

Sveučilište u Zagrebu

Veterinarski fakultet

Ivana Ivanković

Analiza genetičke raznolikosti gljivice *Malassezia pachydermatis* izolirane iz smeđeg medvjeda (*Ursus arctos*)
na području Republike Hrvatske

Diplomski rad

Zagreb, 2018.

Ovaj rad izrađen je na Zavodu za mikrobiologiju i zarazne bolesti s klinikom Veterinarskog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu i Laboratoriju za molekularnu genetiku Zavoda za molekularnu biologiju Instituta Ruđer Bošković.

Predstojnik: prof. dr. sc. Zoran Milas

Mentor: doc. dr. sc. Suzana Hađina

Članovi Povjerenstva za obranu diplomskog rada:

1. prof. dr. sc. Zoran Milas
2. prof. dr. sc. Ljiljana Pinter
3. doc. dr. sc. Suzana Hađina
4. doc. dr. sc. Josipa Habuš (zamjena)

Zahvale

Zahvaljujem mentorici doc. dr. sc. Suzani Hađini na stručnom vodstvu, podršci i strpljenju.

Posebno zahvaljujem višoj znanstvenoj suradnici dr. sc. Dušici Vujakliji na pomoći u laboratorijskom radu te pruženim savjetima oko pisanja ovog diplomskog rada.

Zahvaljujem dr. sc. Branki Bruvo Mađarić na pomoći pri pročišćavanju PCR proizvoda i bioinformatičkoj analizi sekvenci.

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

Zahvaljujem veterinarskoj tehničarki Maji Štrkalj za pripremanje hranjivih podloga te pomoći pri naciepljivanju izolata.

Također zahvaljujem prof. dr. sc. Đuri Huberu i dr. med. vet. Slavenu Reljiću na ustupljenim uzorcima koji su sakupljeni u sklopu projekta “Upravljanje i zaštita populacije smeđih medvjeda u sjevernim Dinaridima i Alpama”.

Hvala mojoj obitelji i prijateljima na razumijevanju, strpljenju, nesebičnoj i bezrezervnoj podršci za svo vrijeme moga studiranja.

Popis i objašnjenje kratica

- SAA - Sabouraud dekstroza agar s aktidionom
- mDIXON - modificirani Dixon agar
- PCR - lančana reakcija polimerazom
- TAE - pufer za elektroforezu
- EDTA - etilendiamintetraoctena kiselina
- ITS1 - unutrašnja razmaknica ribosomske DNK
- LSU - velika podjedinica ribosomske DNK

Popis tablica i slika

- **Tablica 1.** Kemijski sastav hranjivih podloga SAA i mDixon.
- **Tablica 2.** Sastav ukupne reakcijske smjese za umnažanje ciljnog odsječka DNK lančanom reakcijom polimerazom za genetički biljeg ITS1.
- **Tablica 3.** Uvjeti provođenja lančane reakcije polimerazom (PCR program za genetički biljeg ITS1).
- **Tablica 4.** Sastav ukupne reakcijske smjese za umnažanje ciljnog odsječka DNK lančanom reakcijom polimerazom za genetički biljeg LSU.
- **Tablica 5.** Uvjeti provođenja lančane reakcije polimerazom (PCR program za genetički biljeg LSU).
- **Slika 1.** Kolonije gljivice *M. pachydermatis* na hranjivim podlogama SAA i mDixon.
- **Slika 2.** Prikaz izolirane genomske DNK *M. pachydermatis* iz smeđeg medvjeda (*Ursus arctos*).
- **Slika 3.** Prikaz umnoženih odsječaka DNK molekula ciljne regije LSU pomoću PCR metode.
- **Slika 4.** Prikaz umnoženih odsječaka DNK molekula ciljne regije ITS1 pomoću PCR metode.
- **Slika 5.** Sravnjenje ITS1 sekvence između 18S i 5.8S rRNK gena gljivice *Malassezia pachydermatis*.
- **Slika 6.** Sravnjenje DNK fragmenata gena za veliku podjedinicu 26S rRNK (LSU) gljivice *Malassezia pachydermatis*.

SADRŽAJ RADA

1. UVOD.....	1
2. PREGLED LITERATURE.....	3
3. MATERIJALI I METODE.....	6
3.1. Uzorci.....	6
3.2. Uzgoj gljivice <i>M. pachydermatis</i>	6
3.3. Izolacija DNK iz kulture gljivice <i>M. pachydermatis</i>	7
3.4. Lančana reakcija polimerazom (PCR).....	9
3.5. Elektroforeza.....	12
3.6. Pročišćavanje PCR proizvoda.....	12
4. REZULTATI.....	14
5. RASPRAVA.....	23
6. ZAKLJUČCI.....	26
7. LITERATURA.....	27
8. SAŽETAK.....	33
9. SUMMARY.....	34
10. ŽIVOTOPIS.....	35

1. UVOD

Medvjed koji živi u Hrvatskoj sisavac je iz reda zvijeri (*Carnivora*), porodice medvjeda (*Ursidae*), roda medvjed (*Ursus*) i vrste smeđi medvjed (*Ursus arctos*) (DEČAK i sur., 2005.). Smeđi medvjed (*Ursus arctos*) najveća je kopnena zvijer koja nastanjuje područja Gorskog kotara i Like. U Hrvatskoj živi dinarska populacija, druga po veličini u Europi, koja zajedno s onom u Sloveniji čini najzapadniju stabilnu populaciju i čiji se broj uspješno održava prema procijenjenom broju jedinki (PLEŠE, 2008.). Populacijom medvjeda u Hrvatskoj gospodari se prema Planu gospodarenja donesenom 2005. godine od strane Ministarstva regionalnog razvitka, šumarstva i vodnog gospodarstva te Ministarstva kulture - Uprave za zaštitu okoliša. Naime, svake se godine izrađuje Akcijski plan u kojem se definiraju najznačajnije smjernice gospodarenja (DEČAK i sur., 2005.). Medvjed u Hrvatskoj ima status lovne divljači pa se njime gospodari na razini lovišta. Odobrenim lovno gospodarskim osnovama utvrđuje se brojno stanje, prirast, ali i planira njegov odstrel. Životinje se odstreljuju prema kvotama koje se izračunavaju u odnosu na procjenu brojnosti cjelokupne populacije. Sezona lova vremensko je razdoblje koje se određuje svake godine. Za 2014. godinu određena je razdobljima od 1. ožujka do 15. svibnja te od 16. rujna do 15. prosinca. Broj je medvjeda u Hrvatskoj nepoznat, međutim između svake od provedenih procjena zabilježena je tendencija porasta. Mogući raspon po postojećim procjenama iznosi 600 do 1000 jedinki (BIŠĆAN i sur., 2014.). Smeđi medvjed uvršten je na Crveni popis ugroženih biljnih i životinjskih vrsta Hrvatske 2004. godine (PLEŠE, 2008.).

Koža je medvjeda, poput kože drugih divljih i domaćih životinja te čovjeka, kolonizirana gljivicama iz roda *Malassezia* koje ondje kohabitiraju zajedno s ostalim mikroorganizmima. One se smatraju oportunističkim patogenima koji uslijed određenih predisponirajućih čimbenika mogu uzrokovati patološke promjene te kliničku sliku otitisa i dermatitisa pasa i mačaka, a nešto rjeđe u drugih domaćih i divljih životinja (NAKAGAKI i sur., 2000.; WESCHE i BOND, 2003.; CABAÑES i sur., 2007.; GUILLOT i sur., 2010.; VOLK i sur., 2010.). U ljudi navedena gljivica uzročnik je seboroičnog dermatitisa, folikulitisa, atopičnog dermatitisa, papilomatoze, onihomikoze, prolazne akantolitičke dermatoze, pa čak i sistemske infekcije dojenčadi (GUPTA i KOHLI, 2004a.).

Na temelju rezultata istraživanja učestalosti izolacije kvasca iz roda *Malassezia* na

prikupljenim obriscima lijevog i desnog zvukovoda te perianalnog područja smeđeg medvjeda (*Ursus arctos*) izolirana je vrsta *M. pachydermatis* u 98 % slučajeva. Noviji rezultati znanstvenih istraživanja pokazali su da različite vrste spomenutog roda gljivica uzrokuju patološke promjene kože i sluznica, posebice u sklopu imunodeficijernih bolesti, što ukazuje na izuzetnu važnost izolacije i genetičke karakterizacije tih gljivica. Osim toga, dosadašnja istraživanja ukazala su da je moguća prilagodba *M. pachydermatis* na specifičnog domaćina i određeni dio tijela.

Naime, pretpostavka je da postoji određena raznolikost filogenetskih podskupina unutar vrste *M. pachydermatis* izolirane iz vanjskog zvukovoda i perianalnog područja, koja bi mogla upućivati na njihovu evolucijsku prilagodbu na medvjeda kao specifičnog domaćina te moguću povezanost s određenim kliničkim očitovanjima infekcije ovom oportunistički-patogenom gljivicom.

S obzirom na oskudnost literaturnih podataka o kolonizaciji smeđeg medvjeda (*Ursus arctos*) gljivicom *M. pachydermatis* i njenoj genetičkoj raznolikosti, opći su ciljevi ovog diplomskog rada uzgoj arhiviranih smrznutih kultura gljivice *M. pachydermatis* na komercijalno dostupnoj i uobičajenoj hranjivoj podlozi za uzgoj kvasaca te na selektivnoj hranjivoj podlozi namijenjenoj izolaciji svih vrsta *Malassezia* sp., zbog stjecanja praktičnih znanja za optimizaciju molekularnih metoda neophodnih za genotipizaciju ove gljivice te daljnja istraživanja ove tematike.

