shromážděno celkem 33 kmenů s podezřením, dle morfologických a fyziologických znaků, že se jedná o druh *M. pachydermatis*. Po analýze metodou PCR bylo u 20 (60,6 %) kmenů potvrzeno, že jde o druh *M. pachydermatis* a u 13 (39,4 %) kmenů bylo vyloučeno, že se jedná o tento druh. Následnou doplňkovou kultivací bylo těchto 13 kmenů douráno. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 9.

Tabulka 8 Výsledky PCR analýzy vzorků izolovaných v roce 2008/09

Vzorek .	Výsledek	Vzorek .	Výsledek
22/B	negativní	30/IV	pozitivní
35/III	negativní	41/1	pozitivní
5/IV	negativní	45 V	pozitivní
33/VII	negativní	48 I	pozitivní
8/III	negativní	49 III	pozitivní
8/VII	negativní	21/II	pozitivní
9/V	negativní	76/I	pozitivní
9/IV	negativní	63/II	pozitivní
12/III	negativní	68/I	pozitivní
12/IV	negativní	61/III	pozitivní
15B/III	negativní	62/III	pozitivní
18/III	negativní	55/III	pozitivní
19/IV	negativní	56/II	pozitivní
24/V	pozitivní	96/I	pozitivní
25/I	pozitivní	95/I	pozitivní
26/I	pozitivní		

Tabulka 9 Dour ení 13 negativních vzorků

Vzorek .	Dour ený kmen
22/B	<i>Staphylococcus intermedius</i>
35/III	<i>Staphylococcus intermedius</i>
5/IV	<i>Pseudomonas</i> sp.
33/VII	koaguláza negativní stafylokok (KNS)
8/III	<i>Staphylococcus intermedius</i>
8/VII	<i>Bacillus</i> sp.
9/V a 9/IV	1 kmen <i>Staphylococcus epidermidis</i>
12/III a 12/IV	1 kmen KNS
15/B	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
18/III	KNS
19/IV	KNS



Obrázek 14 Detekce *M. pachydermatis* ve vzorcích

Legenda:

vzorek . 61/III – pozitivní amplikon 220 bp

vzorek . 68/I – pozitivní amplikon 220 bp

vzorek . 63/II – pozitivní amplikon 220 bp

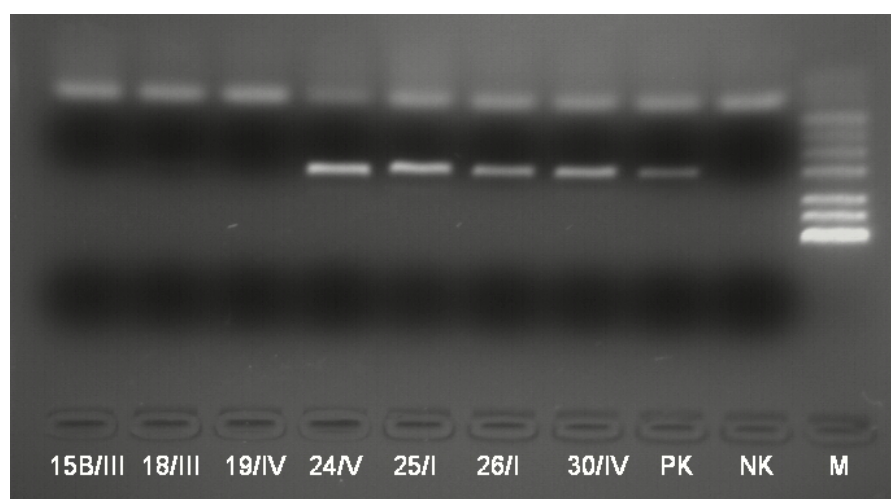
vzorek . 76/I – pozitivní amplikon 220 bp

vzorek . 460 – pozitivní amplikon 220 bp

PK – pozitivní kontrola

NK – negativní kontrola

M – marker molekulových hmotností: DNA Marker 200-1500



Obrázek 15 Detekce *M. pachydermatis* ve vzorcích

Legenda:

