



Uniwersytet w Białymstoku  
Wydział Biologiczno-Chemiczny

Urszula Czyżewska

**Biochemiczne i molekularne cechy grzybów  
*Malassezia pachydermatis* izolowanych od psów**

*Rozprawa doktorska*

Promotor: dr hab. Adam Michał Tylicki  
Promotor pomocniczy: dr Marek Bartoszewicz

Białystok, 2017

## STRESZCZENIE

*Malassezia pachydermatis* wchodzi w skład fizjologicznej bioty skóry i błon śluzowych większości ssaków i ptaków. Jako oportunista powoduje głównie powierzchniowe zakażenia skóry. Gatunek ten w skrajnych przypadkach może być przyczyną fungemii u noworodków oraz pacjentów hospitalizowanych na oddziałach intensywnej terapii. Ponieważ *M. pachydermatis* izolowany jest prawie z taką samą częstotliwością od pacjentów chorych, jak i tych bez klinicznych objawów choroby, dokładne diagnozowanie zakażeń wywoływanych przez tego drożdżaka stanowi problem zarówno w weterynarii, jak i medycynie. Izolacja tych grzybów od pacjentów nie jest równoznaczna z identyfikacją czynnika etiologicznego zakażenia. Zgodnie z aktualnym stanem wiedzy, problem chorób związanych z *M. pachydermatis* korelowany jest ze stanem metabolicznym, hormonalnym i immunologicznym gospodarza.

W świetle aktualnej literatury fachowej znaczenia nabiera pytanie, czy patogenność *M. pachydermatis* uwarunkowana jest wyłącznie czynnikami zależnymi od gospodarza, czy też pewne szczepy posiadają niezależne mechanizmy wirulencji, a inne czynniki jedynie wyzwalają ich ekspresję. W swojej pracy postawiłam następującą hipotezę: 'Występowanie cech różniących izolaty *M. pachydermatis* pochodzące od zdrowych lub chorych zwierząt wskazuje na istnienie typowo komensalnych, jak i potencjalnie patogennych szczepów w obrębie gatunku'.

W celu weryfikacji postawionej hipotezy utworzyłam bazę szczepów *M. pachydermatis* izolowanych od psów chorych na *otitis externa* oraz psów bez objawów choroby. Następnie określiłam i porównałam w obrębie badanych grup szczepów podobieństwo oraz pokrewieństwo genetyczne, aktywności enzymów wewnątrzkomórkowych i fosfolipaz wydzielanych zewnątrzkomórkowo, a także profile lipidowe i białkowe.

Zarówno analizy podobieństwa genetycznego z wykorzystaniem techniki RAPD-PCR, jak i ocena pokrewieństwa w oparciu o sekwencje nukleotydowe fragmentu ITS-1 wykazały zróżnicowanie i grupowanie się szczepów w zależności od źródła pochodzenia. Wskazuje to, że *M. pachydermatis* jest zróżnicowanym i silnie polimorficznym gatunkiem mimo skrajnych przystosowań do zajmowanej niszy ekologicznej. Brak stwierdzonych śladów specjacji w obrębie porównywanych grup szczepów, w obliczu dużej zmienności w obrębie gatunku, nie neguje obecności cech różniących poszczególne grupy szczepów. Wyodrębnienie grup z przewagą szczepów o wspólnym pochodzeniu wspiera hipotezę

o możliwości istnienia szczepów potencjalnie patogennych w obrębie gatunku obdarzonych cechami ułatwiającymi infekcję.

Wyniki porównania profili lipidowych, aktywności fosfolipaz oraz profili białkowych badanych grup szczepów *M. pachydermatis* wspierają postawioną hipotezę. W swoich badaniach wykazałam, że profile lipidowe i białkowe poszczególnych szczepów różnią się w zależności od źródła ich pochodzenia. Na uwagę zasługuje fakt, że niektóre cechy (niższa zawartość estrów ergosterolu, niższa całkowita zawartość kwasów tłuszczowych, obecność kwasu nerwonowego) były stwierdzone u szczepów izolowanych z przypadków *otitis externa* bez względu na warunki prowadzenia kultury. U szczepów tych stwierdziłam również obecność charakterystycznych białek, wśród których istotną rolę w procesie patogenezy mogą mieć NADP-zależna dehydrogenaza mannitolowa (EC 1.1.1.138) oraz reduktoizomeraza ketolo-kwasowa (EC 1.1.1.86). Szczepy te wykazywały również znacznie wyższą aktywność fosfolipazy C w porównaniu ze szczepami izolowanymi od psów bez klinicznych objawów choroby.