Specifični su ciljevi rada optimizacija izolacije genomske DNK iz kultura gljivica naraslih na različitim podlogama, umnožavanje specifičnog odsječka DNK uz pomoć početnica za dva genetička biljega, unutrašnju razmaknicu (ITS1, eng. *first internal transcribed spacer*) i veliku podjedinicu ribosomske DNK (LSU, eng. *large subunit*) te analiza slijeda nukleotida odabranih lokusa pomoću kojih će se ustanoviti i opisati raznolikosti genetičke populacije *M. pachydermatis* izolirane iz smeđeg medvjeda na području Republike Hrvatske.

2. PREGLED LITERATURE

Gljivice roda *Malassezia* spadaju u koljeno *Basidiomycota*, potkoljeno *Ustilaginomycotina*, razred *Exobasidomycetes*, red *Malasseziales*, porodicu *Malasseziaceae* (GAITANIS i sur., 2012.). Do danas je poznato ukupno četrnaest vrsta *Malassezia* sp. od kojih su neke izolirane isključivo sa čovjeka, neke sa životinja, dok su neke nađene i kod čovjeka i kod životinja (CABAÑES i sur., 2011.; GAITANIS i sur., 2012.). *M. furfur* (BAILLON, 1889.), *M. pachydermatis* (WEIDMAN, 1925.), *M. sympodialis* (SIMMONS i GUÉHO, 1990.), *M. globosa*, *M. obtusa*, *M. slooffiae*, *M. restricta* (GUÉHO i sur., 1996.) izolirane su iz životinja i ljudi; *M. dermatis* (SUGITA i sur., 2002.), *M. japonica* (SUGITA i sur., 2003.), *M. yamatoensis* (SUGITA i sur., 2004.) izolirane su isključivo iz ljudi; dok su *M. nana* (HIRAI i sur., 2004.), *M. caprae*, *M. equina* (CABAÑES i sur., 2007.) i *M. cuniculi* (CABAÑES i sur., 2011.) izolirane samo iz životinja.

Svim pripadnicima gljivice roda *Malassezia* osim *M. pachydermatis* potrebne su nezasićene masne kiseline za njihov metabolizam i rast pa se nazivaju lipofilnim kvascima. Naime, od sveukupno do danas identificiranih četrnaest vrsta samo će *M. pachydermatis* rasti i na uobičajenoj hranjivoj podlozi za uzgoj kvasaca. Međutim, ustanovljeno je da i unutar *M. pachydermatis* vrste postoje sojevi koje karakteriziraju sporiji rast i sitnije kolonije, što ipak ukazuje na njihovu potrebu za nezasićenim masnim kiselinama. (AHMAN i sur., 2007.; TERAMOTO i sur., 2015.).

O sistematici, genetici, epidemiologiji i ekologiji gljivica iz roda *Malassezia* istraženo je i objavljeno malo podataka (CAFARCHIA i sur., 2007.). Kao razlog tome navodi se njihova otežana izolacija, identifikacija te specifična građa (GEMMER i sur., 2002.). Gljivice ovoga roda karakterizira debela, višeslojna, a time i vrlo otporna stanična stijenka. Kolonije su im malene, žućkasto-krem boje, glatke ili blago naborane te okruglog, ovalnog oblika ili oblika boce (GUÉHO i sur., 1996.). Za njihov rast potrebno je osigurati posebne uvjete, pa tako GUILLOT i sur. (2010.) navode da je za uspješan uzgoj navedene gljivice potrebno pripremiti svježju hranjivu podlogu (koja u svome sastavu sadrži izvore nezasićenih masnih kiselina neophodnih za rast vrsta *Malassezia* ovisnih o mastima) optimalnog pH (4-8, najčešće 6), osigurati dovoljnu količinu vlage te temperaturu od 30 °C do 37 °C, ovisno o vrsti koju se želi izolirati u čistoj kulturi. Također, navode posebne podloge s dodatkom nezasićenih masnih kiselina, poput Dixon agara, modificiranog

Dixon agara te Leeming i Notman agara, kao hranjive podloge pogodne za uzgoj tih gljivica. Navedene podloge sadrže različite koncentracije oleinske kiseline, glicerola, Tween-a 40 i 60, punomasnog mlijeka i neke druge supstance koje predstavljaju izvore nezasićenih masnih kiselina neophodnih za rast vrsta ovisnih o mastima.

Fenotipska karakterizacija svih do sada poznatih vrsta *Malassezia* provodi se na temelju njihovih fizioloških i biokemijskih svojstava. Testovi koji se provode u tu svrhu su: sposobnost rasta na Sabouraud dekstroza agaru pri temperaturi od 32 °C za razlikovanje vrste *M. pachydermatis* od ostalih vrsta, modificiranom Dixon agaru pri temperaturama 32 °C, 37 °C i 40 °C, "Tween" testu u svrhu određivanja sposobnosti iskorištavanja detergenta Tween-a 20, 40, 60 i 80, "Cremophor EL" (za međusobno razlikovanje vrsta ovisnih o masnim tvarima) te prisustvo ili odsustvo reakcija katalaze i beta glukozidaze. Prema dobivenim rezultatima navedenih testova određuje se pripadnost određenoj vrsti (GUÉHO i sur., 1996.; GAITANIS i sur., 2012.).

Razvoj i primjena različitih molekularnih metoda omogućila je otkrivanje, sistematizaciju i opisivanje novih vrsta gljivice *Malassezia* te istraživanja i razumijevanje njihove epidemiologije i patobiologije (GUILLOT i GUÉHO, 1995.). Dobiveni rezultati usmjerili su daljnja istraživanja ovoga roda gljivica u smjeru ispitivanja mehanizama prilagodbe određene vrste na određenog domaćina i geografsko područje te bolje razumijevanje njihovih bioloških procesa, različitosti alergena te uloga u patogenezi nastanka bolesti (GUÉHO i sur., 1996.). Podaci o genomu omogućuju selekciju genskih markera za razvoj multilokusnog tipiziranja sekvenci (MLST shema) različitih vrsta gljivice *Malassezia* (GUILLOT i sur., 2010.). GAITANIS i sur. (2012.) navode da bi komparativna patogenomika omogućila bolje razumijevanje regulacije kodirajućih gena, tj. regulacije ekspresivnih gena koji su uključeni u patološke procese, te bi time doprinijela otkriću i razvoju novih lijekova za kontrolu i liječenje bolesti.

Vrsta *M. pachydermatis* najčešće je izolirana i opisana iz pasa i mačaka, kod kojih može uzrokovati kronični dermatitis te upalu zvukovoda (AIZAWA i sur., 2001.). Izolati iz divljih životinja uglavnom su potjecali iz životinja držanih u zatočeništvu (KUTTIN i MÜLLER, 1994.; BAUWENS i sur., 1996.; COUTINHO i sur., 2006.). GUILLOT i sur. (2010.) sistematizirano su prikazali dosadašnju učestalost izolacije *M. pachydermatis* iz različitih divljih životinja, poput vuka, kojota, lisice, tvora, morskog lava, slona, nosoroga, šišmiša, dikobraza, velikog mravojeda, vombata, medvjeda te različitih vrsta ptica. SALKIN i sur. (1978.) opisali su prvi slučaj izolacije *M. pachydermatis* izolirane s kože

crnog medvjeda (*Ursus americanus*) s kliničkom slikom dermatitisa. KUTTIN i MÜLLER (1994.) navode u svojem istraživanju mikološke flore različitih životinja u zoološkom vrtu (Njemačka) izolate *M. pachydermatis* iz obrisaka uha smeđeg medvjeda. Izolate spomenute gljivice s kože medvjeda u svojim radovima također navode KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ i sur. (1987.) te GUILLOT i sur. (1994.).

Malobrojni objavljeni radovi koji opisuju izolate *Malassezia sp.* dobivenih s kože divljih životinja, osobito medvjeda, ukazuju na teško uočavanje kliničke slike te uzorkovanje, zahtjevnu i skupu manipulaciju divljim životinjama te kratak vremenski period za uspješno naciepljivanje uzetih uzoraka. Smatra se da je najveća mogućnost uspješne izolacije i laboratorijskog uzgoja ako se uzorak naciepi unutar dva sata od uzorkovanja. Saznanja o genetičkoj raznolikosti *M. pachydermatis*, kao što je u uvodu već prije navedeno, važna su za razumijevanje njihove epidemiologije te uloge u patogenezi različitih dermatoloških poremećaja u domaćih i divljih životinja. Genetička i epidemiološka istraživanja do danas su najviše rađena na psima, koji predstavljaju najzastupljeniju vrstu životinja kod koje *M. pachydermatis* uzrokuje zdravstvene probleme (CAFARCHIA i sur., 2007.; TERAMOTO i sur., 2015.).