vzorek . 15B/III – negativní

vzorek . 18/III – negativní

vzorek . 19/IV – negativní

vzorek . 24/V – pozitivní amplikon 220 bp

vzorek . 25/I – pozitivní amplikon 220 bp

vzorek . 26/I – pozitivní amplikon 220 bp

vzorek . 30/IV – pozitivní amplikon 220 bp

PK – pozitivní kontrola

NK – negativní kontrola

M – marker molekulových hmotností: pUC19DNA/MspI

Metoda PCR se osvědčila jako vhodná doplňková metoda kultivace pro kazu *M. pachydermatis*, obzvláště při nejasných výsledcích kultivace. Z celkového počtu 114 vzorků bylo metodou PCR detekováno 96 (84 %) pozitivních a 18 (16 %) negativních na druh *Malassezia pachydermatis*. Podarilo se také dourit 6 z 11 neznámých kmenů kvasinek do druhu *M. pachydermatis*.

5 Diskuze

Molekulární biologické metody včetně PCR patří v mikrobiologické diagnostice k nekultivním metodám s vysokou specifitou. Ve srovnání s kultivním vyšetřením mají výhodu v rychlosti získání výsledku během několika hodin, a proto jsou často využívány pro urgentní diagnostiku mikrobiálních infekcí. Nevýhodou je však nutná optimalizace metody a vyšší finanční náročnost.

Pro molekulární detekci druhu *Malassezia pachydermatis* byla provedena optimalizace metody PCR. Nejdříve byla stanovena optimální teplota annealingu druhově specifických primerů, jejichž sekvence byla převzata z publikace Sugita a kol. (2001). V této publikaci byla jako optimální teplota annealingu stanovena 62 °C, v naší laboratoři se však jako vhodnější ukázala teplota 60 °C. Specifita těchto primerů byla ověřena na dvou zástupcích rodu *Malassezia* a dvou zástupcích rodu *Streptococcus*. Bylo ověřeno, že specifické primery hybridizují pouze s DNA druhu *M. pachydermatis*.

Jako limitní množství DNA druhu *M. pachydermatis* ve vzorku, které lze touto metodou detekovat, bylo stanoveno na 3,72 ng DNA/μl.

Vzorky DNA, ve kterých byla prováděna detekce *M. pachydermatis*, byly získány kultivním vyšetřením tampónových výtěr zevního zvukovodu u psů. Z narostlých kolonií byla vytvořena suspenze ve fyziologickém roztoku. Izolace DNA byla provedena metodou fenol-chloroformové extrakce.

V průběhu pětiletého mikrobiologického výzkumu ušních výtěrů bylo shromážděno 114 vzorků z části kultivně určených jako *M. pachydermatis* (103 vzorků) a z části blíže neurčených (11 vzorků). Cílem této práce bylo potvrdit kultivní výsledky u kmenů zařazených do druhu *M. pachydermatis* a provést detekci tohoto druhu u kultivně blíže neurčených vzorků.

U 103 kultivně pozitivních vzorků (90,3 % ze všech) byl druh *M. pachydermatis* potvrzen metodou PCR v 90 případech. Doplnkovou kultivací se podařilo dourit 13 vzorků, u nichž bylo metodou PCR vyloučeno, že se jedná o tento druh.

Z 11 blíže kultivně neurčených vzorků kvasinek se podařilo detekovat druh *M. pachydermatis* metodou PCR u 6 vzorků.

Celkem bylo potvrzeno a nově dourěno 96 (84 %) vzorků jako druh *M. pachydermatis* ze shromážděných 114 vzorků. Z 18 (16 %) negativních vzorků bylo pomocí doplnkové kultivace dourěno 13 vzorků a u 5 vzorků bylo pouze vyloučeno, že se jedná o druh *M. pachydermatis*.

Morris a kol. (2005) ve své studii popisuje riziko přenosu *M. pachydermatis* ze psů s atopickou dermatitidou na ruce jejich majitelů, především z řad zdravotnického personálu. Pro detekci tohoto druhu použil kultivační i molekulární biologické metody (nested - PCR). Pro PCR použil rodov a druhově specifické primery, které převzal z publikace Sugita a kol. (2001) a které byly použity i v této diplomové práci. Z celkového počtu 75 vzorků bylo kultivačně pozitivních 81,3 % a pomocí metody PCR bylo určeno 97,3 % pozitivních vzorků. Touto metodou tak bylo odhaleno několik falešně kultivačně negativních výsledků.

