

РОЛЬ ДРІЖДЖОВИХ ГРИБІВ У ЕТІОЛОГІЇ ОТИТУ У СОБАК

М. Ф. ТУЯХОВ

Національний університет біоресурсів та природокористування

E-mail: vetmeddpss@ukr.net

[https://doi.org/10.31548/dopovidi.2\(108\).2024.015](https://doi.org/10.31548/dopovidi.2(108).2024.015)

Анотація. У статті наведені результати вивчення видового складу мікробіоти поверхні шкіри слухового каналу за отиту у собак, зокрема результати дослідження грибової мікробіоти та частоти виникнення асоціацій дріжджових грибів зі збудниками бактеріальної природи.

Мета роботи. Дослідження мікробіоти вуха собак за отитів з метою виявлення її видового складу та встановлення можливої ролі патогенних грибів і їх асоціацій з патогенними стафілококами.

Матеріали і методи. Дослідними тваринами були собаки із симптомами отиту віком від 6 місяців до 10 років. За період 2018-2020 було досліджено 30 собак масою 5-60 кг різних порід, обох статевих груп. Під час дослідження проводився відбір клінічного матеріалу у хворих тварин, виділення культур збудників на живильних середовищах, вивчення їх культуральних властивостей та визначення чутливості до відповідних препаратів.

Результати досліджень. Як показали результати досліджень, серед представників дріжджових грибів у матеріалі, виділеному від собак з отитом, найчастіше визначити *Malassezia pachydermatis* – 9 випадків (30 %).

Представники *Candida albicans* були виділені лише у 1 випадку (3,3 %), тож їх клінічне значення потребує подальшого вивчення. Дані гриби могли бути сторонніми контамінантами.

Слід зазначити, що у 9 випадках (30 %) виділили золотистий стафілокок спостерігалися асоціації *Staphylococcus aureus* з грибами *Malassezia pachydermatis*, у 6 випадках (20 %) спостерігалися асоціації *Staphylococcus pseudintermedius* із з грибами *M. pachydermatis*; у 5 випадках (16,7 %) – асоціації *S. aureus* із грам-негативними *Proteus spp.*

Висновки. 1. Серед представників дріжджових грибів у матеріалі, виділеному від собак з отитом, найчастіше виділяли *M. pachydermatis* – 9 випадків (30 %).

2. Представники *C. albicans* були виділені лише у 1 випадку (3,3 %), тож їх клінічне значення потребує подальшого вивчення. Дані гриби могли бути сторонніми контамінантами.

3. Слід зазначити, що у 9 випадках (30 % від кількості випадків виділення золотистого стафілококу) спостерігалися асоціації *S. aureus* з грибами *M. pachydermatis*, у 6 випадках (20 %) спостерігалися асоціації *S. pseudintermedius* із з грибами *M. pachydermatis*; у 5 випадках (16,7 %) – асоціації *S. aureus* із грам-негативними *Proteus spp.*

Ключові слова: собаки, мікробіологічні дослідження, живильні середовища, мікробіота шкіри, дріжджові гриби, отит, грибово-мікробні асоціації, стафілококи, чутливість

Вступ. *Malassezia* spp., рід грибів, що часто реєструється у якості коменсального організму шкіри, слухових проходів, носових ходів, поверхні ротової порожнини, періанальних ділянок, а також піхви здорових собак і кішок (Miller, Griffin, Campbell, 2013; Mauldin, *et al.*, 1997; Scott, 1992). Найпоширенішим видом *Malassezia*, виділених у собак, є *M. pachydermatis*. Цей неміцеліальний організм належить до ліпофільних сапротрофних дріжджів, які розмножуються безстатевим шляхом – брунькуванням.

