

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra veterinárních disciplín



**Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů**

**Kvasinky způsobující otitidy u psů a možnosti jejich
terapie mykoparazitickou houbou *Pythium oligandrum***

Diplomová práce

Bc. Václava Hrabětová

Management zdraví a welfare zvířat

Vedoucí práce: prof. MVDr. David Modrý, Ph.D.

**Konzultanti: RNDr. David Novotný, Ph.D. a MVDr. Martina
Načeradská, Ph.D.**

© 2023 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Kvasinky způsobující otitidy u psů a možnosti jejich terapie mykoparazitickou houbou *Pythium oligandrum*" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 14. 4. 2023

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala svému vedoucímu diplomové práce prof. MVDr. Davidovi Modrému Ph.D. za odborné vedení práce a za jeho podnětné rady a čas, který mi věnoval při řešení dané problematiky, čímž mi pomohl práci zkompletovat. Dále bych ráda poděkovala konzultantům: MVDr. Martině Načeradské Ph.D. za odborné rady týkající se dané problematiky a panu RNDr. Davidovi Novotnému Ph.D. za odborné vedení výzkumné části ve Výzkumném ústavu rostlinné výroby, čas, cenné rady a věcné připomínky. Poděkování bych tímto chtěla vyjádřit i veterinárním klinikám: Výukové veterinární ambulanci – ČZU a Veterinární Kliniky Nusle - Schwetter a kol., které mi zprostředkovávaly vzorky nemocných psů. V neposlední řadě bych ráda poděkovala všem majitelům psů za jejich přínos pro výzkumnou část této diplomové práce, a nakonec bych ráda bych poděkovala také své rodině, příteli a všem přátelům, kteří mě při vytváření této práce podporovali.

Kvasinky způsobující otitidy u psů a možnosti jejich terapie mykoparazitickou houbou *Pythium oligandrum*

Souhrn

Otitidy neboli ušní záněty jsou velmi častým problémem u psů. Řadí se mezi 10 nejčastějších důvodů návštěv veterinárních klinik. Typickými klinickými příznaky jsou bolest, zápach, zánět, exsudát (zánětlivý extravaskulární výpotek), pruritus (svědění), třes hlavou, bolest při palpaci (prohmatávání postižené oblasti), erytém (červené zbarvení kůže) a otok ucha nebo v okolí zvukovodu. Příčin vzniku otitid je mnoho, ale velmi často jsou způsobené kvasinkami nebo bakteriemi, případně jejich kombinací. Z kvasinek se na otitidách nejčastěji podílí *Candida* spp. a *Malassezia pachydermatis*, která se zároveň vyskytuje v mikrobiotě ucha u zdravých psů bez příznaků otitid. Z důvodu zvyšující se antimykotické rezistence na léky běžně používané k léčbě otitid je vhodné zařadit alternativní možnosti terapie, což byl důvod, proč jsem ve své diplomové práci zkoumala vliv esenciálních silic (oregana a tea tree) a mykoparazitické houby *Pythium oligandrum* na kvasinky *M. pachydermatis*.

Cílem práce byla izolace původců z klinických případů otitid psů, kultivace a PCR identifikace ve spolupráci s laboratoří VURV, růstové experimenty s *Pythium oligandrum* *in vitro* (zjišťování vlivu *P. oligandrum* na *M. pachydermatis* při bodovém zaočkování kvasinky a formou suspenze a zjišťování schopnost *P. oligandrum* růst při teplotách 30 a 32 °C). Dále růstové experimenty cílené na posouzení případného inhibičního efektu vybraných esenciálních silic (oregana a tea tree) metodou zkumavkové difúze se spektrofotometrickým vyhodnocením absorbance.

Z výsledků této studie vyplývá, že *P. oligandrum* je schopné růst stejně rychle při teplotě 30 i 32 °C jako při 25 °C, která se uvádí jako optimální. Při zjišťování vlivu *P. oligandrum* na *M. pachydermatis* jsem zjistila, že lépe roste na 2% malt extract agaru, kde, ale zároveň docházelo k přerůstání kvasinek *M. pachydermatis*, než na Sabouraudovém dextrózovém agaru, kde naopak kvasinky *M. pachydermatis* přerostly *P. oligandrum*. K těmto interakcím docházelo jak při bodovém zaočkování kvasinek, tak při formě suspenze. Po spektrofotometrickém vyhodnocení absorbance zkumavek s esenciálními silicemi a kulturami *M. pachydermatis* jsem zjistila, že největší vliv na množení kvasinek, měla esenciální silice z oregana, a to především při koncentraci 125 µl/l. Při porovnání průměrných hodnot absorbance v kontrolních zkumavkách se zkumavkami s esenciální silicí z oregana jsem zaznamenala, že hodnoty s esenciální silicí z oregana byly o polovinu nižší.

Závěrem z toho vyplývá, že esenciální silice z oregana prokázala vliv na *M. pachydermatis* a teoreticky by mohla být využívána při lehčích formách otitid jako alternativní terapie nebo jako doplněk běžné léčby antimykotiky.

Klíčová slova: kvasinky, *otitis externa*, psi, *Pythium oligandrum*, esenciální silice, tea tree, oregano, antimykotická rezistence

Yeast causing otitis in dogs and possibilities of their therapy with mycoparasitic fungus *Pythium oligandrum*

Summary

Otitis, or ear infection, is a very common problem in dogs. They are among top 10 reasons for visits to veterinary clinics. Typical clinical signs include pain, odor, inflammation, exudate (inflammatory extravascular discharge), pruritus (itching), head tremors, pain on palpation (palpating the affected area), erythema (red discoloration of the skin) and swelling of the ear or around the ear canal. There are many causes of otitis but very often they are caused by yeast or bacteria or a combination of both. Of the yeasts, *Candida* spp. and *Malassezia pachydermatis* are most involved in otitis which is also present in the ear microbiota of healthy dogs without signs of otitis. It is advised to include alternative therapeutic options due to the increasing antimycotic resistance to drugs that are commonly used to treat otitis. This was the reason why I investigated the effect of essential oils (oregano and tea tree) and the mycoparasitic fungus *Pythium oligandrum* on *M. pachydermatis* in my thesis.

The aim of the study was the isolation of pathogens from clinical cases of canine otitis, cultivation, and PCR identification in collaboration with the VURV laboratory, growth experiments with *Pythium oligandrum in vitro* (detection of the effect of *P. oligandrum* on *M. pachydermatis* during spot inoculation of the yeast and suspension form and detection of the ability of *P. oligandrum* to grow at temperatures of 30 and 32°C). Furthermore, growth experiments aimed at assessing the possible inhibitory effect of selected essential oils (oregano and tea tree) by tube diffusion with spectrophotometric evaluation of absorbance.

The results of this study show that *P. oligandrum* is able to grow as fast at 30 and 32°C as at 25°C which is reported as the optimum temperature. When investigating the effect of *P. oligandrum* on *M. pachydermatis*, I found that it grew better on 2% malt extract agar, where at the same time, *M. pachydermatis* yeasts overgrew. On the contrary, on Sabouraud dextrose agar *M. pachydermatis* yeast overgrew *P. oligandrum*. These interactions occurred both in yeast inoculation and in suspension form. After spectrophotometric evaluation of the absorbance of tubes with essential oils and cultures of *M. pachydermatis*, I found out that the essential oils of oregano had the greatest effect on yeast multiplication, especially at a concentration of 125 µl/l. When comparing the average absorbance values in the control tubes with the oregano essential oil tubes, it was observed that the values in the oregano essential oil tubes were half as high.

In conclusion, the essential oil of oregano has demonstrated an effect on *M. pachydermatis* and could, theoretically speaking, be used in milder forms of otitis as an alternative therapy or as an adjunct to conventional antimycotic treatment.

Keywords: yeast, *otitis externa*, dogs, *Pythium oligandrum*, essential oil, tea tree, oregano, antifungal resistance