V porovnání s výsledky této diplomové práce se ukazuje spíše opačný trend, kdy metodou PCR jsou odhaleny výsledky falešně kultivačně pozitivní. Příčinou lze hledat v nízké selektivitě „Malassezia agaru“ pro záchyt kvasinek rodu *Malassezia*, kterou by mohla zvýšit suplementace tohoto média širokospektrálními antibiotiky.

6 Závěr

Celkem bylo vyšetřeno 114 vzorků DNA extrahované ze suspenze kultury kvasinek izolovaných ze Sabouraudova dextrózového agarů a z „Malassezia agarů“, v průběhu let 2004 až 2009. Tyto vzorky byly získány kultivací výtěrů ze zevního zvukovodu psů a koček i zánětu zevního zvukovodu v rámci řešení diplomových prací v těchto letech.

Vzorky byly rozděleny do dvou skupin.

První skupina zahrnovala 81 vzorků DNA shromážděných během let 2004 až 2007. Tyto vzorky byly izolovány ze Sabouraudova dextrózového agarů. Metodou PCR bylo potvrzeno u 70 (86,4 %) vzorků, že se jedná o druh *Malassezia pachydermatis*, to bylo potvrzeno i kultivacími metodami. Také zbylých 11 kultivacími sporných vzorků bylo analyzováno metodou PCR a jako druh *M. pachydermatis* tak bylo douráno dalších 6 vzorků. U zbylých 5 vzorků nebyl druh *M. pachydermatis* potvrzen. Tyto vzorky pak nebyly podrobeny další analýze. Metodou PCR bylo tedy identifikováno 76 (93,8 %) kmenů jako *M. pachydermatis*.

Druhá skupina zahrnovala vzorky shromážděné v roce 2008 až 2009. Tyto vzorky byly izolovány z „Malassezia agarů“. U 20 (60,6 %) vzorků bylo metodou PCR určeno, že se jedná o druh *M. pachydermatis*, u 13 (39,4 %) to bylo vyvráceno. Tyto 13 vzorků bylo dále douráno kultivacími metodami.

Metodou PCR tak bylo z celkového počtu 114 vzorků druhově určeno jako *M. pachydermatis* 96 (84 %) vzorků a z celkového počtu 18 (16 %) negativních vzorků bylo 13 douráno doplňkovou kultivací.

Z výsledků této diplomové práce vyplývá, že metoda PCR se osvědčila jako vhodná a citlivá metoda pro kazu druhu *M. pachydermatis*. Tuto metodu lze doporučit jako vhodný doplněk při rozhodování sporných kultivacími výsledků.

7 Seznam literary

- 1) BARFATANI, M., MUNN, R.J., and SCHJEIDE D.A. An ultrastructural study of *Pityrosporum orbiculare*. J. Investig. Dermatol. 1964;43:231–233.
- 2) BATRA, R., BOEKHOUT, T., GUEHO, E., CABANES, F.J., DAWSON, T.L. JR., GUPTA, A.K. *Malassezia* Baillon, emerging clinical yeasts. FEMS Yeast Res. 2005;5(12): 1101-1113.
- 3) BENHAM, R. W. The cultural characteristics of *Pityrosporum ovale* – a lipophilic fungus. J. Investig. Dermatol. 1939;2:187–203.
- 4) BERNARDO, F.M., MARTINS, H.M., MARTINS, M.L. A survey of mycotic otitis externa of dogs in Lisbon. Rev Iberoam Micol. 1998;15(3):163-5.
- 5) BLANCO, J. L., GUEDEJA-MARRÓN, J., HONTECILLAS, R., SUARES, G. - GARCIA, M. E. Microbiological diagnoses of chronic otitis extema in the dog. J. Vel. Med. 1996;43(8):475-482.
- 6) BROTHERTON, J. The sulphur metabolism of *P. ovale* and its inhibition by selenium compounds. J. Gen. Microbiol. 1967;49:393–400.
- 7) CABAÑES, F.J., THEELEN, B., CASTELLÁ, G., BOEKHOUT, T. Two new lipid dependent *Malassezia* species from domestic animals. FEMS Yeast Res. 2007;7(6):1064-1076.
- 8) CANTEROS, C.E., RIVAS, M.C., LEE, W., PERROTTA, D., BOSCO-BORGEAT, M.E., DAVEL, G. Concordance between phenotypical features and PCR-REA for the identification of *Malassezia* spp. Rev Iberoam Micol. 2007;24(4):278-82.
- 9) CRESPO, M. J., ABARCA, M. L., CABANES, F. J. Evolution of Different Preservation and Storage Methods for *Malassezia* spp. J. Clin. Microbiol. 2000;38(10):3872-3875.