Фактори, які можуть сприяти набуттю *M. pachydermatis* патогенності, можуть включати будь-який із наступних: підвищена вологість, шкірні складки, ендокринні захворювання, порушення кератинізації, генетична схильність, імунологічні порушення, реакції гіперчутливості та підвищена кількість симбіотичних стафілококів (Bond, & Lloyd, 1995; Bugden, 2013). За даними літератури, *M. pachydermatis* може мати симбіотичні стосунки з коменсальними видами стафілококів, хоча припущення про те, що маласезійний отит пов'язаний з попередньою антибіотикотерапією, не підтверджені (Berger, *et al.*, 2012; Greene, 2006; Nardoni, & Corazza,

2008). Зазначені групи організмів продукують фактори росту та змінюють мікросередовище, що є взаємовигідними; таким чином, спостерігається підвищена кількість *S. pseudintermedius* або *S. aureus* у собак з одночасним надмірним розмноженням дріжджових грибів. У 40% собак із надлишковою популяцією грибів *Malassezia* spp. діагностують стафілококову піодермію і/або отит через симбіотичну взаємодію (Guillot, *et al.*, 1998; Bond, & Lloyd, 1998; Guillot, *et al.*, 2003; Petrov *et al.*, 2013).

Зважаючи на поширеність отиту у собак, та, нерідко, недостатню ефективність лікування останніх, перехід захворювання у хронічну форму, в тому числі проліферативну із подальшим розвитком анатомічних дефектів, вивчення ролі коменсальних та патогенних грибів, особливо за їх асоціацій з мікроорганізмами є дуже актуальною.

Мета роботи. Дослідження мікробіоти вуха собак за отитів з метою виявлення її видового складу та вивчення ролі дріжджових грибів за їх асоціацій з мікроорганізмами.

Матеріали і методи. Дослідними тваринами були собаки віком від 6 місяців до 10 років. За період 2018-2020 було досліджено 30 собак різних порід масою 5-60 кг,

Туяхов М. Ф.

обох статевих груп, із симптомами отиту. Тварини були вакцинованими проти інфекційних хвороб, як стерилізовані, так і нестерилізовані. Дослідження проводили у лабораторії Маріупольської державної районної клініки ветеринарної медицини, у ветеринарних клініках Київської області «Animal Health» та «5-й елемент».

Мікробіологічні дослідження проводили на базі кафедри епізоотології, мікробіології і вірусології НУБіП України.

Собак включали в дослідження, якщо у них було діагностовано односторонній або двосторонній клінічний зовнішній отит, обґрунтований наявністю більш ніж одного з наступних клінічних ознак: дискомфорт, еритема вушного каналу, набряк або наявність ексудату, спричиненого патологією. У дослідження не включали тварин, якщо впродовж попередніх 5 днів вони отримували кортикостероїди короткотривалої або помірно короткотривалої дії, антибіотики і/або протигрибкові препарати, будь-який довготривалий системний кортикостероїд протягом попередніх 4 тижнів, або будь-який системний антибіотик чи протигрибковий препарат протягом попередніх 7 днів. Іншими причинами для виключення було: наявність новоутворень або інших факторів, що спричиняли закупорювання вушного каналу або розрив барабанної перетинки.

Діагноз (попередній та остаточний) ставили на підставі вивченого симптомокомплексу та результатів лабораторних аналізів.

Відбір проб для досліджень проводили за допомогою стерильного тампону – з уражених ділянок шкіри відбирали матеріал у спеціальні мікробіологічні контейнери із транспортним середовищем AMIES. Також відбирали ексудат у стерильні шприци. Десквамований епітелій у вигляді кірочок і лусочок, волосся відбирали у стерильні сухі культуральні пробірки. Також виготовляли мазки-відбитки із ексудату і зіскоби шкіри.

Після фіксації мазків, їх фарбували мазки за Грамом та за методом Романовського-Гімза, досліджували з використанням імерсійної системи світлового мікроскопу Vetscan HD microscope. Мікроскопічне дослідження зіскобів шкіри проводили за стандартною методикою, препарати проглядали під малим та середнім збільшенням мікроскопа.

Висіви проводили за допомогою стерильних пастерівських піпеток, бактеріологічних петель чи тампонів із контейнерів з патматеріалом на тверді та рідкі живильні середовища: МПА, кров'яний МПА, МПБ, МПЖ, агар Ендо і агар Сабуро у стерильні пластикові чашки Петрі та культуральні пробірки. Крім того, застосовували селективні середовища для стафілококів (кров'яний МПА із

Туяхов М. Ф.

8-10 % хлористого натрію і 3,5 % МПА із кристалічним фіолетовим). Культивування проводили за різних температурних режимів (25-37°C) у термостаті. Культури проглядали через 12, 24, 48 і т.д. годин. При появі колоній виготовляли мазки, які фарбували вказаними вище методами (Bugden, 2013; Nardoni, & Corazza, 2008).