Otrzymane wyniki nie pozwalają na odrzucenie postawionej hipotezy. Ostateczne potwierdzenie istnienia szczepów typowo komensalnych i potencjalnie patogennych wymagałoby prowadzenia dodatkowych, modelowych badań klinicznych, rozszerzonych o inne gatunki z rodzaju *Malassezia*. Stwierdzone cechy różniące badane grupy szczepów mogą posłużyć precyzyjniejszej diagnozie na wczesnych etapach infekcji lub nawet podejmowaniu kroków profilaktycznych i typowaniu grup ryzyka jeszcze przed wystąpieniem objawów choroby. Zastosowanie kombinacji stwierdzonych cech (aktywność fosfolipaz, obecność charakterystycznych białek i profil lipidowy) może okazać się trafnym markerem patogenności szczepu, co ma szczególne znaczenie w obliczu wzrostu przypadków zakażeń oportunistycznych u zwierząt i ludzi.

## SUMMARY

*Malassezia pachydermatis* is a part of the physiological biota of the skin and mucous membranes of most mammals and birds. This opportunistic species causes mainly surface skin infections. However, in extreme cases can also cause fungemia in neonates and patients hospitalized in the intensive care units. Since *M. pachydermatis* is isolated almost equally from diseased animals and those without clinical symptoms of the disease, accurate diagnosis of infections caused by this yeast is a problem of great importance veterinary and medicine. Therefore, the isolation of these fungi from patients is not an equivalent to the identification of the etiologic agent of infection. According to a current state of knowledge, the problem of diseases associated with *M. pachydermatis* is correlated with the metabolic, hormonal and immunological state of the host.

In the light of a literature review, a significant question arises, whether the pathogenicity of *M. pachydermatis* is solely conditioned by host-dependent factors, or pathogenic strains have independent virulence mechanisms and the other factors only trigger their expression. In my work I put forward the following hypothesis: 'The occurrence of features that distinguish *M. pachydermatis* isolates from healthy or diseased animals indicates the presence of typically commensalic and potentially pathogenic strains within the species'.

In order to verify this hypothesis, I created a collection of *M. pachydermatis* strains isolated from dogs with *otitis externa* and dogs without symptoms of the disease. Then I determined and compared the overall genetic diversity and phylogenetic relationships of obtained isolates and, in the next step, I assessed the activities of intracellular and extracellular enzymes, as well as lipid and protein profiles within the studied groups of strains.

By the application of two different techniques, RAPD-PCR fingerprinting and nucleotide sequencing of ITS-1 fragments, I have demonstrated the high level of genetic diversity and an origin-dependent grouping scheme of the strains. These results indicate that *M. pachydermatis* is a diverse and highly polymorphic species despite adaptations to the occupied ecological niche. In spite of the lack of any speciation signals between strains representing both groups and their high polymorphism, the existence of features differentiating both group of strains cannot be excluded. The separation of clades grouping mostly strains of the same origin supports the hypothesis assuming the existence

of a group of potentially pathogenic strains within the species that are endowed with features that facilitate infection.

Results of lipid profiles, phospholipase activities and protein profiles comparison between representatives of both examined groups of *M. pachydermatis* strains also support that hypothesis. In my research, I have shown that the lipid and protein profiles of individual strains correlate to their origin. Particularly noteworthy is the fact that some features (lower content of ergosterol esters and total fatty acids as well as presence of nerve acid) were found only in the case of strains isolated from *otitis externa* irrespective of the culture conditions. In these strains, I also found the presence of specific proteins: the NADP-dependent mannitol dehydrogenase (EC 1.1.1.138) and ketol-acid reductoisomerase (EC 1.1.1.86) which can play an important role in the pathogenesis process. These strains also exhibited significantly higher phospholipase C activity in comparison to strains isolated from dogs without clinical symptoms of disease.

The obtained results do not allow to reject above mentioned hypothesis. The undeniable confirmation of the presence of typically commensalic and potentially pathogenic strains of *M. pachydermatis*. It would require further studies including other *Malassezia* species and additional clinical modeling. Distinctive attributes of the different strains can be used in order to precise diagnose the early steps of infection, prophylactic procedures application or even identification the risk groups prior to onset of clinical symptoms. The identified characteristics (phospholipase activity, presence of characteristic proteins and lipid profile) may become a good marker of strains pathogenicity what is particularly important due to increasing number of opportunistic infections in animals and humans.