- 10) 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(6):2383-2385.
- 11) CUNNINGHAM, A. C., J. P. LEEMING, E. INGHAM, AND G. GOWLAND. Differentiation of three serovars of *Malassezia furfur*. *J. Appl. Bacteriol.* 1990;68:439–446.
- 12) DAVID, M., GABRIEL, M., KOPECKÁ, M. Unusual ultrastructural characteristics of the yeast *Malassezia pachydermatis*. *Scripta medica (Brno)*. 2003;76(3):173.
- 13) DODGE, C.V. Fungous Diseases of Men and Other Mammals. *Medical mycology*. 1935:370
- 14) DOYLE, R. S., SKELL Y, C., BELLENGER, CH. R. Surgical management of 43 cases of chronic otitis externa in the dog. *Irish Vet. J.* 2004;57(1):22-30.
- 15) FAERGEMANN, J., AND BERNANDER, S. Microaerophilic and anaerobic growth of *Pityrosporum* species. *Sabouraudia* 1981;19:117–121.
- 16) FERNÁNDEZ, G., BARBOZA, G., VILLALOBOS, A., PARRA O., RAMÍEZ, A. Isolation and identification of microorganisms present in 53 dogs suffering otitis extema. *Revista Científica* 2006;16(1):23-30.
- 17) FRASER, G. *Pityrosporum pachydermatis* Weidman of canine origin. *Trans Br Mycol Soc.* 1961;44:441-448.
- 18) GBELEC, P. Choroby uší. 2003. [on-line]. [cit. 2009-10-3]. Dostupné na World Wide Web: <<http://www.aavet.cz/main.php?page=rclanek&id=6>>.
- 19) GENERI BIOTECH s.r.o. Základní principy kvantitativní real-time PCR (qPCR) [online]. c2009 [cit. 2009-22-4]. Dostupné na World Wide Web: <<http://www.generi-biotech.com/real-time-pcr-sondy-kvantitativni-real-time-pcr/>>.

- 20) GRIFFIN, C.E. Otitis externa and Otitis media. In: Griffin, C.E., Kwochka, K.W., MacDonald, J.M., eds. Current Veterinary Dermatology. St. Louis: Mosby Year Book, 1993:224-262.
- 21) GUÉHO, E., MIDGLEY, G., GUILLOT, J. The genus *Malassezia* with description of four species. *Antonie van Leeuwenhoek* 1996;69:337-355.
- 22) GUÉHO, E., MIDGLEY, G., GUILLOT, J. The genus *Malassezia* with description of four species. *Antonie van Leeuwenhoek*. 1996;69:337-355.
- 23) GUILLOT, J., BOND, R. *Malassezia pachydermatis*: a review. *Med Mycol*. 1999;37:295-306.
- 24) GUILLOT, J., GUÉHO, E., MILOT, M., CHERMETTE, R. Importace des levures des genere *Malassezia* en dermatologie vétérinaire. *Le Point Veterinaire*. 1998;36:220-229.
- 25) GUILLOT, J., HADINA, S., GUÉHO, E. The genus *Malassezia*: old facts and new concepts. *Parassitologia*. 2008;50(1-2):77-79.
- 26) GUILLOT, J., CHERMETTE, R., GUÉHO, E. Prévalence du genre *Malassezia* chez les mammifères. *J Mycol Méd* 1994;18:72-79.
- 27) GUPTA, A.K., BOEKHOUT, T., THEELEN, B., SUMMERBELL, R., BATRA, R. Identification and typing of *Malassezia* species by amplified fragment length polymorphism and sequence analyses of the internal transcribed spacer and large-subunit regions of ribosomal DNA. *J Clin Microbiol*. 2004;42(9):4253-4260.
- 28) GUPTA, A.K., KOHLI, Y., SUMMERBELL C.R. Molecular Differentiation of Seven *Malassezia* Species. *J Clin Microbiol*. 2000;38(5):1869-1875.
- 29) GUSTAFSON, B.A. The occurrence of yeasts belonging to genus *Pityrosporum* in different kinds of animals. *Acta Pathol Microbiol Scand*. 1960;48:51-55.