Визначення чутливості ізолятів до протигрибкових препаратів здійснювали методом дифузії в агар (методом дисків). Для цього у стерильні чашки Петрі наливали по 15-20 мл живильного середовища. Після його затвердіння вносили 1 мл змиву культури досліджуваного гриба, рівномірно розподіляючи рідину по її поверхні. Після підсушування чашок з вмістом у термостаті протягом 15-20 хв. на поверхні агару стерильним пінцетом розкладали стандартні, просочені антифунгальними препаратами диски на відстані 2 см від краю чашки і 3 см – один від одного. Чашки на 24-72 год. ставили догори дном у термостат і враховували результат. Кожну пробу висівали на чашки Петрі у трьох повторях. Для цього за допомогою міліметрової шкали вимірювали діаметр зон пригнічення росту культури збудника. Оцінку чутливості збудника до протигрибкового препарату робили залежно від розміру зони пригнічення згідно стандартної шкали (Bond, & Lloyd, 1995; Zamankhan, et al., 2010)

якщо зона пригнічення росту не перевищувала 15 мм, збудника вважали слабо чутливим; 15-24 мм – чутливим; 25 і більше – високочутливим; за умови відсутності зони пригнічення росту ізолят вважали нечутливим до даного препарату.

Результати досліджень та їх обговорення. Серед представників дріжджових грибів найчастіше виділяли *M. pachydermatis* – 9 випадків (30 %). На середовищі Сабуро ріст колоній спостерігався на 5-7 добу культивування при 30°C. Колонії випуклі, гладенькі, кремового кольору. Починаючи з 10 – 12 доби культивування спостерігалось їх ослизнення, поява колоній жовтуватого-оранжевого кольору, вростання у середовище. При мікроскопічному дослідженні зіскобів шкіри відзначалась наявність гіфальних елементів та дріжджових клітин, а у матеріалі із колоній – дріжджоподібні клітини еліпсоїдної форми у фазі брунькування, залишки гіф траплялися рідко.

Представники *C. albicans* були виділені лише у 1 випадку (3,3 %). У мазках з ексудату, пофарбованих за Романовським-Гімзом, знаходили овальні, яйцеподібні клітини та елементи псевдоміцелію. На середовищі Сабуро при 30° С вони формували на 4-6 добу сірувато-кремові колонії з злегка горохуватою поверхнею. При мікроскопії препаратів з колоній відзначали

Тухов М. Ф.

присутність септованих фрагментів міцелію.

Слід зазначити, що у 9 випадках (30 % від кількості випадків виділення золотистого стафілококу) спостерігалися асоціації *S. aureus* з грибами *M. pachydermatis*, у 6

випадках (20 %) спостерігалися асоціації *S. pseudintermedius* із з грибами *M. pachydermatis*; у 5 випадках (16,6 %) – асоціації *S. aureus* із грам-негативними *Proteus* spp. (табл.1).

1. Асоціації стафілококів з іншими мікроорганізмами

Асоціація	Частота виділення	
	кількість випадків	%
<i>S. aureus</i> + <i>Proteus</i> spp.	5	16,7
<i>S. pseudintermedius</i> + <i>M. pachydermatis</i>	6	20
<i>S. aureus</i> + <i>M. pachydermatis</i>	9	30
Відсутність асоціацій	10	33,3

У 33,3% досліджених зразків мікробно-грибкових асоціацій не виявлено (рис. 1).