Obsah

| | |
|--|-----------|
| 1 Úvod | 8 |
| 2 Vědecká hypotéza a cíle práce | 9 |
| 3 Literární rešerše..... | 10 |
| Anatomie a fyziologie psích uší..... | 10 |
| 3.1.1 Zevní ucho | 10 |
| 3.1.1.1 Ušní boltec..... | 10 |
| 3.1.1.2 Vnější zvukovod..... | 12 |
| 3.1.1.3 Bubínek | 14 |
| 3.1.2 Střední ucho | 14 |
| 3.1.2.1 Bubínková dutina | 14 |
| 3.1.2.2 Sluchové kůstky | 15 |
| 3.1.3 Vnitřní ucho | 16 |
| 3.1.3.1 Kostěné bludiště (labyrint) | 16 |
| 3.1.3.2 Blanité bludiště..... | 17 |
| 3.1.3.3 Blanitý hlemýžď | 17 |
| Otitidy u psů | 19 |
| 3.1.4 Zánět zevního zvukovodu (<i>otitis externa</i>) | 19 |
| 3.1.4.1 Etiopatogeneze | 20 |
| 3.1.4.2 Symptomatologie..... | 20 |
| 3.1.4.3 Diagnostika..... | 21 |
| 3.1.4.4 Léčba | 22 |
| 3.1.5 Zánět středního a vnitřního ucha | 23 |
| Původci otitid u psů..... | 25 |
| 3.1.6 Bakterie..... | 25 |
| 3.1.7 Parazitičtí členovci..... | 25 |
| 3.1.8 Kvasinky | 27 |
| 3.1.8.1 <i>Malassezia pachydermatis</i> | 28 |
| 3.1.8.2 Rod <i>Candida</i> | 33 |
| Rezistence kvasinek k antimykotikům | 36 |
| Využití esenciálních silic při léčbě otitid u psů..... | 38 |
| 3.1.9 Popis esenciálních silic | 38 |
| 3.1.10 Výroba esenciálních olejů..... | 39 |
| 3.1.11 Využívané silice..... | 40 |
| 3.1.11.1 Kajeput střídavolistý (tea tree) | 41 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 3.1.11.2 | Oregano (<i>Origanum vulgare</i>) | 42 |
| | <i>Pythium oligandrum</i> | 44 |
| 3.1.12 | Taxonomie | 44 |
| 3.1.13 | Historie..... | 44 |
| 3.1.14 | Charakteristika <i>Pythium oligandrum</i> | 45 |
| 3.1.15 | <i>Pythium oligandrum</i> při kvasinkových infekcích..... | 47 |
| 4 | Metodika | 48 |
| | Materiál | 50 |
| | Laboratorní metody | 52 |
| 4.1.1 | Kultivace kvasinek..... | 52 |
| 4.1.2 | Identifikace kvasinek metodou PCR..... | 54 |
| 4.1.3 | Zjištění vlivu esenciálních silic na růst <i>Malassezia pachydermatis</i> | 54 |
| 4.1.4 | Experimenty s <i>Pythium oligandrum</i> | 57 |
| 5 | Výsledky | 63 |
| 5.1 | Identifikace kvasinek | 63 |
| 5.2 | Zjišťování vlivu esenciálních silic na růst <i>Malassezia pachydermatis</i> | 67 |
| 5.3 | Zjištění schopnosti <i>P. oligandrum</i> růst při teplotách 30 a 32 °C | 72 |
| 5.4 | Interakce <i>Pythium oligandrum</i> a <i>Malassezia pachydermatis</i> | 73 |
| 6 | Diskuze | 76 |
| 7 | Závěr | 82 |
| 8 | Literatura | 83 |

1 Úvod

Otitidy je běžným problémem u psů, především *otitis externa* (Neves et al. 2018). Bakterie a kvasinky se běžně účastní a mohou udržovat zánětlivé reakce uvnitř zvukovodu (Perry et al. 2017). Otoskopie, cytologické vyšetření sekretu a mikrobiologická kultivace ztělesňují formy diagnózy. Cytologie má také velké využití v přístupu k evoluci léčby. Terapie většinou spočívá v čištění zvukovodů a následném nasazení antibiotik nebo antimykotik (Bajwa 2019). Protože některé z nich mohou způsobit rezistenci, přecitlivělost, a dokonce i ototoxicitu (Neves et al. 2018), hledání nových farmakologických základů a alternativních terapií je v současné době nezbytné. Z toho důvodu jsem se ve své práci zabývala *in vitro* účinností esenciálních silic především z kajeputu střídavolistého (tea tree) a oregana které mají širokou škálu protiplísňových vlastností a jsou šetrné k životnímu prostředí (Bohmova et al. 2019) a zároveň esenciální silice mají i inhibiční účinek na izolovanou *Malassezia pachydermatis* ze psích uší je možné ji využít k léčbě *otitis externa* (Bismarck et al. 2020). Další možností alternativní terapie je využití mykoparazitické houby *Pythium oligandrum*, což je půdní mikromyceta s mykoparazitickými vlastnostmi (Načeradská et al. 2017), která zároveň prokázala srovnatelnou účinnost alternativní léčby přípravkem obsahující *P. oligandrum* a antimitotické léčby intrakonazolem. Z toho důvodu je alternativní léčba doporučována jako levnější a šetrnější alternativa k itrakonazolu pro léčbu a prevenci dermatofytóz (Načeradská et al. 2021). Velkou výhodou *Pythium oligandrum* je i jeho dostupnost, jelikož je přirozeně rozšířen po celém světě (Načeradská et al. 2017).

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Cílem této diplomové práce bylo studium kvasinek způsobující otitidy u psů a možnosti jejich terapie mykoparazitickou houbou *Pythium oligandrum*, včetně růstových experimentů s touto houbou. Součástí práce byly také testy inhibičního efektu esenciálních silic z oregana a kajeputu střídavolistého (tea tree).

Problematika byla řešena v následujících etapách:

- Odběr vzorků od klinických případů psů s příznaky otitid a od klinicky zdravých psů.
- Kultivace a identifikace kvasinek ve spolupráci s laboratoří Výzkumného ústavu rostlinné výroby (VURV).
- Analýza anamnestických dat testovaných psů.
- Zjišťování vlivu *Pythium oligandrum* a esenciálních silic z oregana a kajeputu střídavolistého na izolované kvasinky *in vitro*.
- Zjišťování schopnosti *Pythium oligandrum* růst při teplotách 30 °C a 32 °C.

3 Literární rešerše

Anatomie a fyziologie psích uší

Povrch psích uší je výrazně rozdílný dle plemenné rasy, mohou být vzpřímená nebo převislá, osrstěná či lysá anebo různě veliká (Cole 2010). Sluchové ústrojí se dělí na zevní, střední a vnitřní ucho, viz obrázek 2 (Marvan et al. 1992). Hlavní funkcí je vnímání zvuků a tónů, ale zároveň také umožňuje udržení a vnímání rovnováhy, polohy a pohybu těla v prostoru (Reece 2011). Orgány sluchu a rovnováhy se nacházejí ve vnitřním uchu v *pars petrosa ossis temporalis*. Oba orgány jsou funkčně i anatomicky propojené prostřednictvím osmého hlavového nervu (*n. vestibulocochlearis* – VIII) (König & Liebich 2002). Uši jsou velmi důležité i pro komunikaci (druhovou i mezidruhovou). Poloha uší společně s očima udává signál v emocionálním výrazu jedince a zároveň i příjem zvuků je důležitý pro vizuální komunikaci (Siniscalchi et al. 2018). V neposlední řadě je funkcí uší i termoregulace, jelikož psi mají omezenou schopnost pocení tak jsou tepelné ztráty primárně řízeny zrychleným dechem, morfologií uší a délkou či hustotou srsti (Jimenez et al. 2022).

3.1.1 Zevní ucho

Hlavní funkcí zevního ucha (*auris externa*) je zachycování a vedení zvukových vln do bubínku (König & Liebich 2002). Skládá se z ušního a prstencové chrupavky (Cole 2010). Zahrnuje ušní boltec a vnější zvukovod, který vede od ušního boltce až do bubínkové dutiny, což je dutina středního ucha a bubínek (Reece 2011).

Zvukové vlny nejdříve koncentruje ušní boltec, následně se vnějším zvukovodem přenáší k bubínku, čímž se bubínek rozechvěje a chvění se donese až ke sluchovým kůstkám k předsíňovému okénku, kde se to přes perilymfu dostane do předsíňového a bubínkového poschodí. Chvěním perilymfy pravděpodobně dochází k rozkmitání spodinové blanky, což způsobuje podráždění vláskových buněk a vznik nervových vzruchů, které se nakonec sluchovým nervem dostávají až do mozku (Marvan et al. 1992).

3.1.1.1 Ušní boltec

Ušní boltec (*auricula*) je kožní zdvojení (Marvan et al. 1992), vyztužené elastickou trychtýřovitou chrupavkou. U většiny zvířat je potažený ze zevní strany osrstěnou kůží a uvnitř boltce je kůže téměř lysá (Reece 2011). Záleží ale na druhu a plemeni zvířat, některá zvířata mají téměř či úplně lysou i zevní část a některá naopak mají zevní stranu boltce velmi hustě osrstěnou jako například psi s převislými uši, kam se řadí např. kokršpaněl (König & Liebich 2002). Boltec leží na tukovém polštáři, vytváří tzv. kulový kloub, umožňující otáčení na všechny strany (Najbrt et al. 1973) a lze jej rozdělit na základnu a volnou část (Marvan et al. 1992). Na vnitřní straně se nachází jáma ušního boltce (*scapha*) a na vnitřní ploše je jemná kůže s dlouhými ochrannými chlupy (*tragi*), které se vyskytují poblíž vnějšího zvukovodu. V hloubce ušního boltce jsou chlupy méně četné a jemnější (König & Liebich 2002). Kůže

boltce obsahuje mazové žlázy, vlasové folikuly a apokrinní potní žlázy (Cole 2010). Ušní boltce jsou u všech domácích savců druhově specifické. Některé tvary ušních boltců u psů jsou typická pro určitá plemena viz tabulka 1 (König & Liebich 2002). V porovnání s hospodářskými zvířaty mají psi nejvíce variabilní tvar i velikost ušního boltce (Marvan et al. 1992). Části ušního boltce se rozdělují na hřbet ušního boltce (*dorsum auriculae*), okraj ušního boltce (*margo auriculae, helix*), hrot ušního boltce (*apex auriculae*) a druhově specifické chrupavčité lišty (*crus helix medialis et distalis, incisura intertragica, anthelix, tragus, antitragus*). U kočky a u psa se kůže na kaudálním okraji ušního boltce vychyluje v kožní kapsu (*saccus cutaneus marginalis*), která je z vnitřní stěny na svém volném okraji vroubkovaná. Ušní boltce jsou pohyblivé a jejich pohyb je součástí tělní mimiky (König & Liebich 2002).