- 30) GUSTAFSON, B.A., Otitis externa in the dog. A bacteriological and experimental study. Thesis, Royal Veterinary College of Sweden, Stockholm. 1955:117.
- 31) HIRAI, A., KANO, R., MAKIMURA, K., DUARTE, E. R., HAMDAN, J. S., LACHANCE, M. A., YAMAGUCHI, H., AND HASEGAWA, A. *Malassezia nana* sp. nov., a novel lipid-dependent yeast species isolated from animals. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2004;54:623–627.
- 32) CHARLOTTI, D. N. Diagnosis and medical treatment of otitis externa in dogs and cats. *J. Small Anim. Pract.* 1991;32:394-400.
- 33) CHEN, T.A., HILL, P.B. The biology of *Malassezia* organisms and their ability to induce immune responses and skin disease. *VetDermatol.* 2005;16:4-26.
- 34) INAMDAR, A. C., PALIT, P. The genus *Malassezia* and human disease. *Indian J Dermatol Venereol Leprol.* 2003;6 (4):265-270.
- 35) KANEKO, T., MAKIMURA, K., ABE, M., SHIOTA, R., NAKAMURA, Y., KANO, R., HASEGAWA, A., SUGITA, T., SHIBUYA, S., WATANABE, S., YAMAGUCHI, H., ABE, S., OKAMURA, N. Revised culture-based system for identification of *Malassezia* species. *J Clin Microbiol.* 2007;45(11):3737-3742.
- 36) KEDDIE, F. M., and BARAJAS., L. Quantitative ultrastructural variations between *P. ovale* and *P. orbiculare* based on serial section electron microscopy. *Int. J. Dermatol.* 1972;11:40-48.
- 37) KENNIS, R.A., ROSSER, E.J. JR., OLIVIER, N.B. Quantity and distribution of *Malassezia* organisms on the skin of clinically normal dogs. *J Am Vet Med Assoc.* 1996;208:1048–51.
- 38) KISS, G., RADVÁNYI, S., SZIGETI, G. Characteristics of *Malassezia pachydermatis* strains isolated from canine otitis externa. *Mycoses.* 1996;39(7-8):313-321.

- 39) KISS, G., RADV ÁNYI, S., SZIGETI, G. New combination for the therapy of canine otitis externa. I. Microbiology of otitis externa. J. Small Anim. Pract. 1997;38(2):51-56.
- 40) KISS, G., RADV ANYI, S., SZIGETI, G., LUKATS, B., NAGY, G. New combination for the therapy of canine otitis externa. II. Efficacy in vitro and in vivo. J. Small Anim. Pract. 1997;38:57-60.
- 41) KR MÁ , M., B ICHÁ EK, B. Molekulárn biologické metody ve virologické diagnostice. Vydavatelství IDVPZ. Brno: 1993. 87 s.
- 42) KU ERA, J. Zán t vn jšího zvukovodu. 2000. [on-line]. [cit. 2009-04-10]. Dostupné na World Wide Web: < http://www.dalmatinklub.com/Cz/Zpravoda/2_2000.htm#_zanet >.
- 43) KU EROVÁ, P. Mikrobiální nálezy p i zán tech zevního zvukovodu ps a ko ek. Pardubice: Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko technologická. 2009. 82 s. Vedoucí diplomové práce Jaroslava Mazurová.
- 44) KUMAR, A., SINGH, K., SHARMA, A. Prevalence of *Malassezia pachydermatis* and other organisms in healthy and infected dogs ears. Israel Vet. Med. Assoc. 2002;54:4
- 45) KUPCOVÁ, M. Mikrobiální nálezy p i zán tu zevního zvukovodu ps a ko ek. Pardubice: Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko technologická. 2005. 65 s. Vedoucí diplomové práce Jaroslava Mazurová.
- 46) KWON-CHUNG, K. J., BENNET, J.E. Infections caused by *Malassezia* species. On: Medical mycology. Philadelphia: Lea and Febiger. 1992;70-182.
- 47) LAROCCO, M., DORENBAUM, A., ROBINSON, A. and PICKERING, L. K. Recovery of *Malassezia pachydermatis* from eight infants in a neonatal intensive care nursery: clinical and laboratory features. Pediatr. Infect. Dis. J. 1988;7:398–401.
- 48) LEEMING, J.P., NOTMAN, F.H., HOLLAND, K.T. The distribution and ecology of *Malassezia furfur* and cutaneous bacteria on human skin. J Appl Bacteriol. 1989;67:47–52.