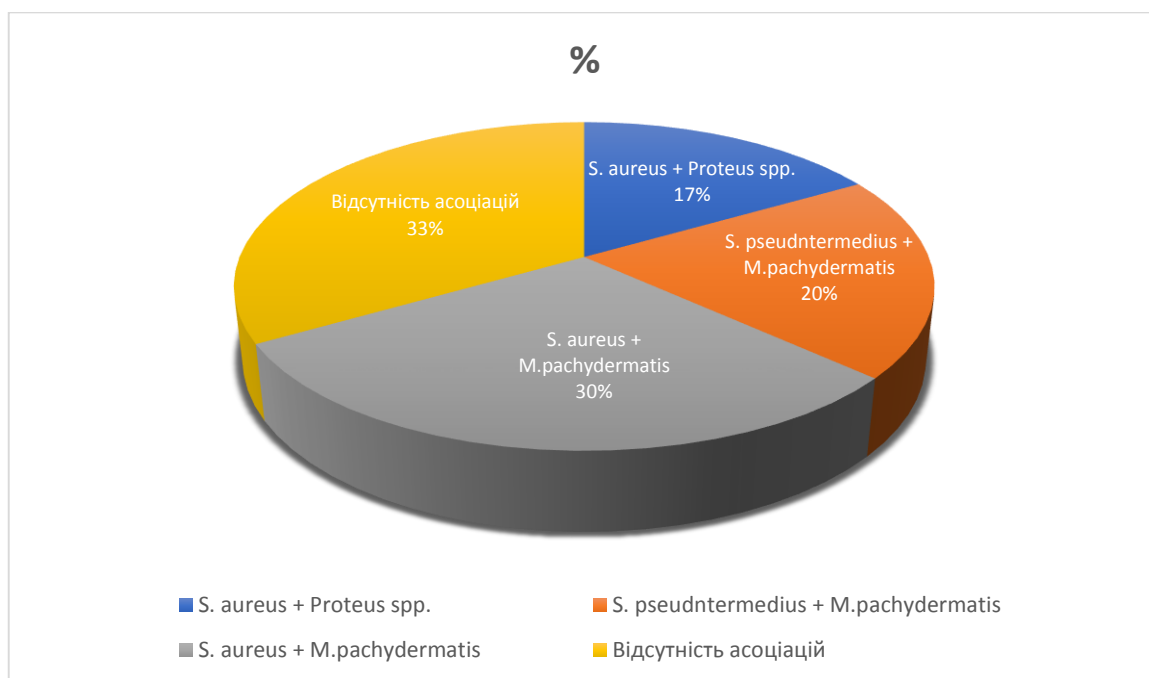


Рис.1. Мікробно-грибкові асоціації у собак, хворих на отит

Ізоляти *M. pachydermatis* виявилися чутливими до препаратів з групи азолів: флуконазолу, ітраконазолу та міконазолу – зони

пригнічення були виразними і становили відповідно $28,6 \pm 0,98$; $25,7 \pm 2,35$ та $20,3 \pm 3,05$ мм, а частка

Тухов М. Ф.

чутливих ізолятів становила 83,4 – 100 % (табл.2).

2. Чутливість ізолятів *M. pachydermatis* in vitro

Препарат	Високочутливих	Чутливих	Резистентних
	%		
Флуконазол	100	-	-
Ітраконазол	96,5	3,5	-
Міконазол	83,4	6,6	10,0
Кетоконазол	71,0	11,3	17,7
Енілконазол	71,5	15,5	23,0
Ністатин	21	19,3	59,7

Проте неефективними виявилися кетоконазол та енілконазол – діаметр зон пригнічення не перевищував $14,5 \pm 2,2$ і $12,5 \pm 3,4$ мм. Найменш

вираженою антифунгальна дія in vitro була у ністатину – частка резистентних ізолятів перевищувала 50 % і складала 59,7 % (рис. 2).