Ušním boltcem pohybují uchohybné svaly odstupující na lebce nebo na chrupavčitém štítku (*scutulum* – nepravidelná čtyřhranná destička, uložena pohyblivě na *fascia temporalis*) (Najbrt et al. 1973), které umožňují otáčení, čímž poskytují zachycení většího množství zvukových vln (Reece 2011) a snadnější lokalizaci zvuků (König & Liebich 2002). Domácí savci disponují dobrou pohyblivostí ušního boltce (Najbrt et al. 1973). Uchohybné svaly lze rozdělit na vlastní, které začínají a končí na boltci, a na svaly, které na ušní boltce vstupují z okolí (Marvan et al. 1992) nebo z topografického hlediska je lze rozdělit do čtyř skupin vzhledem u k ušnímu boltci na přední neboli *Mm. auriculares rostrales* (*M. frontoscutularis, M. interscutularis, Mm. scutuloauriculares superficiales, Mm. scutuloauriculares profundi* a *M. zygomaticoauricularis*), zadní neboli *Mm. auriculares caudales* (*M. cervicoscutularis, M. cervicoauricularis superficialis, M. cervicoauricularis medius* a *M. cervicoauricularis profundus*), horní neboli *Mm. auriculares dorsales* (*M. parietoauricularis*) a dolní neboli *Mm. auriculares ventrales* (*M. parotidoauricularis*) (Najbrt et al. 1973). Svaly jsou uspořádány radiálně kolem ušního boltce, který zvedají, stahují nebo jej natáčejí do stran. Uchohybné svaly jsou rovněž jako ostatní mimické svaly hlavy inervovány prostřednictvím *n. facialis* (König & Liebich 2002). Trychtýřovitá chrupavka má tvar písmene L a nachází se za bubínkem mediálně od ucha (Cole 2010), shromažďuje zvukové vlny a přenáší je do zvukovodu a do bubínkové membrány, která odděluje vnější ucho od středního (Reece 2011).

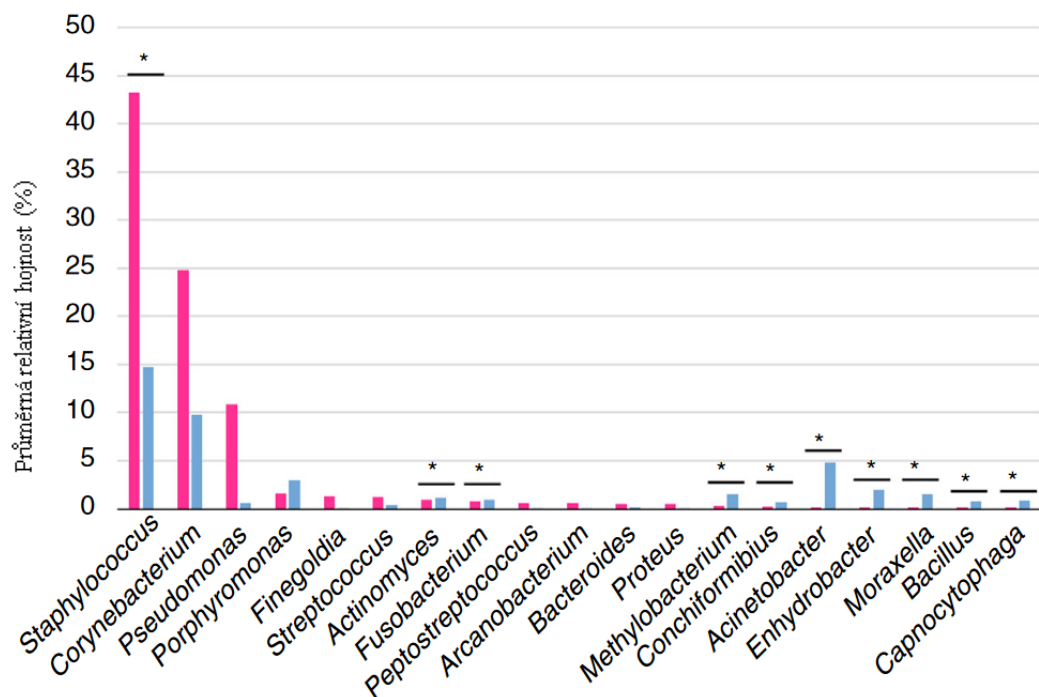
Tabulka 1. Tvar uší u různých plemen psů. (König & Liebich 2002).

| Tvar uší: | Plemena psů: |
|-----------------------------------|-----------------------------------|
| Dlouhé vztyčené uši | němečtí ovčáci |
| Krátké vztyčené uši | špicí, severská tažná plemena |
| Polovztyčené uši | foxteriéri, kolie |
| Převíslé uši | dogy, některá lovecká plemena psů |
| Velmi dlouhé převíslé uši | bladhoundi, někteří honiči |
| Netopýří uši | francouzští buldočci |
| Uši tvaru listu růže složené vzad | Chrti |

3.1.1.2 Vnější zvukovod

Vnější zvukovod neboli *meatus acusticus externus* je různě dlouhá trubice (Najbrt et al. 1973), která je na začátku s chrupavčítým podkladem a v hloubce s kostním. Délka kostní části zvukovodu je rozdílná dle druhu zvířete, například z hospodářských zvířat a zájmových zvířat je nejdělsí u prasete a nejkratší u psa (Marvan et al. 1992). Zpočátku vede téměř svisle dolů a poté se ohýbá pod výrazným úhlem horizontálně a mediálně (König & Liebich 2002). Chrupavčitý podklad se skládá ze dvou elastických chrupavek, prstencové a aurikulární (Cole 2010). V úrovni ohybu přechází chrupavka ušního boltce v polokruhovitou chrupavku, k níž se vazivově připojuje samostatná prstencová chrupavka (*cartilago anularis*) (König & Liebich 2002). Dále se zde na střední stěně nachází *anthelex*, což je nízký příčný hřeben a čtyřúhelníková deska chrupavky, *tragus*, která vytváří laterální hranici zvukovodu a leží naproti *anthelexu*. Nakonec se zde nalézá *antitragus*, což je tenký, podlouhlý ohraněný kus chrupavky, nacházející se kaudálně k *tragusu*, od kterého je oddělený intertragickou incizí. Do této anatomické oblasti se vkládá otoskop nebo otoendoskop při otoskopickém vyšetření (Cole 2010). Dorsální a kaudální okraj vnějšího zvukovodu se kostěně spojuje se šupinou spánkové kosti (Najbrt et al. 1973). Celý vnější zvukovod je vystlán vrstveným dlaždicovým epitelem (König & Liebich 2002) a je pokryt kůží s mazovými žlázami (*glandulae ceruminosae*), které vylučují ušní maz (*cerumen*) (Marvan et al. 1992). Dále jsou zde uloženy apokrinní tubulózní žlázy obsahující pigment. Sekret z tubulózních žláz je řídký a zabraňuje zahuštění sekretu mazových žláz v pevný ušní maz. U psů a koček jsou tyto žlázy uloženy v celém vnějším zvukovodu, na rozdíl od koní a přežvýkavců, kteří mají tyto žlázy uloženy v chrupavčitém oddílu zvukovodu (König & Liebich 2002). U psů se pH ušního epitelu pohybuje od 4,6 až do 7,2. Průměrně se pH u fen udává okolo 6,2 a u psů 6,1, ale u psů s chronickým zánětem středního ucha stoupá pH na 6,0 až 7,4 (průměrně na 6,8) naopak u psů s akutním zánětem klesá na 5,2 až 7,2 (průměrně na 5,9) (Cole 2010). U zdravých psů se mikroflóra zvukovodu skládá z kolaguláza – pozitivních i negativních *Staphylococcus* spp., β -hemolytických *Streptococcus* spp., *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* a dalších bakterií. Poslední původce je izolován pouze u 1 % zdravých psů a až u 20 % psů s chronickým zánětem zvukovodu (Petrov et al. 2013). Ve studii Ngo et al (2018) bylo ve vzorcích zdravých psů identifikováno celkem 22 kmenů, z nichž nejvíce zastoupené byly *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes* a *Fusobacteria*. Na úrovni čeledi byly nejhojnější *Enterobacteriaceae* (*Phylum Proteobacteria*; třída *Gamma Proteobacteria*; řád *Enterobacteriales*), představující 15 % z celkových identifikovaných taxonů. *Neisseriaceae*, *Moraxellaceae*, *Corynebacteriaceae* a *Staphylococcaceae* byly nalezeny (mezi 5 % až 10 % zastoupených čeledí). *Escherichia* byla nejhojnějším rodem ve většině vzorků, s průměrem 14,8 %, v rozmezí od 0,08 % do 35,6 %, následovaná *Conchiformibius*, *Corynebacterium* a *Staphylococcus* (mezi 5 % a 10 % zastoupených rodů). Pro globální extrakci bakteriální DNA byly použity ušní výtěry. V1-V3 hypervariabilní 16S rDNA amplikonové knihovny byly připraveny pro každý vzorek a sekvenovány pomocí MiSeq Illumina sekvence (V3 kit). Taxonomické přiřazení a shlukování bylo provedeno pomocí Mothur a databáze SILVA. Což potvrzuje i studie Kasai et al. (2021), která se zabývala změnami mikrobioty zvukovodu psů s *otitis externa*, která ze vzorků od zdravých psů identifikovala 29 kmenů z nichž byly nejvíce zastoupené kmény *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Cyanobacteria* a *Actinobacteria*. Z rodů byly