U svrhu molekularne identifikacije specifičnih vrsta kvasaca *M. pachydermatis*, najčešće se umnožavaju specifične regije DNK sačuvanih sljedova nukleotida podjedinica rRNK ili njihovih intergenskih regija (razmaknica), koje su vrlo specifične za pojedinu vrstu pomoću reakcije lančane reakcije polimerazom. Za navedeno umnožavanje specifičnog odsječka DNK CAFARCHIA i sur. (2007.) objavili su rezultate analize sekvenci tri različita genetička biljega: velike podjedinice ribosomske DNK (LSU), unutrašnju razmaknicu (ITS1) i gen za sintezu hitina (CHS2) *M. pachydermatis* izolirane iz pasa te su ustanovili tri različite varijacije u sekvencama (AL, BL i CL) za ciljnu regiju LSU te četiri (AI, BI, C1I i C2I) za ciljnu regiju ITS1.

Iz svega navedenoga može se zaključiti da do danas nema objavljenih literaturnih podataka o ispitivanju genetičke raznolikosti populacije *M. pachydermatis* u smeđih medvjeda, kako u Hrvatskoj, tako i u svijetu.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Uzorci

Istraživanje se provelo na dvadeset arhiviranih kultura izolirane gljivice *M. pachydermatis* u posjedu Zavoda za biologiju Veterinarskog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu, koji su sakupljeni tijekom rutinskog uzorkovanja koje se obavljalo za vrijeme sezone odstrela medvjeda od ožujka do svibnja i od rujna do prosinca 2014. godine, a u sklopu provođenja lovno gospodarske osnove u Republici Hrvatskoj. Navedena gljivica izolirana je iz obrisaka lijevog i desnog slušnog kanala te perianalnog područja smeđeg medvjeda.

3.2. Uzgoj gljivice *M. pachydermatis*

Izolati gljivice *M. pachydermatis* pohranjeni u zamrzivaču odmrznuti su na sobnoj temperaturi te su nacijepljeni na prethodno pripremljene hranjive podloge SAA i mDIXON agar, koje su pogodne za rast navedene vrste. Hranjiva podloga SAA pripremljena je prema uputama proizvođača (Bio-Rad, SAD), a hranjiva podloga mDixon (Tablica 1) prema objavljenoj recepturi (GUÉHO-KELLERMANN i sur., 2010.). Pripremljene hranjive podloge sterilizirane su u autoklavu pri temperaturi od 115 °C u trajanju od 15 minuta i tlaku od $2,5 \times 10^5$ Pa. Izolati *M. pachydermatis* nacijepljeni su na pripremljene hranjive podloge te su inkubirani na temperaturi od 37 °C u trajanju od 3 dana.

Tablica 1. Kemijski sastav hranjivih podloga SAA i mDixon.

SAA	mDixon
15 g agara	15 g agara
10 g bakteriološkog peptona	36 g ekstrakta slada
20 g glukoze	10 g bakteriološkog peptona
0,5 g kloramfenikola	20 g dehidrirane volove žući
0,5 g cikloheksimida	10 mL "Tween 40"
dopuniti do 1 L demineraliziranom vodom	2 mL glicerola
podesiti pH na 6,0	2 g oleinske kiseline
	0,5 g kloramfenikola
	0,5 g cikloheksimida
	dopuniti do 1 L demineraliziranom vodom
	podesiti pH na 6,0

3.3. Izolacija DNK iz kulture gljivice *M. pachydermatis*

Za izolaciju DNK korišten je komercijalno dostupan kit "PureLink™ Genomic DNA Mini Kit" (Invitrogen, SAD). Protokol za izolaciju DNK malo je izmijenjen u odnosu na upute proizvođača kompleta i ovdje je u cijelosti opisan. Za izolaciju DNK po potrebi je korišten kabinet za sterilan rad te sterilan pribor kako bismo mogućnost kontaminacije uzoraka smanjili na minimum. Prema uputi proizvođača pripremljen je svježi pufer za zimolijazu (sorbitol (1 M), natrijev EDTA (10 mM)) u kojeg je naknadno prilikom svake izolacije dodan beta merkaptotanol. Direktno s krute hranjive podloge sterilnom ezom pažljivo je sastrugana biomasa te prenesena u označene Eppendorf epruvete (Eppendorf, Njemačka). Količina biomase izvagana je za svaki pojedinačni uzorak.

Optimizacija prinosa DNK ispitana je u prvom eksperimentu na dva različita uzorka i to variranjem biomase od 15 mg, 30 mg i 60 mg. Nakon toga se vodilo računa da težina pojedinog uzorka ne prelazi 30 mg. U tako pripremljene uzorke dodano je po 500 μ L pufera za zimolijazu te 0,5 μ L (14 mM) beta merkptoetanol. Kolonije su resuspendirane kratkim miješanjem na tresilici "Reax top" (Hetdolph, Njemačka) te je u svaki uzorak dodano 25 μ L (15 U) enzima zimolijaze (Sigma-Aldrich, SAD) i 10 μ L (5 U) enzima litikaze (Sigma-Aldrich, SAD). Uzorci su nakon toga stavljeni u zagrijanu tresilicu "Thermomixer comfort" (Eppendorf, Njemačka) na inkubaciju pri 37 °C u trajanju od 1,5 h u svrhu razgradnje stanične stijenke i stvaranja sferoplasta. Nakon inkubacije uzorci su centrifugirani u "Centrifuge 5415R" (Eppendorf, Njemačka) u trajanju od 10 minuta na 3000 x g pri sobnoj temperaturi kako bi se sferoplasti istaložili na dno Eppendorf epruveta. Nakon toga supernatant je odvojen, a sferoplasti su resuspendirani u 180 μ L "PureLink™ Genomic Digestion Buffer" (Invitrogen, SAD) te je dodano 20 μ L proteinaze K (Invitrogen, SAD). Svaki je uzorak kratko promiješan na tresilici te stavljen u zagrijanu tresilicu na 55 °C u trajanju od 45 minuta. Po završetku inkubacije u svaki je uzorak dodano po 20 μ L RNAze A (Invitrogen, SAD), kratko je promiješan na tresilici te ostavljen na sobnoj temperaturi u trajanju od 3 do 4 minute. Zatim je u svaki uzorak dodano 200 μ L "PureLink™ Genomic Lysis/Binding Buffer" (Invitrogen, SAD) te je nakon kratkog miješanja na tresilici u svaki dodano po 200 μ L 96-100 % etanola. Uzorci su promiješani na tresilici u trajanju od 5 sekundi kako bi dobili homogenu otopinu, nakon čega je tako pripremljen stanični lizat nanesen na kolonice za vezanje i ispiranje DNK (Invitrogen, SAD). Kolonice su centrifugirane u trajanju od 2 minute na 10 000 x g pri sobnoj temperaturi te su nakon toga prebačene u čiste sabirne tubice. Svaka kolonica isprana je sa 500 μ L "Wash Buffer 1" (Invitrogen, SAD), nakon čega su kolonice ponovno centrifugirane u trajanju od 2 minute na 10 000 x g pri sobnoj temperaturi. Kolonice su ponovno prebačene u čiste sabirne tubice te je dodano po 500 μ L "Wash Buffer 2" (Invitrogen, SAD). Svaki uzorak centrifugiran je u trajanju od 3 minute na maksimalnoj brzini stolne Eppendorf centrifuge (16 000 x g) pri sobnoj temperaturi. Pripremljene su i označene sterilne Eppendorf epruvete od 1,5 mL u koje su po završetku centrifugiranja prebačene kolonice. U svaku kolonicu dodano je po 50 μ L "PureLink™ Elution Buffer" (Invitrogen, SAD) te su ostavljene na sobnoj temperaturi u trajanju od 10 minuta. Nakon toga kolonice su centrifugirane u trajanju od 1 minute na maksimalnoj brzini centrifuge pri sobnoj temperaturi. Taj je postupak ponovljen kako bismo dobili veći prinos DNK. U

drugo eluciji dodano je po 100 μL "PureLink™ Elution Buffer" (Invitrogen, SAD) te su kolonice centrifugirane u trajanju od 1,5 minute na maksimalnoj brzini pri sobnoj temperaturi.

Nakon toga su svi eluati pohranjeni u zamrzivač na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Koncentracija izolirane DNK po uzorku provjerena je na "BioDrop μLITE " uređaju (BioDrop, Engleska) te je elektroforezom potvrđena uspješnost izolacije genomske DNK nakon provedenog izolacijskog postupka.

3.4. Lančana reakcija polimerazom (PCR)

Nakon izolacije DNK pripremljene su reakcijske smjese za lančanu reakciju polimerazom (Tablica 2 i 4) ukupnog volumena 25 μL . Zajedno s uzorcima svaki su put rađene pozitivna i negativna kontrola reakcije. Pozitivnu kontrolu činio je odabrani uzorak provjerenog genotipa, a negativnoj je kontroli umjesto uzorka DNK dodano 5 μL vode. Reakcija se odvijala u PCR Eppendorf epruveticama volumena 0,2 mL (Eppendorf, Njemačka) u PCR uređaju "Progene PCR Thermal Cycler" (Techne, Engleska) prema određenim temperaturama za svaki od odabranih genetičkih biljega (Tablica 3 i 5).

Za umnažanje ciljne regije ITS1 (~282 pb) korištene su sintetizirane početnice 18SF1 i 5.8SR1 sljedećeg redoslijeda nukleotida: kod prednje (18SF1) 5'-AGGTTTCCGTAGGTGAACCT-3' i kod stražnje (5.8SR1) 5'-TTCGCTGCGTTCTTCATCGA-3' (CAFARCHIA i sur., 2007.).