- 49) LOGAS, D.B. Diseases of the ear canal. *Vet. Clin. North Am. Small Pract.* 1994;24(5):905-919.
- 50) MAKIMURA, K., TAMURA, Y., KUDO, M., UCHIDA, K., SAITO, H., and YAMAGUCHI, H. Species identification and strain typing of *Malassezia* species stock strains and clinical isolates based on the DNA sequences of nuclear ribosomal internal transcribed spacer 1 regions. *J. Med. Microbiol.* 2000;49:29–35.
- 51) MAYSER, P., IMKAMPE A., WINKELER M., AND PAPVASSILIS, C. Growth requirements and nitrogen metabolism of *Malassezia furfur*. *Arch. Dermatol. Res.* 1998;290:277–282.
- 52) MIDGLEY, G., CLAYTON, Y.M. The yeast flora of birds and mammals in captivity. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 1969;Suppl:E23-4.
- 53) MULLER, E. Managing otitis extema and media I & II. *Veterinary Dermatology Seminar in Hawai.* 2001.
- 54) MULLER, G.H., KIRK R.W., SCOTT, D.W. *Dermatologia dos pequenos animais* (3 Ed.), St. Paulo, Editora Manole. 1985:255-309.
- 55) MUSE R. *Malassezia* dermatitis. In: Bonagura JD, editor. *Kirk's current veterinary therapy XIII.* Philadelphia: W.B. Saunders Co. 2000:574–7.
- 56) NAZARRO-PORRO, PASSI, S., CAPRILLI, F., ET AL. Growth requirement and lipid metabolism of *Pityriasis orbicularis*. *J Invest Dermatol* 1976;66:178-182.
- 57) NCBI, Taxonomy Browser [on-line]. [cit. 2009-03-17]. Dostupné na World Wide Web: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=55193>>.
- 58) Nobelprize.org [online]. c2009 [cit. 2009-04-17]. Dostupné na World Wide Web: <http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1993/index.html>.