nejhojněji zastoupené *Staphylococcus* (kmen *Firmicutes*) a *Corynebacterium* (kmen *Actinobacteria*) viz obrázek 1. Gen 16S rRNA byl též sekvenován pomocí Illumina MiSeq. Z hub neboli *mycobiot* je zde nejhojněji zastoupen kmen *Ascomycota* a druhý v pořadí je kmen *Basidiomycota* (Pereira & Clemente 2021). Do kmene *Ascomycota* se řadí kvasinky, z kterých se běžně v uchu vykytuje *Candida albicans* a *Malassezia pachydermatis* (Sihelská et al. 2017), která je zároveň nejčastější kvasinka dávána do souvislosti se zánětem zevního zvukovodu (*otitis externa*) (Bismarck et al. 2020). Ve studii Tang et al. (2020) byly ještě identifikované taxony hub *Capnodiales* v zastoupení 3,7 % a *Pleosporales* v 1 % z celkových 128 vzorků zdravých psů. Ušní výtěry byly analyzované pomocí sekvenování nové generace (NGS). Na zánětech se podílí mimo jiné i ušní roztoč strupovka ušní (*Otodectes cynotis*) (více informací o původcích otitid u psů viz kapitola – Původci otitid u psů (Petrov et al. 2013). Další parazité, kteří se mohou objevit v uších psa jsou *Sarcoptes scabiei* (Svobodová et al. 2013), *Demodex canis* a *Neotrombicula autumnalis*. Larvy *Neotrombicula autumnalis* se často vyskytují v tzv. Henryho kapse, což je dvojitá kožní duplikatura na kaudálním okraji ucha (Svoboda et al. 2000).



Obrázek 1: Relativní početnost převažujících taxonů v ušní mikrobiotě psů s *otitis externa* (modrý sloupec) a kontrolní skupiny zdravých psů (růžový sloupec). Z grafu vyplývá, že u zdravých psů je v ušní mikrobiotě nejhojněji zastoupen rod *Staphylococcus*, *Corynebacterium* a *Pseudomonas*. Znak * znázorňuje $P < 0,05$ - Wilcoxon rank-sum test. (Převzato z Kasai et al. 2020)

3.1.1.3 Bubínek

Bubínek je tenká, trojvrstvá (Marvan et al. 1992) a poloprůhledná membrána rozdělená na Shrapnellovou membránu (*pars flaccida*), která je malá, růžová a volně připojená oblast, tvořící horní kvadrant bubínku a obsahuje malé krevní cévy a pevnou část (*pars tensa*), která má tenkou, tuhou a šedou strukturu a zabírá zbytek membrány. *Manubrium malleus* se připojuje k mediální straně *pars tensa* je to tzv. rukojeť srostlá s bubínkem ve *stria mallearis* (Cole 2010), která se nachází mezi vnějším zvukovodem a středním uchem (König & Liebich 2002). Přesněji pod úhlem 45 stupňů vůči středové ose horizontální části zevního zvukovodu (Cole 2010). Tvar bubínku je kruhovitý nebo oválný (Marvan et al. 1992) a je tvořen třemi vrstvami. Vnější vrstvou (*stratum cutaneum*), která je tvořena plochým dlaždicovým epitelem, neobsahuje chlupy, žlázy ani pigment (König & Liebich 2002) a je velmi tenká a navazuje na kůži vnějšího zvukovodu (Marvan et al. 1992). Střední vazivovou vrstvou, která je uložena pod vnější vrstvou, znázorňuje kolagenně-elastický systém vláken (*stratum proprium*). Střední vrstvu lze ještě rozdělit vrstvu radiálních vláken, kde vlákna probíhají radiálně a na vrstvu cirkulárních vláken, která je obrácená směrem k bubínkové dutině, cirkulárně (König & Liebich 2002). Vnitřní krycí slizniční vrstva je původem z hltanového váčku, stěny hltanu a vnější vrstevnatý dlaždicový epitel pochází z ektodermu první hltanové rýhy a technicky je součástí zevního zvukovodu a centrální vrstva je tvořena vazivovou tkání (Cole 2010). Vnitřek bubínku je vyplněn sliznicí středního ucha, která je zevnitř pokryta jednovrstevným dlaždicovým epitelem (Marvan et al. 1992). Tento epitel přechází na povrch následující první sluchové kůstky, kladívka (*malleus*), která svým úponem bubínek vztáhne do bubínkové dutiny ve tvaru tupého kužele (König & Liebich 2002). Hlavní funkcí bubínku je přenos chvění na sluchové kůstky, tím že se rozkmitává zvukovými vlnami (Marvan et al. 1992).

3.1.2 Střední ucho

Střední ucho je tvořeno vzduchem naplněnou bubínkovou dutinou se sluchovými kůstkami (Marvan et al. 1992) a bubínkovými membránami (Cole 2010). Od vnitřního ucha je separované membránami uzavírající kruhové hlemýžďovité okénko (kochleární) a oválné předsíňové okénko (vestibulární). Dále se zde nachází Eustachova trubice, která propojuje střední ucho s hltanem. Hlavní funkcí je umožnit vyrovnat tlaku mezi nosohltanovou a uzavřenou středoušní dutinou (Reece 2011).

3.1.2.1 Bubínková dutina

Bubínková dutina (*bulla tympanica*) se nachází ve spánkové kosti. Vnitřek je vyplněný vzduchem (Marvan et al. 1992) a připomíná velký útvar, který je ze stran oploštělý a na ventrální straně zaoblený. Vystupuje podél laterální plochy těla týlní kosti (Najbrt et al. 1973). Je tvořena jednou nebo více dutinami (König & Liebich 2002). Na spodu se nalézá bubínkový otvor sluchové trubice, který propojuje hltan s dutinou středního ucha, čímž dochází k vyrovnání atmosférického tlaku ve vnějším zvukovodu, který má vliv na bubínek a tlaku vzduchu ve středním uchu (Marvan et al. 1992). Bubínková dutina je zevnitř vystlána jednovrstevným plochým epitelem, který pokrývá sluchové kůstky, bubínek, oválné okénko a

ventrální úseky bubínkové dutiny (König & Liebich 2002). Na povrchu je pokryta tenkým kostěným listem a uvnitř je dělena do drobných sklípků. Na mediální straně je nepravidelně zprohýbaná, na dorsální straně je ohraničena širokou šterbinou *fisura petrotympanica* a na laterální straně je dutina hladká. *Fisura petrotympanica* je na dorsálním okraji velmi úzká a uprostřed své délky proniká do bubínkové části čímž vytváří *canaliculus chordae tympani* pro vstup nervového svazku *tympani* (Najbrt et al. 1973). Vazivový podklad je bohatý na kapiláry a nervy (König & Liebich 2002). Dále se zde nachází kostní předěl, který odděluje střední ucho od vnitřního a dva otvory: Hlemýžďové okénko, které je zakryté druhotným bubínkem a předsíňové okénko, které je zakryté třmínkem (Marvan et al. 1992).

3.1.2.2 Sluchové kůstky

Ve středním uchu směrem od bubínku se nalézají tři sluchové kůstky (*ossisula auditus*): kladívko, kovadlinka a třmínek (Reece 2011). Jsou to lamelární kosti, ve kterých zůstali částečně vloženy zbytky chrupavky (König & Liebich 2002). Jsou vzájemně kloubně spojené a uloženy v řadě od bubínku až k předsíňovému okénku, představují tzv. pákový mechanismus, který přenáší chvění bubínku na perilymfu vnitřního ucha (Marvan et al. 1992). Sluchové kůstky, přenášejí a zesilují vibrace vzduchu z bubínku do vnitřního ucha (Cole 2010). Zvukové vlny jsou tedy přenášeny z většího povrchu bubínku na menší plochu membrány předsíňového okénka. (Reece 2011). Sluchové kůstky a bubínek společně představují aparát, který vede, a přitom zesiluje zvukové vlny (König & Liebich 2002). Nacházejí se zde i dva malé žíhané svaly: Třmínkový sval, který se upíná na třmínek a napínač bubínku s úponem na bubínek, jejich funkcí je ovládání napětí v bubínku (Marvan et al. 1992) v případě, že je jedinec vystaven nadměrně silnému zvuku svalová vřetenka uvnitř těchto svalů reagují na protažení svalu, tím že se smrští a následně se sníží nadměrný pohyb sluchových kůstek. Rozsah protažení svalu je ovlivněn hlasitostí neboli intenzitou zvuku (Reece 2011). Sluchové kůstky jsou udržovány ve své poloze vazy a slizničními závěsnými řasami. Zajímavostí je, že u mladých zvířat se mezi kovadlinkou a třmínkem může objevovat samostatná čočkovitá kůstka (*os lenticulare*) (König & Liebich 2002).