Za umnažanje ciljne regije LSU (~640 pb) korištene su sintetizirane početnice F63 i LR3 sljedećeg redoslijeda nukleotida: kod prednje (F63) 5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3' i kod stražnje (LR3) 5'-GGTCCGTGTTTCAAGACG-3' (CAFARCHIA i sur., 2007.).

Tablica 2. Sastav ukupne reakcijske smjese za umnažanje ciljnog odsječka DNK lančanom reakcijom polimerazom za genetički biljeg ITS1.

Sastojak	Volumen
sterilizirana deionizirana H ₂ O	5,5 µL
prednja specifična početnica (18SF1)	1 µL
stražnja specifična početnica (5.8SR1)	1 µL
EmeraldAmp MAX PCR Master Mix	12,5 µL
uzorak DNK	5 µL
ukupni volumen reakcijske smjese	25 µL

Tablica 3. Uvjeti provođenja lančane reakcije polimerazom (PCR program za genetički biljeg ITS1).

	Temperatura	Vrijeme	Broj ciklusa
Aktivacija polimeraze i početna denaturacija	94 °C	12 min	1
Denaturacija kalupa	94 °C	30 s	
Prihvatanje početnica	60 °C	15 s	30
Produljenje lanaca	72 °C	15 s	
Završno produljenje	72 °C	7 min	1
Hlađenje	4 °C		

Tablica 4. Sastav ukupne reakcijske smjese za umnažanje ciljnog odsječka DNK lančanom reakcijom polimerazom za genetički biljeg LSU.

Sastojak	Volumen
sterilizirana deionizirana H ₂ O	3,5 µL
prednja specifična početnica (F63)	2 µL
stražnja specifična početnica (LR3)	2 µL
EmeraldAmp MAX PCR Master Mix	12,5 µL
uzorak DNK	5 µL
ukupni volumen reakcijske smjese	25 µL

Tablica 5. Uvjeti provođenja lančane reakcije polimerazom (PCR program za genetički biljeg LSU).

	Temperatura	Vrijeme	Broj ciklusa
Aktivacija polimeraze i početna denaturacija	94 °C	12 min	1
Denaturacija kalupa	94 °C	30 s	
Prihvatanje početnica	55 °C	1 min	30
Produljenje lanaca	72 °C	1 min	
Završno produljenje	72 °C	7 min	1
Hlađenje	4 °C		

Dobiveni PCR proizvodi analizirani su elektroforezom te je veličina umnoženih ciljnih odsječaka DNK uspoređena s objavljenim veličinama (CAFARCHIA i sur., 2007.) za oba korištena genetička biljega.

3.5. Elektroforeza

Dobiveni izolati genomske DNK te PCR proizvodi analizirani su elektroforezom u agaroznom gelu. Za elektroforezu pripremljen je 1 % agarozni gel na sljedeći način: u Erlenmayerovoj tikvici otopljeno je 1,2 g agaroze u 120 mL pufera 1 x TAE s etidijevim bromidom (EtBr) u koncentraciji od 5 µg/mL te je zagrijan u mikrovalnoj pećnici do vrenja. Nakon postupnog hlađenja gel je izliven u pripremljeni kalup s češljicom koji služi za stvaranje jažica. Nakon dvadesetak minuta, kada se gel ohladio, uklonjen je češljic te je kalup s gelom uronjen u sustav za horizontalnu elektroforezu “Mini Sub Cell GT” (Bio-Rad, SAD).

U prvu jažicu nanijeto je 2 µL komercijalno dostupnog biljega “Mass Ruler DNK Ladder Mix” (Thermo Scientific™, SAD), a u ostale po 5 µL izolata DNK prethodno pomiješanih s po 2 µL boje za nanošenje (engl. *loading dye*). Za elektroforezu PCR proizvoda također je korišten 1 % agarozni gel pripremljen na prije opisan način. U prvu jažicu nanijeto je 2 µL komercijalno dostupnog biljega “Mass Ruler DNK Ladder Mix” (Thermo Scientific™, SAD), a u ostale po 3 µL PCR proizvoda.

Elektroforeza je u oba slučaja provedena na sobnoj temperaturi u trajanju od 40 minuta pri naponu od 65 V. Uspješnost izolacije DNK te uspješnost umnažanja ulomaka DNK provjerena je na uređaju za vizualizaciju i snimanje gelova “G-BOX” (Syngene, Engleska) te analizirana pomoću računalnog programa “GeneSnap” (Syngene, Engleska).

3.6. Pročišćavanje PCR proizvoda

Dobiveni PCR proizvodi pročišćeni su od zaostalih početnica, nukleotida i drugih reagensa koji bi mogli ometati reakciju sekvenciranja. Za pročišćavanje PCR proizvoda korišten je komercijalno dostupan kit “EZ-10 Spin Column PCR Products Purification Kit” (Bio Basic inc., Kanada). Navedena metoda zasniva se na vezanju do 10 µg fragmenata DNK za silikonsku membranu u koloni uz prisustvo specijaliziranih pufera. Prema uputama proizvođača pripremljeni su potrebni reagensi (“Buffer B3”, “Wash Solution”, “Elution Buffer”). PCR proizvodi prebačeni su u Eppendorf epruvete volumena 1,5 mL te je dodano 5 x (volumena PCR proizvoda) reagensa “Buffer B3”. Dobivena otopina prebačena je u “EZ-10” kolonice, ostavljena na sobnoj temperaturi u trajanju od 2 minute te centrifugirana na 8000 x g u trajanju od 30 sekundi. Uklonjena je

tekućina koja se procijedila te je ista kolona vraćena u sabirnu tubicu u koju je dodano 750 μ L reagensa “Wash Solution” i centrifugirana na 9000 x g u trajanju od 30 sekundi. Postupak ispiranja još je jednom ponovljen te centrifugiran na 9000 x g u trajanju od 1 minute. Kolonice su prebačene u sterilne i označene Eppendorf epruvete te je u njih dodano po 25 μ L “Elution Buffer”. Nadalje, inkubirane su na sobnoj temperaturi u trajanju od 2 minute te centrifugirane na 9000 x g u trajanju od 1 minute. Nakon centrifugiranja kolonice su odbačene, a pročišćeni PCR proizvodi zadržani su u sterilnim Eppendorf epruvetama te spremljeni u zamrzivač na -20 °C.

Po završetku pročišćavanja svi PCR proizvodi poslani su u tvrtku “Macrogen” (Amsterdam, Nizozemska) na sekvenciranje.

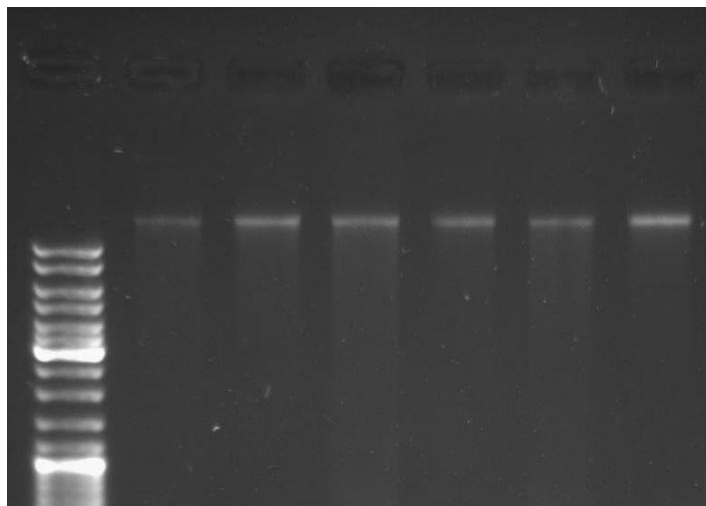
4. REZULTATI

Uzgojem gljivice *M. pachydermatis* (Slika 1) na hranjivim podlogama SAA i mDixon, postupkom opisanim u Materijalima i metodama, uočen je njihov podjednak rast, tj. dostatna količina potrebne biomase za izolaciju DNK.



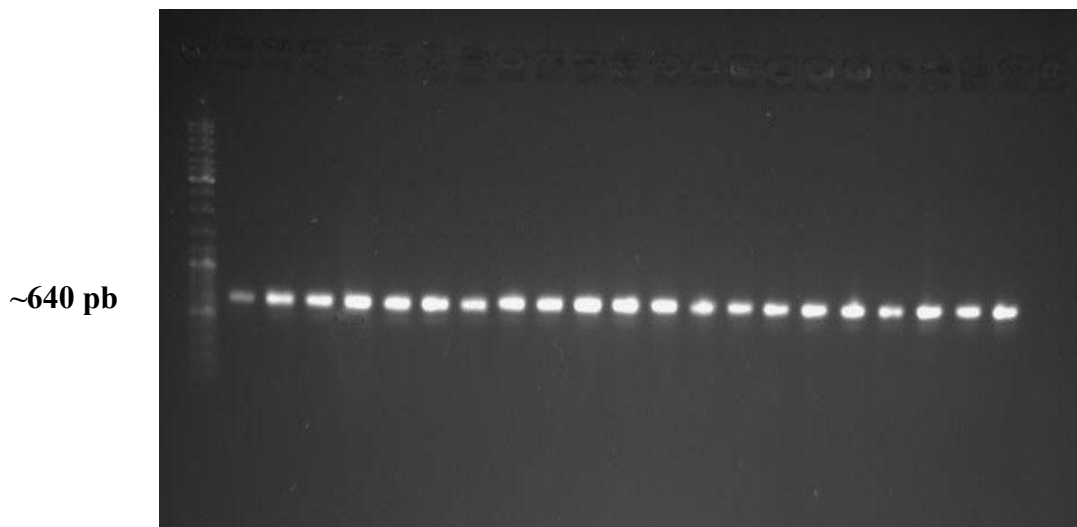
Slika 1. Kolonije gljivice *M. pachydermatis* na hranjivim podlogama SAA i mDixon.