- 59) OLIVEIRA, L.C., LEITE, C.A., BRILHANTE, R.S., CARVALHO, C.B. Comparative study of the microbial profile from bilateral canine otitis externa. *Can Vet J.* 2008;49(8):785-788.
- 60) PAVLÍK, E. Molekulárně biologické techniky pro mikrobiologickou diagnostiku – část 3. Labor aktuell CS. Praha. 1999;2:22-25.
- 61) PRŮŠA, R. Základy analytických metod v klinické molekulární biologii. LAMBDA BIOMED spol. s r. o. a 2. lékařská fakulta UK, Praha 1997. ISBN 80-238-0940-7.
- 62) REJFKOVÁ, M. Mikrobiální nálezy při zánětech zevního zvukovodu psů a koček. Pardubice: Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická. 2006. 92 s. Vedoucí diplomové práce Jaroslava Mazurová.
- 63) RYBNÍČEK, J. Základy diagnostiky a terapie otitis externa u psů. *Veterinární stv.* 1997;11:465-466.
- 64) SAADATZADEH, M. R., ASHBEE, H. R., HOLLAND, K. T., and INGHAM, E. Production of the mycelial phase of *Malassezia* species *in vitro*. *Med. Mycol.* 2001;39(6):487-493.
- 65) SIMMONS, R. B., and GUÉHO, E. A new species of *Malassezia*. *Mycol. Res.* 1990;94:1146–1149.
- 66) SUGITA, T., TAKASHIMA, M., SHINODA, T., SUTO, H., UNNO, T., TSUBOI, R., OGAWA, H., and NISHIKAWA, A. New yeast species, *Malassezia dermatis*, isolated from patients with atopic dermatitis. *J. Clin. Microbiol.* 2002;40:1363–1367.
- 67) SUGITA, T., SUTO, H., UNNO, T., TSUBOI, R., OGAWA, H., SHINODA, T., NISHIKAWA, A., Molecular analysis of *Malassezia* microflora on the skin of atopic dermatitis patients and healthy subjects. *J Clin Microbiol.* 2001;39(10):3486-3490.
- 68) SUGITA, T., TAJIMA, M., TAKASHIMA, M., AMAYA, M., SAITO, M., TSUBOI, R. and NISHIKAWA, A. A new Yeast, *Malassezia yamatoensis*, Isolated from a Patient

- with Seborrheic Dermatitis, and Its Distribution in Patients and Healthy Subjects. *Microbiol. Immunol.* 2004;48(6):579-583.
- 69) SUGITA, T., TAKASHIMA, M., KODAMA, M., TSUBOI, R., and NISHIKAWA, A. Description of a new yeast species, *MALASSEZIA JAPONICA*, and its detection in patients with atopic dermatitis and healthy subjects. *J. Clin. Microbiol.* 2003;41:4695-4699.
- 70) SWIFT, J. A., AND S. F. DUNBAR. Ultrastructure of *Pityrosporum ovale* and *P. canis*. *Nature.* 1965;206:1174–1175.
- 71) ŠMARDA, J., DOŠKA, J., PANTĚK, R., RŽÍKOVÁ, V., KOPTÍKOVÁ, J. *Metody molekulární biologie.* Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, Katedra genetiky a molekulární biologie, Brno. 2005. ISBN: 80-210-3841-1.
- 72) TAJIMA, M., SUGITA, T., NISHIKAWA, A., TSUBOI, R. Molecular analysis of *Malassezia* microflora in seborrheic dermatitis patients: comparison with other diseases and healthy subjects. *J Invest Dermatol.* 2008;128(2):345-351.
- 73) THOMPSON, E., AND J. R. COLVIN. Composition of the cell wall of *Pityrosporum ovale* (Bizzozero) Castellani and Chalmers. *Can. J. Microbiol.* 1970;16:263–265.
- 74) USHIJIMA, T., TAKAHASHI, M., OZAKI, Y. Selective and differential media for isolation and tentative identification of each species of *Pityrosporum* residing on normal and diseased human skin. *Microbiol Immunol.* 1981;25:1109–1118.
- 75) VANĀTOVÁ, I. *Mikrobiální nálezy při zánětech zevního zvukovodu psů a koček.* Pardubice: Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko technologická. 2007. 104 s. Vedoucí diplomové práce Jaroslava Mazurová.
- 76) WHITE, P.D. Medical management of chronic otitis in dogs. *Com. Contin. Educ. Pracl. Vel.* 1999;2:716-728.

- 77) WIKLER, J. R., JANSSEN, N., BRUYNZEEL, D. P., and NIEBOER, C. The effect of UV light on *Pityrosporum* yeasts: ultrastructural changes and inhibition of growth. *Acta Dermato-Venereol.* 1990;70:69–72.
- 78) YARROV, D. and AHEARN D.G. Genus 7: *Malassezia* Baillon. In: Kreger-van Rij NYW, ed. *The Yeasts, a Taxonomic Study*. Amsterdam: Elsevier Science Publ, 1984:882-885.
- 79) YOSHIDA, N., NAITO, F., FUKATA, T. Studies of certain factors affecting the microenvironment and microflora of the external ear of the dog in health and disease. *J. Vet. Med. Sci.* 2002;64(12):1145-1147.