Kladívko (*malleus*) je tvořeno rukojetí a hlavičkou a je pevně spojené s vazivovou vrstvou bubínku. Místo jeho úponu je v *umbo membranae tympani* je ze vnějšího zvukovodu patrné jako *stria mallearis* (König & Liebich 2002). Rukojetí je spojené s bubínkem a hlavička se kloube s tělem kovadlinky (*incus*), která má krátké a dlouhé rameno a dvě těla. Ke stropu bubínkové dutiny je vazivem připojené krátké rameno a dlouhé rameno se kloube s další sluchovou kůstkou (Marvan et al. 1992). Rukojetí kladívka dochází k přenosu mechanických kmitů bubínku, způsobené nárazy zvukových vln na další sluchové kůstky (König & Liebich 2002). Kovadlinka (*incus*) se nachází mezi kladívkem a třmínkem (Heine 2004) a je spojena s kladívkem v kloubu *articulatio incudomallerae*. Má dvě ramena, jedno dlouhé a jedno krátké. K dlouhému ramenu kovadlinky je syndezmoticky (často však i synostoticky) připojena *os lenticulare*, která od něho odstupuje v pravém úhlu a která je zároveň vybavena kloubní ploškou pro hlavičku třmínku (*caput stapedis*). Kovadlinka se v tomto místě spojuje s třmínkem v kloubu *articulatio incudostapedis* (König & Liebich 2002). Třmínek je pevně připevněný prstencovým vazem k vestibulárnímu okénku (Heine 2004). Má hlavičku a dvě ramena, která se nacházejí v základně třmínku (*basis stapedis*).

Oválná základna třmínku je na svém okraji připevněna pomocí *lig. anulare stapedis do fenestra vestibuli* (König & Liebich 2002). S výjimkou třmínku, který je připojený k vestibulárnímu okénku je každý z těchto kloubů synoviální (Heine 2004).

3.1.3 Vnitřní ucho

Vnitřní ucho neboli *auris interna* je složitý orgán (König & Liebich 2002), který se nalézá ve skalní kosti (Marvan et al. 1992) a je složený z uzavřeného systému membránozních tenkostěnných váčků a kanálků blanitého labyrintu (*labyrinthus membranaceus*). V tomto labyrintu se nachází: blanitý hlemýžď (*ductus cochlearis*) se smyslovým epitelem pro sluch a vestibulární aparát (*apparatus vestibularis*) jako receptorový orgán pro smysl rovnováhy a pohybu (König & Liebich 2002). Podle funkce se tedy vnitřní ucho dělí na vestibulární část (statokinetická), jejichž funkcí je udržení rovnováhy a na kochleární neboli sluchovou část se sluchovou funkcí (Reece 2011). Ke vnímání rovnováhy a pohybu ve vestibulární části slouží epiteliální buňky diferencované v sekundární smyslové buňky v polokruhovitých kanálcích (König & Liebich 2002). V kochleární části se nachází větev VII. hlavového nervu (předsínohlemýžďový nerv) neboli hlemýžďový kořen, který vstupuje do vestibulární části (Reece 2011) a v blanitém hlemýždi se nachází Cortiho orgán (sídlo sluchového smyslu). Prostory blanitého hlemýžďe a vestibulárního aparátu jsou propojeny prostřednictvím *ductus reuniens* (König & Liebich 2002).

3.1.3.1 Kostěné bludiště (labyrint)

Skládá se z tří polokruhovitých kanálků, předsíně a hlemýžďe (Marvan et al. 1992) a je zde uložena sluchová část vnitřního ucha (Reece 2011). Je tvořena skalní částí spánkové kosti (*pars petrosa ossis temporalis*) a je prostornější než blanité bludiště i přesto, že jej tvarem a rozměry připomíná. V kostěném bludišti se nachází: předsíň (*vestibulum*) neboli centrální dutina, kaudodorzálně navazující polokruhovité kanálky (*canales semicirculares ossei*) a rovnostranně připojený hlemýžď (*cochlea*) (König & Liebich 2002).

Polokruhovité kanálky mají počátek, ale i konec v předsíni (Reece 2011). Před vývodem do předsíně se rozšiřují v ampulu (*ampulla membranacea*) (Marvan et al. 1992). Sliznice zde zesiluje v příčnou lištu vyčnívající do lumina a dochází tak k vytvoření základu pro receptorové pole polokruhovitých kanálků, *crista ampullaris*. Receptorové pole působí jako senzorický receptorový orgán (neuroepitel) a obsahuje smyslové a podpůrné buňky. Na povrchu *crista ampullaris* je umístěna zesílená a snadno pohyblivá vrstva glykoproteinů (*cupula*). Každá změna tvaru či posun kupuly určuje pohyb endolymfy čímž umožňuje vnímání pohybu těla (König & Liebich 2002).

Hlemýžď je spirálovitě stočený kostní kanálek (*canalis spiralis cochleae*) kolem osového kužele. U šelem obsahuje tři spirálovité závity kolem centrální kostěné osy (*modiols*), u koně dva a půl, u skotu tři a půl a prasete čtyři (König & Liebich 2002). Nachází se zde kostěná spirálovitá ploténka a brázdička, v níž se nachází spirálovitý ganglion (*ganglion spirale*), který obsahuje těla smyslových buněk sluchového nervu (*n. cochlearis*) (Marvan et al. 1992). V kostěném hlemýždi (*cochlea*) se dále nacházejí tři blanité kanálky (*scala vestibuli*, blanitý hlemýžď (*ductus cochlearis*), *scala tympani*), které se obtácejí kolem kostěné osy od základny hlemýžďe až k jeho hrotu (König & Liebich 2002).

Uvnitř kostěného bludiště se dále nalézá blanité bludiště (labyrint) (Reece 2011). Mezi blanitým a kostěným bludištěm se nachází štěrbinovité prostory (*spatia perilymphatica*, perilymfatické prostory) vyplněné tekutinou (König & Liebich 2002).

3.1.3.2 Blanité bludiště

Blanité bludiště se nalézá v kostěném bludišti, od kterého je, ale zároveň částečně oddělené prostorem vyplněným tekutinou (perilymfou), která má podobné složení jako mozkomíšní mok (Marvan et al. 1992). Je bohatá na sodné ionty a chudá na draselné (König & Liebich 2002). Perilymfa s mozkomíšním mokem volně cirkuluje přes endolymfatický kanálek, a jelikož mají podobné složení a v důsledku propojení mozkových plen může dojít k přenosu infekcí z vnitřního ucha do mozkových plen což způsobí zánět mozkových blan (Reece 2011). Stěna blanitého bludiště je tvořena vazivovou blankou, která následně přechází ve smyslový epitel (Marvan et al. 1992). Blanité bludiště je vyplněné endolymfou, která je vylučována vaskulární tkání na vnější ploše *Scala media*, jejíž složení je podobné jako u intracelulární tekutiny (nízký obsah sodíku a vysoký obsah draslíku) (Reece 2011).

Dělí se na sluchovou část, která je tvořena blanitým hlemýžděm a na statickou část, která je tvořena vejčítým a kulovitým váčkem a polokruhovitými kanálky (Marvan et al. 1992). Jsou tedy součástí vestibulárního systému. Vejčítý i kulovitý váček se nachází v předsíni a jsou propojeny se spojovací chodbičkou (Reece 2011). Dále jsou zde statické hřebeny, které jsou uloženy v ampulích polokruhovitých kanálků a umožňují vnímání pohybu (Marvan et al. 1992).