U postupku izolacije DNK ispitana je uspješnost izolacije s različitim količinama biomase. Eksperimenti su provedeni s količinom biomase u rasponu od 15 do 60 mg, kao što je opisano u poglavlju Materijali i metode. Prema rezultatima dobivenim mjerenjem koncentracija DNK te elektroforezom (Slika 2), utvrđeno je da optimalna količina biomase iznosi 30 mg.



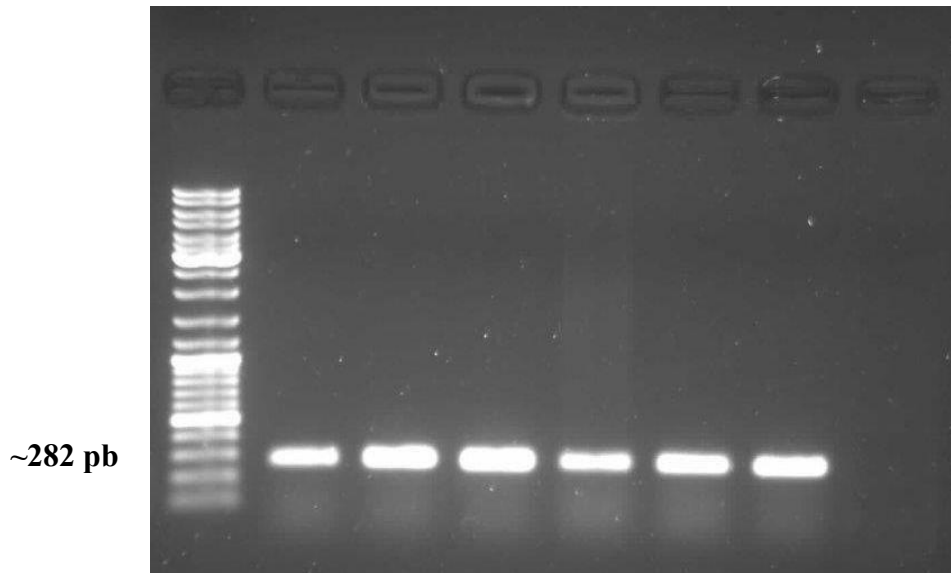
Slika 2. Prikaz izolirane genomske DNK *M. pachydermatis* iz smeđeg medvjeda (*Ursus arctos*).

Prema opisanoj metodi (poglavlje Materijali i metode) umnožena je ciljna regija LSU iz izolata DNK *M. pachydermatis* te su dobiveni očekivani odsječci DNK veličine ~640 pb (Slika 3) koji se podudaraju s prije objavljenim podacima za ciljnu regiju LSU (CAFARCHIA, 2007).



Slika 3. Prikaz umnoženih odsječaka DNK molekula ciljne regije LSU pomoću PCR metode.

Analizom i usporedbom umnoženih odsječaka DNK ciljne regije ITS1 (Slika 4) ustanovili smo da oni svojom veličinom od ~282 pb odgovaraju objavljenim ITS1 ciljne regije (CAFARCHIA i sur., 2007.).



Slika 4. Prikaz umnoženih odsječaka DNK molekula ciljne regije ITS1 pomoću PCR metode.

Specifični fragmenti DNK umnoženi metodom PCR nakon pročišćavanja poslani su na sekvenciranje u tvrtku “Macrogen”, Nizozemska.

Sekvence su sravnjene pomoću “BioEdit” programa i uspoređene s objavljenim sekvencama dobivenim iz gljivice *M. pachydermatis*, uzoraka izoliranih iz pasa (CAFARCHIA i sur., 2007.) koje su na Slikama 5. i 6. označene žutom bojom.

Slika 5. prikazuje sravnjenje dvadeset ITS1 sekvenci koje su dobivene umnožavanjem specifičnog odsječka DNK. Promjene u slijedu nukleotida u vidu delecija ili insercija označene su crvenim strelicama. Kao što se vidi na Slici 5., najviše razlika među sekvencama ITS1 regija gljivice *M. pachydermatis* iz medvjeda i pasa uočavaju se unutar prvih 120 nukleotida. Uglavnom se radi o delecijama ili insercijama 1-3 nukleotida. Također se unutar 20 analiziranih ITS1 sekvenci uočava jedna specifična podskupina 23_SF1 do 26_SF1 i 29_SF1, koje zadržavaju inserciju od jednog nukleotida na poziciji 34. i poziciji 74.

Na Slici 6. prikazano je sravnjenje dvadeset LSU sekvenci (fragment gena za veliku podjedinicu 26S rRNA). Uočene promjene u slijedu nukleotida također su označene crvenim strelicama. Kao što se vidi na slici, uočavaju se samo manje insercije (1 nukleotid), pozicija 16 kod četiri sekvence i jedna insercija na poziciji 27 kod četiri sekvence. Ostale sekvence uglavnom zadržavaju najveću sličnost sa sekvencom LSU gi|117979186|. Jedina supstitucija baza, koja čini se stvara specifičnu podskupinu, jest zamjena nukleotida T u G na poziciji 567.

		490	500	510	520	530	540	550	560	
13	LR3	GTCTCGAGATTACAACGCGGACACCGAAGGTGCCAGCTTTCAAATTTGAGCTCTTCCCGCTTCGCTCGCCGTTACTAGGGGAATCCT								
15	LR3	GTCTCGAGATTACAACGCGGACACCGAAGGTGCCAGCTTTCAAATTTGAGCTCTTCCCGCTTCGCTCGCCGTTACTAGGGGAATCCT								
19	LR3	GTCTCGAGATTACAACGCGGACACCGAAGGTGCCAGCTTTCAAATTTGAGCTCTTCCCGCTTCGCTCGCCGTTACTAGGGGAATCCT								
26	LR3	GTCTCGAGATTACAACGCGGACACCGAAGGTGCCAGCTTTCAAATTTGAGCTCTTCCCGCTTCGCTCGCCGTTACTAGGGGAATCCT								
30	LR3	GTCTCGAGATTACAACGCGGACACCGAAGGTGCCAGCTTTCAAATTTGAGCTCTTCCCGCTTCGCTCGCCGTTACTAGGGGAATCCT								
12	LR3	GTCTCGAGATTACAACGCGGACACCGAAGGTGCCAGCTTTCAAATTTGAGCTCTTCCCGCTTCGCTCGCCGTTACTAGGGGAATCCT								
14	LR3	GTCTCGAGATTACAACGCGGACACCGAAGGTGCCAGCTTTCAAATTTGAGCTCTTCCCGCTTCGCTCGCCGTTACTAGGGGAATCCT								
20	LR3	GTCTCGAGATTACAACGCGGACACCGAAGGTGCCAGCTTTCAAATTTGAGCTCTTCCCGCTTCGCTCGCCGTTACTAGGGGAATCCT								
23	LR3	GTCTCGAGATTACAACGCGGACACCGAAGGTGCCAGCTTTCAAATTTGAGCTCTTCCCGCTTCGCTCGCCGTTACTAGGGGAATCCT								
28	LR3	GTCTCGAGATTACAACGCGGACACCGAAGGTGCCAGCTTTCAAATTTGAGCTCTTCCCGCTTCGCTCGCCGTTACTAGGGGAATCCT								
3	LR3	GTCTCGAGATTACAACGCGGACACCGAAGGTGCCAGCTTTCAAATTTGAGCTCTTCCCGCTTCGCTCGCCGTTACTAGGGGAATCCT								
4	LR3	GTCTCGAGATTACAACGCGGACACCGAAGGTGCCAGCTTTCAAATTTGAGCTCTTCCCGCTTCGCTCGCCGTTACTAGGGGAATCCT								
5	LR3	GTCTCGAGATTACAACGCGGACACCGAAGGTGCCAGCTTTCAAATTTGAGCTCTTCCCGCTTCGCTCGCCGTTACTAGGGGAATCCT								
29	LR3	GTCTCGAGATTACAACGCGGACACCGAAGGTGCCAGCTTTCAAATTTGAGCTCTTCCCGCTTCGCTCGCCGTTACTAGGGGAATCCT								
1	LR3	GTCTCGAGATTACAACGCGGACACCGAAGGTGCCAGCTTTCAAATTTGAGCTCTTCCCGCTTCGCTCGCCGTTACTAGGGGAATCCT								
2	LR3	GTCTCGAGATTACAACGCGGACACCGAAGGTGCCAGCTTTCAAATTTGAGCTCTTCCCGCTTCGCTCGCCGTTACTAGGGGAATCCT								
7	LR3	GTCTCGAGATTACAACGCGGACACCGAAGGTGCCAGCTTTCAAATTTGAGCTCTTCCCGCTTCGCTCGCCGTTACTAGGGGAATCCG								
6	LR3	GTCTCGAGATTACAACGCGGACACCGAAGGTGCCAGCTTTCAAATTTGAGCTCTTCCCGCTTCGCTCGCCGTTACTAGGGGAATCCG								
8	LR3	GTCTCGAGATTACAACGCGGACACCGAAGGTGCCAGCTTTCAAATTTGAGCTCTTCCCGCTTCGCTCGCCGTTACTAGGGGAATCCG								
9	LR3	GTCTCGAGATTACAACGCGGACACCGAAGGTGCCAGCTTTCAAATTTGAGCTCTTCCCGCTTCGCTCGCCGTTACTAGGGGAATCCG								
gi	117979188	GTCTCGAGATTACAACGCGGACACCGAAGGTGCCAGCTTTCAAATTTGAGCTCTTCCCGCTTCGCTCGCCGTTACTAGGGGAATCCT								
gi	117979187	GTCTCGAGATTACAACGCGGACACCGAAGGTGCCAGCTTTCAAATTTGAGCTCTTCCCGCTTCGCTCGCCGTTACTAGGGGAATCCT								
gi	117979186	GTCTCGAGATTACAACGCGGACACCGAAGGTGCCAGCTTTCAAATTTGAGCTCTTCCCGCTTCGCTCGCCGTTACTAGGGGAATCCT								



Slika 6. Svrnjenje DNK fragmenata gena za veliku podjedinicu 26S rRNK (LSU) gljivice *Malassezia pachydermatis*.