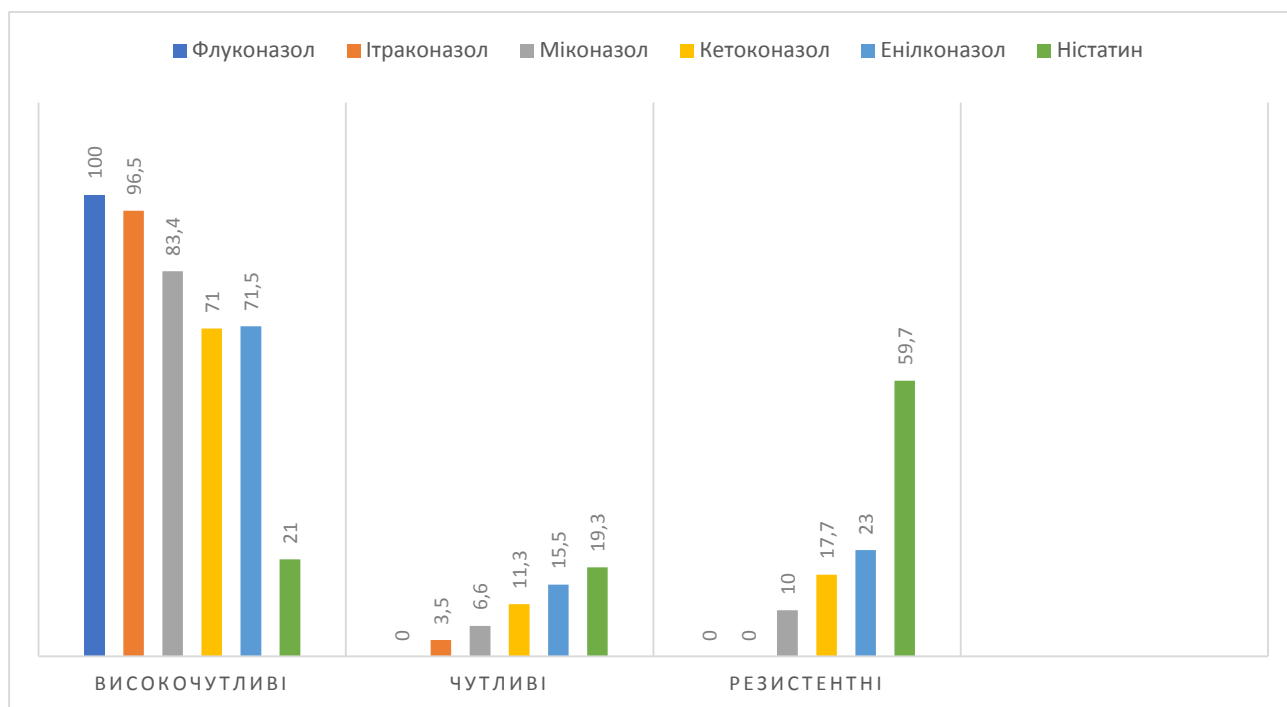


Рис. 2. Чутливість грибкових ізолятів до антифунгальних препаратів, відсотків ізолятів

Обговорення.

Як свідчать отримані результати досліджень, встановлено високу (близько 30 %) частоту виникнення асоціацій патогенних стафілококів, а

саме *S. aureus* та *S. pseudintermedius* з грибами роду *Malassezia* spp., зокрема *M. pachydermatis*, що співпадає з даними літератури (Guillot, et al., 1998; Bond, & Lloyd, 1998; Guillot, et

Тухов М. Ф.

al., 2003). Очевидно, наявність симбіотичних взаємостосунків між двома групами збудників створює так званий симбіотичний інфекційний комплекс, адже продукування та виділення факторів росту та зміни мікросередовища слухового каналу є взаємовигідними для цих етіологічних чинників (Boone, et al., 2021; Lorek, et al. 2020). Таким чином, спостерігається підвищена кількість *S. pseudintermedius* або *S. aureus* у собак з одночасним надмірним розмноженням дріжджових грибів. У 40 % собак із надлишковою популяцією грибів *Malassezia* діагностують стафілококову піодермію і/або отит через симбіотичну взаємодію, що підтверджується отриманими результатами (Guillot, et al., 1998; Bond, & Lloyd, 1998; Guillot, et al., 2003; Bond, et al., 2020).

Гриби роду *Malassezia* Baill. належать до нормальної мікробіоти шкіри тварин, але за певних умов ослаблення організму, можуть стати причиною появи отиту, в тому числі в асоціаціях з бактеріями, що ускладнює його лікування. Питання видового складу патогенної мікробіоти, яка є причиною отиту у собак є не достатньо вивченим, що робить результати наведені в даній статті актуальними і важливими для підвищення ефективності терапії тварин.

Перспективи досліджень.

Подальше вивчення ролі патогенних грибів у етіології отитів собак, дослідження ролі асоціацій патогенних коків та інших збудників з грибами *M. pachydermatis* з подальшим удосконаленням комплексної терапії тварин, хворих на отити, особливо із превалюванням зазначених збудників.

Висновки

1. Серед представників дріжджових грибів у зішкрібі, виділеному від собак з отитом, найчастіше виділяли *M. pachydermatis* – 9 випадків (30 %).