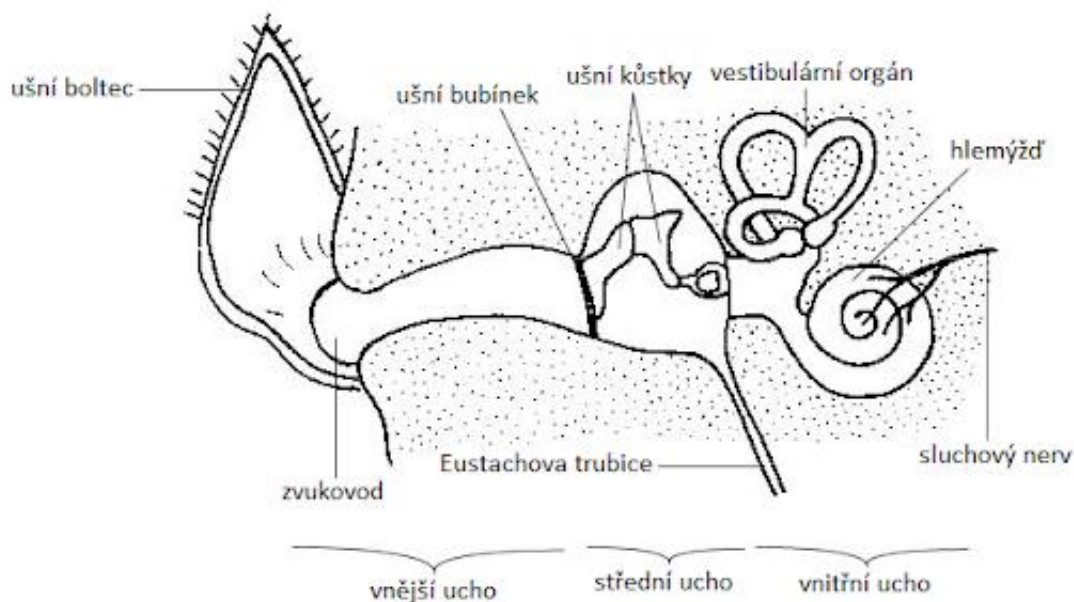
Nakonec se zde nachází smyslový epitel statistických skvrn a smyslový epitel polokruhovitých kanálků. Smyslový epitel statistických skvrn je složen z podpůrných a smyslových buněk, které jsou vláskové a mají baňkovitý tvar a z jejich užšího apikálního konce vychází trs dlouhých čivých výběžků (Marvan et al. 1992). Vláškové buňky jsou mechanicky ovlivněné endolymfou, která se při pohybu hlavou v důsledku setrvačnosti opožděje, a z toho důvodu jsou také stimulovány při rotačních pohybech hlavy. Teprve poté co se pohyb hlavy zastaví se endolymfa začne pohybovat, což způsobí stimulaci smyslových buněk v opačném směru a nastane utlumení dalšího přizpůsobování (Reece 2011). Spojení mezi endolymfou s hlemýžděovým váčkem a dalšími částmi blanitého hlemýždě znázorňuje bezpečnostní záklopku, která napomáhá k udržení stálého tlaku endolymfy (Reece 2011). Pohybem hlavy nebo těla se rozpohybují výběžky smyslových buněk, čímž vznikají vzruchy, které se přenášejí do mozku a tím dojde k vyvolání reflexních pohybů, které zajistí zachování tělesné rovnováhy (Marvan et al. 1992).

3.1.3.3 Blanitý hlemýžď

Blanitý hlemýžď je uvnitř kostěného hlemýždě a má tvar spirálovitě stočeného kanálku. Nachází se na spodinové blance s úponem na spirálovitou ploténku osového kužele (Marvan et al. 1992). Je složen ze tří spirálovitě stočených kanálků: *Scala tympani* (dolní oddíl), *scala media* (střední část) a *scala vestibuli* (horní oddíl). Kromě malého spojení na vrcholu hlemýždě jsou od sebe vzájemně oddělené (Reece 2011). Vnitřek blanitého hlemýždě je vyplněn endolymfou a vystlán epitelem, který se diferencuje ve smyslový epitel (Marvan et al. 1992). Prostřednictvím perilymfy a posléze endolymfy se zvukové vlny ze středního a

zevního ucha dostávají k oválnému okénku (*fenestra vestibuli*) a vestibulu vnitřního ucha a čímž jsou přenášeny na vnitřní úseky sluchového orgánu (König & Liebich 2002). Podél *scala media* jsou vysoké cylindrické buňky a uvnitř je Cortiho orgán, což je složitý sluchový receptor tzv. spirální (Marvan et al. 1992). Jedná se o složitý smyslový epitel, utvořený podpůrnými a smyslovými buňkami s vlásky (Reece 2011), na jejichž konci se nacházejí dendrity sluchového nervu (Marvan et al. 1992). Na Cortiho orgán volně přiléhá rosolovitá membrána (*membrána tectoria*) a uvnitř Cortiho orgánu dochází k přeměně zvukových vln na nervové impulzy, které se následně dostávají do mozkové kůry, kde dávají vznik sluchovým vjemům (Reece 2011).

Na povrchu smyslového epitelu se nachází želatinózní krycí membrána (*membrána basilaris*), která se na jedné straně upíná na kostní spirálovitou ploténku a na druhé straně se volně dotýká smyslových buněk (Marvan et al. 1992). Nacházejí se zde nervové vstupy do Cortiho orgánu. Umístění stimulované části Cortiho orgánu na *scala media* od základny osového kužele hlemýždě až po jeho vrchol určuje, jaká frekvence zvukových vln je právě vnímána (König & Liebich 2002). Nízkofrekvenční vlny se šíří na dlouhou vzdálenost, než dosáhnou svého rezonančního místa a zaniknou, na rozdíl od vysokofrekvenčních zvukových vln, které se šíří pouze na krátkou vzdálenost po bazilární membráně, než dojde k zániku. Psi vnímají frekvence až do 50 000 cyklů za sekundu na rozdíl od člověka, který je limitován přibližně mezi 20 až 20 000 cykly za sekundu. Z toho důvodu lidé neslyší vysokofrekvenční psí píšťalky, ale psi na ně reagují (Reece 2011).



Obrázek 2: Anatomické znázornění psiho ucha (převzato z <https://www.canina.cz/>)

Otitidy u psů

Otitidy jsou definovány jako zánět zvukovodu, které se podle postižených anatomických struktur dělí na zevní, střední a vnitřní otitidy. Nejčastěji je u psů pozorován zánět zevního zvukovodu, který zahrnuje boltce a horizontální i vertikální zvukovody (Neves et al. 2018). Ušní infekce patří mezi deset nejčastějších důvodů návštěv veterinárních klinik (Petrov et al. 2013). Velké množství faktorů podílejících se na zánětu *otitis externa* a *otitis media* se rozděluje na faktory primární, predisponující a přetrvávající (Popovic 2005). Primární faktory mohou být způsobeny bakteriemi, kvasinkami, parazity nebo cizím předmětem (Bajwa 2019). Otitidy způsobené cizím předmětem jsou častými příčinami v letních měsících, kdy nejčastějšími cizími tělesy jsou semena trav (Svoboda et al. 2000). Mohou to být, ale i jakékoliv předměty malých rozměrů (Popovic 2005). Do primárních faktorů dále patří tzv. onemocnění z přecitlivělosti (atopická dermatitida, potravinová a kontaktní alergie), které je zároveň nejčastějším primárním faktorem vedoucím k otitidám u psů (Bajwa 2019). Přibližně 10 % psů má atopickou dermatitidu a z toho přibližně 17 až 55 % má ve své klinické symptomatologii postižení uší a u 3 až 5 % atopických psů je zánět ucha jediný klinický příznak onemocnění (Popovic 2005). Ale i alergie na krmivo se může projevat postižením uší a poruchy keratinizace mohou způsobit kvalitativní a kvantitativní změny v počtu a sekreci žláz (Perry et al. 2017). Mezi predisponující faktory se řadí: stenotické uši (tzn. se zúženým profilem zvukovodů) (Bajwa 2019), vyskytující se například u plemen šarpej nebo rotvajler (Perry et al. 2017), uši s nadměrnou srstí, zvýšená tvorba ušního mazu, časté čištění, ušní masy, změny vnější teploty a vlhkosti prostředí (Bajwa 2019). Například čistokrevná plemena psů, kteří mají převislé ušní boltce a chlupaté ušní kanálky (např. pudl nebo kokršpaněl) jsou více náchylná k ušním infekcím na rozdíl od jiných plemen psů a pokud mají psi vztyčené uši, bez ohledu na přítomnost chlupů ve zvukovodu, mají též nižší riziko zánětu vnějšího ucha (Cole 2010). Přetrvávající faktory na rozdíl od primárních a predisponujících faktorů neinicují zánět jako takový, ale způsobují zhoršení zánětlivého procesu a udržení onemocnění ucha (Bajwa 2019). U psů také existují i plemenné predispozice ke vzniku ušního zánětu, u řady z nich není vyvolávající faktor jasný. Mezi predisponovaná plemena patří kokršpanělé, bretaňští ohaři, west highland white teriéři, zlatí retrívři, foxteriéři, labradorští retrívři, miniaturní pudlové, afgánští chrti, francouzští buldočci, skotští teriéři, maltézští psíci a němečtí ovčáci (Pye 2018).

3.1.4 Zánět zevního zvukovodu (*otitis externa*)

Zánět zevního zvukovodu je běžným zánětlivým onemocněním u psů (Bajwa 2019). Důvodem může být i to že kvasinky (*Malassezia* spp.) a bakterie (*Staphylococcus* spp. a *Bacillus* spp.) se v uchu běžně vyskytují (viz kapitola 3.3.1.2), čímž v případě přemnožení může docházet k zánětlivým reakcím uvnitř zvukovodu (Neves et al. 2018) a to i přesto, že jsou bakterie a kvasinky oportuniste, což znamená že nejsou primárními patogeny způsobujícími *otitis externa* (Perry et al. 2017). V běžné praxi se procento případů u psů s příznaky *otitis externa* pohybuje od 7,5 % do 16,5 % (Pye 2018). Potvrzuje to i Perry et al. (2017) ve své studii, kde bylo diagnostikováno 320 případů *otitis externa* u 2012 psů na třech veterinárních klinikách v Kanadě, což odpovídá 15,9 % případů. *Otitis externa* se může

vyskytovat v akutní nebo chronické podobě a může být přetrvávající nebo recidivující (Ebani et al. 2023).