5. RASPRAVA

Za potrebe ovog istraživanja analizirano je dvadeset arhiviranih kultura gljivice *M. pachydermatis* izoliranih iz smeđeg medvjeda na području Republike Hrvatske. Navedena gljivica izolirana je iz obrisaka lijevog i desnog slušnog kanala te perianalnog područja u 98 % slučajeva. Visok postotak izoliranih gljivica ukazuje na njihovu sklonost da koloniziraju navedena područja tijela smeđeg medvjeda. U prije objavljenom radu koji opisuje izolate *M. pachydermatis* s kože pasa, MASUDA i sur. (2000.) navode da je za njihov rast pogodno tamno, vlažno područje bogato cerumenom te umjereno strujanje zraka. Uz navedene čimbenike MILLER i sur. (2013.) navode hormonalne poremećaje, poremećaje u keratinizaciji, pojačano lučenje masti, bakterijske infekcije te alergijski kontaktni dermatitis (preosjetljivost tipa 4) kao dodatne uvjete koji mogu potaknuti kolonizaciju te pojačano razmnožavanje i posljedično infekciju ovom gljivicom.

Dobiveni postotak izoliranih gljivica podudara se s podacima o njihovoj prilagodbi na određeni dio tijela domaćina (CAFARCHIA i OTRANTO, 2008.). Naime, autori navode podjednak broj izolacija i identifikacija *M. pachydermatis* iz zvukovoda u zdravih, kao i u oboljelih životinja (TERAMOTO i sur., 2015.; AHMAN i sur., 2007.). UCHIDA i sur. (1992.) navode da je inokulacija velikog broja kolonija *M. pachydermatis* u zvukovode zdravih pasa rezultirala razvojem kliničke slike upale zvukovoda. Iz navedenog se može zaključiti kako na razvoj infekcija, uz prije spomenute čimbenike, utječe i veličina populacije navedene vrste. Nadalje, usporedbom kolonija *M. pachydermatis* uzgojenih na hranjivoj podlozi SAA te hranjivoj podlozi mDixon koja je korištena u prije objavljenim znanstvenim radovima (NAKAGAKI i sur., 2000.; AHMAN i sur., 2007.; CAFARCHIA i sur. 2007.) nisu uočene značajne razlike u njihovom rastu, količini i kvaliteti njihove biomase, kao ni u koncentraciji izolirane DNK. Navedeno potvrđuje da za rast *M. pachydermatis* nisu neophodni izvori nezasićenih masnih kiselina (HORT i MAYSER, 2011.).

Na osnovu anamnestičkih podataka, kliničke slike te fenotipske analize uzgojenih gljivica iz roda *Malassezia*, može se postaviti temeljna sumnja na infekciju uzrokovanu vrstama ovog roda, no za preciznu dijagnostiku i stjecanje uvida u patogenezu pojedinih vrsta neophodna je primjena molekularnih metoda (GUPTA i sur., 2004b.; SUGITA i sur.,

2005.). *M. pachydermatis* ima relativno malen genom veličine 6,7 - 9,3 Mb te samo 6 - 7 kromosoma (BOEKHOUT i BOSBOOM, 1994.; BOEKHOUT i sur., 1998.). U novije vrijeme analize slijeda nukleotida umnoženih specifičnih fragmenta DNK doprinijele su otkrivanju i opisivanju raznolikosti roda *Malassezia* te genetske varijacije unutar pojedine vrste (TERAMOTO i sur., 2015.).

Za ovo istraživanje odabrani su odsječci ITS1 i 26S LSU kao molekularni biljezi koji bi mogli pokazati varijacije u slijedu nukleotida unutar tih DNK regija i tako ukazati na prisutnost ili raznolikost filogenetskih podskupina unutar vrste *M. pachydermatis* (HAN i sur., 2013.). Nakon uspješnog umnožavanja ciljanih odsječaka DNK pomoću metode PCR, njihova veličina određena je razdvajanjem u gel-agarozu te usporedbom s DNK biljegom. Kao što je i prikazano na Slici 3., odsječak LSU i odgovara veličini od ~640 pb, dok umnoženi odsječak ITS odgovara veličini od ~282 pb (Slika 4). Dobiveni PCR odsječci tih odabranih genomskih regija uspoređeni su s objavljenim veličinama (CAFARCHIA i sur., 2007.) te pritom nisu utvrđena odstupanja. Također treba napomenuti kako su uvjeti primijenjeni za metodu PCR te odabrane početnice, kao i temperature sparivanja početnica, rezultirali specifičnom amplifikacijom genomske regije izolirane vrste *M. pachydermatis*, odnosno dobiveni su DNK fragmenti željene veličine (Slike 3 i 4). Nadalje, dobiveni rezultati sekvenciranja umnoženih fragmenata DNK za ITS1 i LSU regije DNK, koje se kako je već i napomenuto standardno koriste u filogenetskim analizama, ukazali su kako slijedovi nukleotida tih regija gljivica *M. pachydermatis* izoliranih iz uzoraka medvjeda pokazuju određene specifičnosti, odnosno prisutnost nekih sačuvanih podgrupa koje se reflektiraju u očuvanim nukleotidnim sljedovima tih filogenetskih biljega. Također, usporedbom sravnjenih sekvenci s objavljenim sekvencama dobivenim iz gljivice *M. pachydermatis* uzoraka izoliranih iz pasa (CAFARCHIA i sur., 2007.), jasno se uz veliku sačuvanost sljedova nukleotida (Slike 5 i 6) uočava i postojanje specifičnih razlika u obje regije. U ovom istraživanju najviše razlika među sekvencama uočeno je unutar prvih 120 nukleotida ITS1 regije u vidu delecija ili insercija 1-3 nukleotida. Osim toga, unutar dvadeset analiziranih sekvenci uočena je jedna specifična podskupina 23_SF1 do 26_SF1 i 29_SF1, koje zadržavaju inserciju od jednog nukleotida na poziciji 34. i poziciji 74. Analiza sravnjenja DNK fragmenata gena za veliku podjedinicu 26S rRNK gljivice *M. pachydermatis* te usporedba tih fragmenta s očuvanim LSU sekvencama kod gljivica izoliranih iz pasa (CAFARCHIA i sur., 2007.) pokazuju puno bolju očuvanost u odnosu na ITS1 regije, posebno ako se uzme u obzir da je dužina tih fragmenta oko tri puta veća u

odnosu na analizirane ITS1 sekvence. Uočavaju se samo manje insercije (1 nukleotid), pozicija 16 kod četiri sekvence i jedna insercija na poziciji 27 kod četiri sekvence. Ostale sekvence uglavnom zadržavaju najveću sličnost sa sekvencom LSU gi|117979186|. Jedina supstitucija baza, koja čini se stvara specifičnu podskupinu, jest zamjena nukleotida T u G na poziciji 567. Ovo istraživanje, kao i prethodna istraživanja provedena na psima i domaćim životinjama, ukazuje na postojanje više genotipova vrste *M. pachydermatis* unutar svakog od odabranih genetičkih biljega (GUILLOT i sur., 1997.; AIZAWA i sur., 2001.; CASTELLÁ i sur., 2005.). CAFARCHIA i sur. (2007.) navode tri različite varijacije u sekvencama (A_L, B_L i C_L) za ciljnu regiju LSU te četiri (A_I, B_I, C_{1I} i C_{2I}) za ciljnu regiju ITS1.

Usporedbom dobivenih rezultata s literaturnim podacima može se zaključiti da u izoliranih gljivica *M. pachydermatis* postoje određene genetičke varijacije koje bi mogle upućivati na njihovu evolucijsku prilagodbu na smeđeg medvjeda kao specifičnog domaćina. Budući da je ovo preliminarno istraživanje rađeno na svega dvadeset uzoraka, iz prikazanih rezultata jasno je kako bi te molekularne analize specifičnih filogenetskih biljega trebalo proširiti na znatno veći broj uzoraka. Tek bi s tako proširenom filogenetskom analizom mogli sagledati genetičku raznolikost gljivica *M. pachydermatis*, što bi predstavljalo prvi korak u mogućem rasvjetljavanju njihove evolucijske prilagodbe na smeđeg medvjeda.