2. Представники *C. albicans* були виділені лише у 1 випадку (3,3 %), тож їх клінічне значення потребує подальшого вивчення. Дані гриби могли бути сторонніми контамінантами.

3. Слід зазначити, що у 9 випадках (30 % від кількості випадків виділення золотистого стафілококу) спостерігалися асоціації *S. aureus* з грибами *M. pachydermatis*, у 6 випадках (20 %) спостерігалися асоціації *S. pseudintermedius* із з грибами *M. pachydermatis*; у 5 випадках (16,7 %) – асоціації *S. aureus* із грам-негативними *Proteus* spp.

4. Ізоляти *M. pachydermatis* виявилися чутливими до препаратів з групи азолів: флуконазолу, ітраконазолу та міконазолу – частка чутливих ізолятів становила 83,4 – 100 %. Найменш вираженою антифунгальна дія *in vitro* була у ністатину – частка резистентних

Туяхов М. Ф.

ізолятів перевищувала 50 % і складала 59,7 %.

References

1. Miller W, Griffin C, Campbell K. (2013). Fungal and algal skin diseases. *In: Muller and Kirk's Small Animal Dermatology*, 7th Ed. St. Louis, Elsevier Inc. 243-252.
2. Mauldin EA, Scott DW, Miller WH, *et al.* (1997). *Malassezia* dermatitis in the dog: a retrospective histopathological and immunopathological study of 86 cases (1990-1995). *Vet. Dermatol.* 9:191-202.
3. Guillot J, Guého E, Mialot M, *et al.* (1998). Importance des levures du genre *Malassezia*. *Point Vet.* 29:691-701.
4. Scott DW. (1992). Bacteria and yeast on the surface and within non-inflamed hair follicles of skin biopsies from dogs with non-neoplastic dermatoses. *Cornell Vet.* 82:379-386.
5. Berger D, Lewis P, Schick A, *et al.* (2012). Comparison of once-daily versus twice-weekly terbinafine administration for the treatment of canine *Malassezia* dermatitis – a pilot study. *Vet. Dermatol.* 23:418-e79.
6. Bond R, Lloyd DH. (1998). The relationship between population sizes of *Malassezia pachydermatis* in healthy dogs and in Basset Hounds with M. *pachydermatis*-associated seborrhoeic dermatitis and adherence to canine corneocytes *in vitro*. *In: Kwochka KW, Willemse T, Tscherner CV, et al* (Eds). *Advances in Veterinary Dermatology III*, Boston, Butterworth-Heinemann; 283-289.
7. Guillot J, Bensignor E, Jankowski F, *et al.* (2003). Comparative efficacies of oral ketoconazole and terbinafine for reducing *Malassezia* population sizes on the skin of Basset Hounds. *Vet. Dermatol.* 14:153-157.
8. Greene CE. Cutaneous fungal infections. *In: Infectious Diseases of the Dog and Cat*, 3rd Ed. Philadelphia, WB Saunders & Co. 2006; 602-606.
9. Guillot J, Guého E, Mialot M, *et al.* (1998). Importance des levures du genre *Malassezia*. *Point Vet.* 29:691-701.
10. Nègre A, Bensignor E, Guillot J. (2009). Evidence-based veterinary dermatology: a systematic review of interventions for *Malassezia* dermatitis in dogs. *Vet. Dermatol.* 20:1-12.
11. Guillot J, Bensignor E, Jankowski F, *et al.* (2003). Comparative efficacies of oral ketoconazole and terbinafine for reducing *Malassezia* population sizes on the skin of Basset Hounds. *Vet. Dermatol.* 14:153-157.
12. Bond R., Lloyd D.H. (1995). Evaluation of a detergent scrub technique for the quantitative culture of *Malassezia pachydermatis* from canine skin. *Res Vet Sei*, 58 pp. 133-137.
13. Bond R. (2010). Superficial veterinary mycoses. *Clin Dermatol*, 28(2):226-236.
14. Bugden DL. (2013). Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from dogs with otitis externa in Australia. *Aust Vet J.* 91(1–2):43-46.
15. Griffin CE. (2010). Classifying cases of otitis externa the PPSP System. Proceedings of ESVD Workshop on Otitis. St Helensю
16. Nambi AP. (2002). *Malassezia* dermatitis in dogs. *Intas Polivet.* 3:202-205.