3.1.4.1 Etiopatogeneze

Otitis externa je velmi často způsobena kvasinkami nebo bakteriemi, případně jejich kombinací (podrobnější přehled v kapitole 3.1.6 - bakterie a 3.1.7 - kvasinky) (Petrov et al. 2013). Příkladem je studie z Brazílie z roku 2018, zabývající se *in vitro* a *in vivo* účinností esenciálního oleje z tea tree na *otitis externa* u psů, který byl způsobený bakteriemi a kvasinkami. U 28 psů byla provedena mikrobiologická vyšetření z každého ucha, celkem bylo vyšetřeno 56 vzorků, kdy 62,5 % psů mělo infekci způsobenou kombinací kvasinek a bakterií, 33,9 % bakteriemi a 3,6 % kvasinkami. Nejčastěji izolované mikroorganismy byly *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus mirabilis* a kvasinky *Malassezia pachydermatis* (Neves et al. 2018). Na vzniku *otitis externa* se mohou, ale podílet i parazité, například parazitický roztoč strupovka ušní (*Otodectes cynotis*) nebo cizí předmět uvíznutý ve zvukovodu (Kasai et al. 2021). Nejběžnější příčinou *otitis externa* je ale atopická dermatitida, která onemocnění způsobuje až v 60 % případů. Na druhé místo se řadí již zmíněné bakterie a třetí příčku zaujímají kvasinky *Malassezia pachydermatis* (Ngo et al. 2018). Je to, ale pravděpodobně velmi individuální a názory na interpretaci nálezů a příčin se různí. Např. Pereira a Clemente (2021) uvádí, že nejčastějším patogenem způsobující *otitis externa* jsou kvasinky *Malassezia pachydermatis* a až posléze jsou uvedené bakterie (*S. pseudintermedius* a *Pseudomonas aeruginosa*); více informací o původcích otitid viz kapitola – Původci otitid u psů.

Vznik *otitis externa* je ovlivněn primárními, predisponujícími a přetrvávajícími faktory, které jsou uvedené v kapitole 3.2. (Neves et al. 2018). Mezi další příčiny patří časté mytí (voda v uších), poranění při manipulaci (čištění uší), dlouhotrvající antibiotická léčba (Petrov et al. 2013), okolní teplota a relativní vlhkost vzduchu. Zvýšením vlhkosti vzduchu ve zvukovodu může dojít ke změknutí ušního kanálku, čímž dojde k narušení obranyschopnosti těla a přemnožení mikroorganismu a výslednému zánětu (Bajwa 2019). Nakonec i obsah určitých esenciálních kyselin může též způsobit podráždění a zánětlivou reakci, čímž dojde k vytvoření ideálních podmínek pro namožení kvasinek a bakterií (Svoboda et al. 2000).

3.1.4.2 Symptomatologie

Typickými klinickými příznaky jsou bolest, zápach, zánět, exsudát (zánětlivý extravaskulární výpotek) viz obrázek 3, pruritus (svědění), třes hlavou (Neves et al. 2018), bolest při palpaci (prohmatávání postižené oblasti), erytém (červené zabarvení kůže) a otok ucha nebo v okolí zvukovodu (Perry et al. 2017). Dále můžeme na boltci pozorovat projevy šupinatění, tvorbu krust, alopecii, ulámanou srst, hyperpigmentaci a již zmíněný erytém s otokem (Bajwa 2019). Při *otitis externa* dochází ke změnám i uvnitř zvukovodu, jako je žlázová hyperplazie, rozšíření žláz, epiteliální hyperplazie a hyperkeratóza, které způsobují zvýšenou produkci ušního mazu (Ebani et al. 2023). Veškeré příznaky se mohou objevit jednostranně i oboustranně (Petrov et al. 2013) a obvykle je v postiženém uchu či uších zaznamenán více než jeden abnormální nález (Bajwa 2019). Při onemocnění zánětu zevního

zvukovodu dochází k vyšší lokální vlhkosti a pH, čímž predisponuje k sekundární ušní infekci (Ebani et al. 2023).



Obrázek 3: *Otitis externa* způsobený kvasinkami *Malassezia pachydermatis* s viditelným exudátem. (převzato z Peano et al. 2020)

3.1.4.3 Diagnostika

Diagnóza začíná pozornou anamnézou a klinickým vyšetřením zvířete (vizuální prohlídka a palpace zvukovodu) (Bajwa 2019). Přesná anamnéza určuje, zda může být přítomen zánět zevního zvukovodu, ale může také pomoci identifikovat primární faktory ve vývoji otitid (Pye 2018). Dále se provádí otoskopie, cytologické vyšetření sekretu a mikrobiologická kultivace (Neves et al. 2018). Cytologické vyšetření ušního sekretu je jedním z nejužitečnějších diagnostických testů, který pomáhá při léčbě otitid u psů. Kromě infekčního agens se ve vzorku mohou objevit i bílé krvinky, které svědčí o reakci imunitního systému jedince na infekci (Pye 2018). Za pozitivní případ mikrobiální *otitis externa* se považuje přítomnost minimálně tří infekčních agens v zorném poli (1000 × zvětšení) (Perry et al. 2017). Při otoskopickém vyšetření je klíčovou částí zhodnotit stav bubínku, pakliže je to z důvodu zánětu obtížné je vhodné ponechat hodnocení bubínku na později (Bajwa 2019). Dále se hodnotí typ lézí, výtok v zevním zvukovodu, zda je kanálek stenózní a jestli se zde nenachází cizí těleso (Pye 2018). Následně po vyčištění zvukovodu se mohou udělat další diagnostické testy (Svoboda et al. 2000), jako jsou například rentgenové snímky, počítačová tomografie (CT) nebo magnetická rezonance (MRI), které se sice běžně nepoužívají, ale mohou být užitečné v případě chronického zánětu nebo zánětu středního ucha (Bajwa 2019).

U pacienta, který má bolesti, může být zapotřebí sedace nebo anestezie, aby bylo možné provést důkladné vyšetření (Pye 2018).

3.1.4.4 Léčba

Základem úspěšné terapie zánětu zevního zvukovodu i středního ucha by mělo být rozpoznání, eliminace nebo kontrola primárních faktorů, například potravinové alergie, poruchy keratinizace, napadení parazity nebo atopie (Bajwa 2019). V případě, že se u pacienta zjistí atopie, potravinová alergie nebo hypertyreóza, může samotná léčba zmíněných onemocnění odstranit nebo zlepšit primární příčiny zánětu zevního zvukovodu (Gotthelf 2004). Před zahájením terapie je vhodné udělat i kultivační testy a testy citlivosti z důvodu určení sérové hladiny léků potřebné k usmrcení patogenních organismů (Pye 2018). Léčba samotné *otitis externa* by měla být zahájena až po cytologické vyšetření. Většinou se zakládá na vyčištění zvukovodu a následném nasazení antimykotik, antibiotik (Neves et al. 2018), protizánětlivých léků nebo chemoterapeutik dle citlivosti etiologického agens (Petrov et al. 2013). Většina psů se zánětem zevního zvukovodu bude mít prospěch z protizánětlivé léčby, bez ohledu na její příčinu (Bajwa 2019). Vyčištění zvukovodu před podáním léčivého přípravku je velmi podstatné, jelikož při nadbytku ušního mazu nebo exsudátu nedochází ke kontaktu léku s ušním epitelem a infekčním agens, lokální terapie by byla neúčinná (Neves et al. 2018). Čištění uší také pomáhá narušit nebo rozbít biofilm, který může chránit patogeny, před vhodnou terapií. Jelikož je onemocnění uší velmi bolestivé, je vhodné krátkodobě podávat pacientovi glukokortikoidy ke snížení bolesti a otoku. Glukokortikoidy mohou také pomoci narušit tvorbu biofilmu a zabránit rozvoji chronických ušních změn (Bajwa 2019). Je možné je podávat ještě před samotným otoskopickým vyšetřením v případě, že má pacient velké bolesti a není možné jej vyšetřit (Pye 2018). Lokální antimikrobiální léčba je v případě zánětu zevního zvukovodu preferována před celkovou terapií (Ebani et al. 2023), systémová antibiotická léčba se při zánětu zevního zvukovodu nedoporučuje (Bajwa 2019). V případě *otitis externa* je možné zařadit jako alternativní léčbu esenciální silice, které v řadě studií vykazují pozitivní výsledky při léčbě *otitis externa* u psů, více o léčbě esenciálními silicemi v kapitole – využití esenciálních silic při léčbě otitid u psů (Ebani et al. 2023). Na konci předepsané léčby by se mělo zopakovat cytologické vyšetření, aby se ověřilo, zda došlo k úplnému vyléčení *otitis externa* i případných sekundárních infekcí (Pye 2018). V případě, že nedojde ke včasné léčbě, hrozí rozvoj chronického zánětu zevního ušního epitelu a může dojít až k prasknutí bubínku, což způsobí zánět středního ucha a následně i zánět vnitřního ucha (Neves et al. 2018).