6. ZAKLJUČCI

Prvi je put u Republici Hrvatskoj obavljeno preliminarno istraživanje, a u svrhu buduće detaljne genetičke karakterizacije gljivice *M. pachydermatis* izolirane iz obrisaka zvukovoda i perianalnog područja smeđeg medvjeda (*Ursus arctos*).

Na osnovi analize kolonija *M. pachydermatis* uzgajanih na dvije različite hranjive podloge (s i bez dodatka nezasićenih masnih kiselina), nisu uočene značajne razlike u njihovom rastu, količini i kvaliteti njihove biomase. Nadalje, usporedbom koncentracija izolirane DNK također nisu uočena značajnija odstupanja, ukazujući na mogućnost korištenja komercijalno dostupne i značajno jeftinije hranjive podloge bez dodataka nezasićenih masnih kiselina.

Ispitivanjem učinkovitosti izolacije DNK pri različitim količinama biomase u rasponu od 15 do 60 mg, najboljom se pokazala biomasa od 30 mg. Korištenjem navedene količine biomase dobivena je dostatna koncentracija genomske DNK koja je potrebna za lančanu reakciju polimerazom. Tijekom istraživanja optimizirana je navedena metoda izolacije DNK u svrhu daljnjeg nastavka istraživanja navedene tematike.

Genetički biljezi ITS1 i LSU iz gljivice *M. pachydermatis* izolirane iz uzoraka medvjeda pokazuju određene specifičnosti u svojim sljedovima nukleotida. LSU regija je u odnosu na regiju ITS1 znatno bolje očuvana.

Tu potencijalnu evolucijsku prilagodbu gljivice *M. pachydermatis* potrebno je dodatno istražiti proširenom filogenetskom analizom znatno većeg broja uzoraka.

7. LITERATURA

AHMAN, S., N. PERRINS, R. BOND (2007): Carriage of *Malassezia* spp. yeast in healthy and seborrheic Devon Rex cats. *Med. Mycol.* 45, 449-455.

AIZAWA, T., R. KANO, Y. NAKAMURA, S. WATANABE, A. HASEGWA (2001): The genetic diversity of clinical isolates of *Malassezia pachydermatis* from dogs and cats. *Med. Mycol.* 39, 329-334.

BAILLON, H. (1889): *Traité de botanique médicale cryptogamique*. Octave Doin 4th ed., Pariz, Francuska.

BAUWENS, L., C. DE VROEY, W. DE MEURICHY (1996): A case of exfoliative dermatitis in a captive southern white rhinoceros (*Ceratotherium simum simum*). *J. Zoo Wildlife Med.* 27, 271-274.

BIŠĆAN, A., I. BUDOR, Z. DOMAZETOVIĆ, K. FONTANA PUDIĆ, I. FRANCETIĆ, S. GOSPOČIĆ, M. GRUBEŠIĆ, Đ. HUBER, J. JEREMIĆ, M. MODRIĆ, M. SINDIČIĆ, M. TOMLJANOVIĆ, D. UGARKOVIĆ (2014): Akcijski plan gospodarenja smeđim medvjedom u Republici Hrvatskoj u 2014. godini. Ministarstvo regionalnog razvoja, šumarstva i vodnog gospodarstva, Uprava za lovstvo, Ministarstvo kulture, Uprava za zaštitu prirode, Zagreb.

BOEKHOUT, T., R. W. BOSBOOM (1994): Karyotyping of *Malassezia* yeasts: taxonomic and epidemiological implications. *Syst. Appl. Microbiol.* 17, 146-153.

BOEKHOUT, T., M. KAMP, E. GUÉHO (1998): Molecular typing of *Malassezia* species with PFGE and RAPD. *Med. Mycol.* 36, 365-372.

CABAÑES, F. J., B. THEELEN, G. CASTELLÁ, T. BOEKHAUT (2007): Two new lipid-dependent *Malassezia* species from domestic animals. *FEMS Yeast Res.* 7, 1064-1076.

- CABAÑES, F. J., S. VEGA, G. CASTELLÁ (2011): *Malassezia cuniculi* sp. nov., a novel yeast species isolated from rabbit skin. *Med. Mycol.* 49, 40-48.
- CAFARCHIA, C., M. STEFANIA LATROFA, G. TESTINI, A. PARISI, J. GUILLOT, R. B. GASSER, D. OTRANTO (2007): Molecular characterization of *Malassezia* isolates from dogs using three distinct genetic markers in nuclear DNA. *Mol. Cell. Probes.* 21, 229-238.
- CAFARCHIA, C., D. OTRANTO (2008): The pathogenesis of *Malassezia* yeasts. *Parassitologia.* 50, 65-67.
- CASTELLÁ, G., J. J. HERNÁNDEZ, F. J. CABAÑES (2005): Genetic typing of *Malassezia pachydermatis* from different domestic animals. *Vet. Microbiol.* 108, 291-296.
- COUTINHO, S. D., J. D. FEDULLO, S. H. CORRÊA (2006): Isolation of *Malassezia* spp. from cerumen of wild felids. *Med. Mycol.* 44, 383-387.
- DEČAK, D., A. FRKOVIĆ, M. GRUBEŠIĆ, Đ. HUBER, B. IVČEK, B. KULIĆ, D. SERTIĆ, Ž. ŠTAHAN (2005): Plan gospodarenja smeđim medvjedom u Republici Hrvatskoj. Ministarstvo poljoprivrede, šumarstva i vodnog gospodarstva, Uprava za lovstvo, Ministarstvo kulture, Uprava za zaštitu prirode, Zagreb.
- GAITANIS, G., P. MAGIATIS, M. HANTSCHKE, I. D. BASSUKAS, A. VELEGRAKI (2012): The *Malassezia* genus in skin and systemic diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* 25, 106-141.
- GEMMER, C. M., Y. M. DEANGELIS, B. THEELEN, T. BOEKHOUT, T. L. Jr. DAWSON (2002): Fast, noninvasive method of molecular detection and differentiation of *Malassezia* yeast species on human skin and application of the method to dandruff microbiology. *J. Clin. Microbiol.* 40, 3350-3357.
- GUÉHO-KELLERMANN, E., T. BOEKHOUT, D. BEGEROW (2010): Biodiversity, Phylogeny and Ultrastructure, U: *Malassezia* and the Skin: Science and Clinical Practice.

(Boekhout, T., E. Guého-Kellermann, P. Mayser, A. Velegraki, ur.). Springer, New York. str. 17-65.

GUÉHO, E., G. MIDGLEY, J. GUILLOT (1996): The genus *Malassezia* with description of four new species. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 69, 337-355.

GUILLOT, J., R. CHERMETTE, E. GUÉHO (1994): Prévalence du genre *Malassezia* chez les mammifères. *J. Mycol. Med.* 4, 72-79.

GUILLOT, J., E. GUÉHO (1995): The diversity of *Malassezia* yeasts confirmed by rRNA sequence and nuclear comparisons. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 67, 297-314.

GUILLOT, J., E. GUÉHO, G. CHÉVIER, R. CHERMETTE (1997): Epidemiological analysis of *Malassezia pachydermatis* isolates by partial sequencing of the large subunit ribosomal RNA. *Res. Vet. Sci.* 62, 22-25.

GUILLOT, J., S. HAĐINA, F. J. CABAÑES (2010): Epidemiology of *Malassezia*-Related Skin Diseases. U: *Malassezia* and the Skin: Science and Clinical Practice. (Boekhout, T., E. Guého-Kellermann, P. Mayser, A. Velegraki, ur.). Springer, New York. str. 94-120.

GUPTA, A. K., Y. KOHLI (2004a): Prevalence of *Malassezia* species on various body sites in clinically healthy subjects representing different age groups. *Med. Mycol.* 42, 35-42.

GUPTA, A. K., R. BATRA, R. BLUHM, T. BOEKHOUT, T. L. Jr. DAWSON (2004b): Skin diseases associated with *Malassezia* species. *J. Am. Acad. Dermatol.* 51, 785-798.

HAN, S. H., T. H. CHUNG, E. H. NAM, S. H. PARK, C. Y. HWANG (2013): Molecular analysis of *Malassezia pachydermatis* isolated from canine skin and ear in Korea. *Med. Mycol.* 51, 396-404.

HIRAI, A., R. KANO, K. MAKIMURA, E. R. DUARTE, J. S. HAMDAN, M. A. LACHANCE, H. YAMAGUCHI, A. HASEGAWA (2004): *Malassezia nana* sp. nov., a

novel lipid-dependent yeast species isolated from animals. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54, 623-627.

HORT, W., P. MAYSER (2011): *Malassezia* virulence determinants. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 24, 100-105.

KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, A., K. LADZIANSKÁ, S. BUCKO (1987): *Malassezia pachydermatis* in small animals. *Mykosen.* 30, 541-543.

KUTTIN, E. S., J. MÜLLER (1994): The fungal flora of zoo animals' ears. *Mycoses.* 37, 59-60.

MASUDA, A., T. SUKEGAWA, N. MIZUMOTO, H. TANI, T. MIYAMOTO, K. SASI, E. BABA (2000): Study of lipid in the ear canal in canine otitis externa with *Malassezia pachydermatis*. *J. Vet. Med. Sci.* 62, 1177-1182.