17. Nardoni SM, Corazza F. (2008). Mancianti Diagnostic, clinical features of animal malasseziosis. *Parassitologia*, 50(1–2):81-83.
18. Petrov VG, Mihaylov I, Tsachev G, Zhelev P, Marutsov K. (2013). Otitis externa in dogs: microbiology and antimicrobial susceptibility. *Rev Med Vet*, 164(1):18-22.
19. Reddy CBK, Kumari KN. (2015). Therapeutic management of Malassezia dermatitis in a Labrador retriever dog. *International Journal of Livestock Research*, (7):92-95.
20. Zamankhan H, Malayeri S, Jamshidi T, Zahraei S. (2010). Identification and antimicrobial susceptibility patterns of bacteria causing otitis externa in dogs. *Vet Res Commun*. 34:435-444.
21. R. Bond, D.O. Morris, J. Guillot, E.J. Bensignor, D. Robson, K.V. Mason, *et al.* (2020). Biology, diagnosis and treatment of *Malassezia* dermatitis in dogs and cats Clinical Consensus Guidelines of the World Association for Veterinary Dermatology. *Vet Dermatol*. 31:28-74.
22. Boone JM, Bond R, Loeffler A, Ferguson EA, Hendricks A. (2021). *Malassezia* otitis unresponsive to primary care: outcome in 59 dogs. *Vet Dermatol*. 32(5):441-119.
23. Lorek A, Dennis R, van Dijk J *et al.* (2020). Occult otitis media in dogs with chronic otitis externa - magnetic resonance imaging and association with otoscopic and cytological findings. *Vet Dermatol* 31: 146-153.

THE ROLE OF YEASTS IN ETIOLOGY OF OTITIS IN DOGS

M. F. Tuyakhov

Abstract. *The article presents the results of the study of the species composition of the microbiota of the skin surface of the auditory canal for otitis in dogs, in particular the results of the study of the fungal microbiota and the frequency of associations of pathogenic fungi with bacterial pathogens.*

Objective. *Investigation of the ear microbiota in dogs with otitis with the aim of identifying microbial/fungal species composition and establishing the role of yeasts in the etiology of otitis, identifying possible associations of fungi and pathogenic staphylococci.*

Materials and methods. *Experimental animals were dogs aged from 6 months to 10 years. During the period 2018-2020, 30 dogs of various breeds weighing 5-60 kg, of both genders, with otitis symptoms were examined. During the study, sampling of clinical material from affected animals, isolation of pathogen cultures on nutrient media, the study of their cultural properties and the determination of sensitivity to the corresponding drugs were carried out.*

As the research results showed, among the representatives of yeast fungi in the material isolated from dogs with otitis, Malassezia pachydermatis was most often isolated - 9 cases (30%).

Representatives of Candida albicans were isolated in only 1 case (3.3%), so their clinical significance requires further study. These fungi could be extraneous contaminants.

Туяхов М. Ф.

It should be noted that in 9 cases (30% of the number of cases of Staphylococcus aureus isolation) associations of S. aureus were observed with Malassezia pachydermatis fungi, in 6 cases (20%) associations of Staphylococcus pseudintermedius with Malassezia pachydermatis fungi were observed; in 5 cases (16.7%) – associations of S. aureus with gram-negative Proteus spp.

Conclusions. 1. Among representatives of yeast fungi in the material isolated from dogs with otitis, M. pachydermatis was most often isolated – 9 cases (30%).

2. Representatives of C. albicans were isolated in only 1 case (3.3%), so their clinical significance requires further study. These agents could be extraneous contaminants.

3. It should be noted that in 9 cases (30% of the number of cases of S. aureus isolation) associations with M. pachydermatis fungi were observed, in 6 cases (20%) associations of S. pseudintermedius with M. pachydermatis fungi were observed; in 5 cases (16.7%) – associations of Malassezia with gram-negative Proteus spp.

Key words: dogs, microbiological investigation, nutrient media, skin microbiota, yeast fungi, otitis, fungal-microbial associations, malassezia, sensitivity