MILLER, W. H. Jr., C. E. GRIFFIN, K. L. CAMPBELL (2013): Fungal and algal skin diseases. U: Muller and Kirk's Small Animal Dermatology 7th ed. (Miller, W. H. Jr., C. E. Griffin, W. B. CAMPBELL, ur.), WB Saunders, Philadelphia, str. 223-284.

NAKAGAKI, K., K. HATA, E. IWATA, K. TAKEO (2000): *Malassezia pachydermatis* isolated from South American sea lion (*Otaria byronia*) with dermatitis. *J. Vet. Med. Sci.* 62, 901-903.

PLEŠE, V. (2008): Kako sačuvati i zaštititi smeđeg medvjeda. *Hrvatske šume.* 137, 29-32.

SALKIN, I. F., M. A. GORDON, W. B. STONE (1978): *Pityrosporum pachydermatis* in a black bear (*Ursus americanus*). *Sabouraudia.* 16, 35-38.

SIMMONS, R. B., E. GUÉHO (1990): A new species of *Malassezia*. *Mycol. Res.* 94, 1146-1149.

SUGITA, S., M. TAKASHIMA, T. SHINODA, H. SUTO, T. UNNO, R. TSUBOI, H. OGAWA, A. NISHIKAWA (2002): New yeast species, *Malassezia dermatis*, isolated from patients with atopic dermatitis. J. Clin. Microbiol. 40, 1363-1367.

SUGITA, S., M. TAKASHIMA, M. KODAMA, R. TSUBOI, A. NISHIKAWA (2003): Description of a new yeast species, *Malassezia japonica*, and its detection in patients with atopic dermatitis and healthy subjects. J. Clin. Microbiol. 41, 4695-4699.

SUGITA, S., M. TAGIMA, M. TAKASHIMA, M. AMAYA, R., TSUBOI, A. NISHIKAWA (2004): A new yeast, *Malassezia yamatoensis*, isolated from a patient with seborrheic dermatitis, and its distribution in patients and healthy subjects. Microbiol. Immunol. 48, 579-583.

SUGITA, T., K. TAKEO, K. HAMA, E. VICTUDAZO, M. TAKASHIMA, A. NISHIKAWA, J. KUCSERA, J. DOROGI, S. KOMORI, K. NAKAGAKI, A. VOLLEKOVA, E. SLAVIKOVA, V. FARKAS (2005): DNA sequence diversity of intergenic spacer I region in the non-lipid-dependent species *Malassezia pachydermatis* isolated from animals. Med. Mycol. 43, 21-26.

TERAMOTO, H., Y. KUMEDA, K. YOKOIGAWA, K. HOSOMI, S. KOZAKI, M. MUKAMOTO, T. KOHDA (2015): Genotyping and characterisation of the secretory lipolytic enzymes of *Malassezia pachydermatis* isolates collected from dogs. Vet. Rec. Open. 2:e00124.

UCHIDA, Y., M. MIZUTANI, T. KUBO, T. NAKADE, K. OTOMO (1992): Otitis externa induced with *Malassezia pachydermatis* in dogs and the efficacy of pimaricin. J. Vet. Med. Sci. 54, 611-614.

VOLK, A. V., C. E. BELYAVIN, K. VARJONEN, M. C. CADIERGEUS, K. B. STEVENS, R. BOND (2010): *Malassezia pachydermatis* and *M. nana* predominate among the cutaneous mycobiota of Sphynx cats. J. Feline Med. Surg. 12, 917-922.

WESCHE, P., R. BOND (2003): Isolation of *Malassezia pachydermatis* from the skin of

captive rhinoceroses. Vet. Rec. 153, 404-405.

WEIDMAN, F. D. (1925): Exfoliative dermatitis in the Indian rhinoceros (*Rhinoceros unicornis*), with description of a new species: *Pityrosporum pachydermatis*. Rep. Lab. Museum Comp. Pathol. Zoo Soc. 36-43.

8. SAŽETAK

Ivana Ivanković

Analiza genetičke raznolikosti gljivice *Malassezia pachydermatis* izolirane iz smeđeg medvjeda (*Ursus arctos*) na području Republike Hrvatske

Smeđi medvjed (*Ursus arctos*) najveća je kopnena zvijer koja nastanjuje područja Gorskog kotara i Like te je uvršten na popis ugroženih biljnih i životinjskih vrsta Hrvatske. Gljivica *Malassezia pachydermatis*, koja se smatra oportunističkim patogenom, uslijed određenih predisponirajućih čimbenika često uzrokuje različite patološke promjene na koži kućnih ljubimaca, ali i domaćih i divljih životinja. Do danas postoji vrlo malo podataka o prisutnosti i ulozi gljivice *M. pachydermatis* na koži medvjeda. Opći cilj ovog istraživanja bio je izolirati genomsku DNK i optimizirati izolaciju genomske DNK iz kultura *M. pachydermatis* naraslih na dvije različite hranjive podloge. Specifičan cilj bio je umnožavanje specifičnog odsječka DNK uz pomoć početnica za dva genetička biljega, ITS1 i LSU, u svrhu ustanovljavanja genetičke raznolikosti gljivice *M. pachydermatis* u smeđeg medvjeda (*Ursus arctos*) na području Republike Hrvatske. Genomska DNK izolirana je iz narasle kulture gljivice *M. pachydermatis* komercijalno dostupnim kitom, specifični odsječci DNK (ITS1 i LSU regija) umnoženi su lančanom reakcijom polimeraze te je analiziran slijed nukleotida. Na osnovu dobivenih rezultata ustanovljeno da umnoženi odsječci DNK svojom veličinom odgovaraju objavljenim veličinama ITS1 i LSU regije. Osim toga uočeno je da u analiziranim regijama postoje određene specifičnosti u slijedu nukleotida te da je LSU regija u odnosu na ITS1 znatno bolje očuvana. Navedeni preliminarni rezultati ukazuju na potencijalnu evolucijsku očuvanost koju je potrebno potvrditi analizom većeg broja uzoraka i uključivanjem dodatnih molekularnih metoda.

Ključne riječi: genetička raznolikost, *Malassezia pachydermatis*, smeđi medvjed, Republika Hrvatska

9. SUMMARY

Ivana Ivanković

A genetic diversity analysis of the brown bear (*Ursus arctos*) *Malassezia pachydermatis* yeast isolates on the territory of the Republic of Croatia

The brown bear (*Ursus arctos*) is the largest terrestrial carnivore that inhabits the Mountain District of Gorski kotar and the geographical area of Lika. It is included in the red list of the endangered species in Croatia. *Malassezia pachydermatis* yeast, which is considered an opportunistic pathogen, causes various pathological skin disorders in pets under certain predisposing conditions, as well as in domestic and wild animals. There is very little data about the presence and role of *M. pachydermatis* on the bear skin. The first aim of the study was to optimize a genomic DNA extraction protocol from the *M. pachydermatis* culture growing on two different culture media. The specific aim was the amplification of particular DNA fragments using ITS1 and LSU primer sequences in order to describe the genetic variation of *Malassezia pachydermatis* yeast in the brown bear (*Ursus arctos*) on the territory of Croatia. The frozen archived yeast strains were grown on two different culture media, the genomic DNA was isolated using a commercially available kit and the specific DNA fragments (ITS1 and LSU regions) were amplified by a polymerase chain reaction. In addition, the nucleotide sequences were analyzed. The results have shown that the isolated yeast colonize both the epithelium of the ear canal and the perianal area of the brown bear. The multiplied DNA fragments correspond to the previously published length of the ITS1 and LSU regions. It has been noticed that the analyzed regions contain certain varieties of the nucleotide sequence and that the LSU region is much better preserved than the ITS1 region. These preliminary results indicate possible evolutionary preservation, which needs to be further explored by analyzing a larger number of samples and by introducing additional molecular research methods.

Keywords: genetic diversity, *Malassezia pachydermatis*, brown bear, Republic of Croatia

10. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 26. 07. 1989. godine u Brežicama. Osnovnu školu završila sam u Kupljenovu. V. gimnaziju u Zagrebu završila sam 2008. godine te sam iste godine upisala Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Za vrijeme studija shvatila sam da su područja mog interesa zarazne bolesti te bolesti i upravljanje ugroženim vrstama divljih životinja. Kako bih stekla dodatno iskustvo, u Ugandi sam radila s “Gorilla Doctors PREDICT team” u jednoj od njihovih terenskih postaja (“Budongo Forest Field Station”) te se pobliže upoznala sa zadaćama veterinaru u nadziranju kritično ugroženih životinjskih vrsta. Dio vremena provela sam i u “Uganda Wildlife Education Centre” u kojem sam imala prilike učiti i provoditi protokole za spašavanje, stacioniranje i liječenje divljih životinja. Kako bih stekla dodatno praktično iskustvo, volontirala sam na Klinici za zarazne bolesti Veterinarskog fakulteta u Zagrebu. Aktivno sam sudjelovala na raznim simpozijima i radionicama (VETERINARSKI DANI 2014., Opatija; 1. hrvatski kongres veterinaru male prakse 2014., Zagreb; SIVEMAP 2014., Beograd; Annual Meeting of the Slovene Dermatology Study Group 2014., Portorož; FECAVA 2015., München; WSAVA 2015., Bangkok; SYMCO 2015., JAR; Tropical Diseases Workshop 2016., Indonezija; 64th IVSA Symposium 2016., Taiwan).