Jako chronický zánět zevního ušního epitelu se rozumí přetrvávající nebo opakující se ušní zánět trvající 3 měsíce a víc (Bajwa 2019). Vede k proliferaci kvasinek a bakterií (Neves et al. 2018) a způsobuje na kůži zvukovodu řadu patologických změn, například ztlustění kůže, které způsobí stenózu zvukovodu, čímž se snižuje možnost efektivního čištění zvukovodu a lokální medikace (Svoboda et al. 2000). Dále dochází ke tvorbě polypů a k ruptuře bubínku, což způsobuje chronickou bolest a může vést až k nevratné hluchotě (Neves et al. 2018). K ztrátě sluchu může docházet již při *otitis externa*, ale chronický zánět je spojován s vyšším stupněm sluchové ztráty (Bajwa 2019). V důsledku opakované terapie

často dochází k antimikrobiální rezistenci, pokud jsou mikroorganismy přidruženým faktorem (Neves et al. 2018).

Při chronické zánětu se do lumenu zvukovodu dostává větší množství keratinového detritu (hyperkeratóza), změny, ke kterým dochází v reakci na chronický zánět, mohou dále zahrnovat glandurální hyperplazii, dilataci žláz a epiteliální hyperplazii. Z důvodu změn v zevním zvukovodu dochází ke zvýšené produkci cerumenu, což přispívá ke zvýšené lokální vlhkosti a pH, a tím je ucho predisponováno k sekundárním infekcím (Bajwa 2019). Chronický zánět vede ke zvrhodování sliznice a rozpadu epiteliálních výstelek. *Lamina propria* se v reakci na zánět ztlušťuje, čímž dochází ke zvýšení vaskularity a začne se tvořit granulační tkáň a edém. V případě, že bude vředování, infekce a tvorba granulační tkáně pokračovat může dojít až ke zničení okolní kosti (Gotthelf 2004). U pacientů s chronickým průběhem, kde došlo k perforaci ušního bubínku anebo ulceracím zvukovodu může být většina prostředků na čištění uší a antimikrobiálních látek ototoxická (poškozovat části vnitřního ucha nebo sluchového nervu) pro struktury středního nebo i vnitřního ucha, čímž dochází k poruchám rovnováhy a ztráty sluchu u psů (Neves et al. 2018).

Lokální i celková terapie při chronickém zánětu je komplikovaná, často je obtížnější dosáhnout dostatečné koncentrace léčiv ve změněných tkáních. Většinou se indikuje antibiotická systémová terapie (Popovic 2005) na základě bakteriální kultivace a výsledků citlivosti. Cílem terapie je snížení otoku, proliferace tkání a zánětu. V případě chronického zánětu způsobeného bakterií *Pseudomonas aeruginosa* je možné pomoci glukokortikoidů zvrátit ototoxické účinky (Pye 2018). Léčba chronických zánětu bývá velmi dlouhá, není neobvyklé, že trvá i až 8 týdnů s opakovanými návštěvami za účelem sledování pokroku (Barnard & Foster 2018).

3.1.5 Zánět středního a vnitřního ucha

Zánět středního ucha neboli *otitis media* a zánět vnitřního ucha (*otitis interna*) se u psů vyskytuje jako důsledek zánětu zevního zvukovodu. V 16 % případů se akutní zánět zvukovodu prolne v zánět středního ucha a při chronickém zánětu dokonce v 50 % případů (Bajwa 2019), některé dřívější zdroje uvádějí, že až v 80 % případů. K onemocnění dochází většinou z důvodu velkého množství exsudátu nebo tekutiny v bubínkové dutině středního ucha (Classen et al. 2016). Předpokládá se, že vznik *otitis media* je velmi často ovlivněn, tím, zda léčba *otitis externa* probíhala správně, zda byla vůbec zahájena nebo jestli byla přítomna antimikrobiální rezistence (Gotthelf 2004). Méně často může být *otitis media* způsobena primárními příčinami jako jsou zánětlivé polypy, cholesteatom, neoplazie a cholesterolový granulom (Classen et al. 2016). U koček může být příčina vzniku *otitis media* důsledkem respiračního onemocnění (vzestupná infekce Eustachovou trubicí do středního ucha) (Gotthelf 2004). Zánět středního a následně vnitřního ucha může způsobit i cizí předmět, například části rostlin. Příkladem je 11 letý pes, který byl 6 měsíců léčen se zánětem zevního zvukovodu, než se zjistilo, že má v uchu travní osten (Brement et al. 2018). Patogeneze *otitis media* je u psů většinou komplexní a často i multifaktoriální (Barnard & Foster 2018). Pokud nedojde k léčbě *otitis media* a stav pacienta se bude stále zhoršovat, rozvine se i zánět vnitřního ucha (Lorek et al. 2020).

Klinické projevy zánětu středního ucha jsou velmi nespecifické, jelikož jsou často překryty příznaky *otitis externa*, které mohou být podobné příznakům *otitis media* (výtok z vnějšího zvukovodu, třes hlavou, otok v oblasti příušní žlázy a bolest při palpaci postižené oblasti a okolí) (Paterson 2017). Pokud se infekce rozšířila hlouběji do středního nebo vnitřního ucha může se objevit naklánění hlavy na postiženou stranu, ataxie a rozvinutí Hornerova syndromu při porušení sympatického nervového systému. Projevy Hornerova syndromu jsou: zúžení zornice oka, pokles očního víčka, oko vkleslé do očnice a vyklenutí žvýkací membrány (Classen et al. 2016). Dále může zvíře vykazovat příznaky: neurologického onemocnění postihující hlavu (Lorek et al. 2020), jako je paralýza obličeje (pokles rtu a ucha, neschopnost mrkat) (Classen et al. 2016), abnormální záklon hlavy, nystagmus a deficit hlavových nervů (Bajwa 2019), včetně poškození lícního nervu, vestibulárního onemocnění, známek systémového onemocnění a bolesti při otvírání mordy (Pye 2018). Jsou ale i případy, kdy pes s *otitis media* nemusí vykazovat žádné neurologické příznaky, dostane-li se ale zánět i do vnitřního ucha, neurologické příznaky se ve větší nebo menší míře objeví (Lorek et al. 2020). Ve finálním výsledku dochází ke značnému poškození, které v průběhu času způsobuje mikroskopické trhlinky na bubínku a může dojít až k jeho ruptuře (Gotthelf 2004).

Diagnostika je v podstatě stejná jako při zánětu zevního zvukovodu viz kapitola 3.1.4.3. Vyskytuje se zde jen pár abnormalit, dle kterých je možné rozlišit o jaký zánět se jedná: absence bubínku při otoskopickém vyšetření (Bajwa 2019), červená nebo vyboulená tympanická membrána při otoskopickém vyšetření značí, že se bude jednat o *otitis media*, ale jak již bylo zmíněno z důvodu současně probíhajícího zánětu zevního zvukovodu (difúzní otok a profílace epiteliální výstelky zvukovodu) může být špatně viditelná (Kraijer-Huver et al. 2009). U některých kočičích pacientů se po vyčištění ucha od hlenu a zaschlých exsudátů, které jsou tmavé a drobné, připomínající exsudát po napadení ušním roztočem, objevit viditelný polyp ve zvukovodu (Gotthelf 2004). Otoskopické vyšetření může být při zánětu středního nebo vnitřního ucha velmi náročné na provedení u pacientů při vědomí (bolest), bývá tedy často minimálně nutná sedace případně i celková anestezie (Barnard & Foster 2018). Pokud má pacient v anamnéze zaznamenanou opakovanou léčbu zánětu zevního zvukovodu, mělo by to veterinárního lékaře upozornit na možnost, že pes prodělává zároveň i zánět středního ucha (Gotthelf 2004)

Patologické a neurologické změny je možné úspěšně vyřešit pouze chirurgickým zákrokem. Léčba je celkově velmi náročná, jelikož mnoho léků je potencionálně toxických pro struktury vnitřního ucha a zároveň zde hraje i velkou roli stav bubínku (Lorek et al. 2020). Nakonec je důležitá pravidelná kontrola vývoje a průběh onemocnění. Opakované kontrolní návštěvy umožňují veterinárnímu lékaři za včas provést změny v medikaci v případě, že je terapeutická odpověď nedostatečná (Barnard & Foster 2018). Prevencí *otitis media* je důkladná péče při čištění, odstraněním exsudátů pečlivým proplachováním a odsáváním zvukovodu, aby se eliminoval zdroj destruktivních enzymů působících na bubínek (Gotthelf 2004).

Původci otitid u psů

3.1.6 Bakterie

Jako příčina otitidy u psů je uváděn široký výčet bakterií jako *Staphylococcus* spp., β -hemolytické *Streptococcus* sp, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* (Petrov et al. 2013) a *Klebsiella* spp. (Pye 2018). Další bakterie, které jsou běžně spojené s ušní i záněty jsou bakterie rodu *Enterococcus* a *Corynebacterium*. Nejčastěji izolovanými bakterie ze zevního zvukovodu psů s ušní infekcí jsou ale *Staphylococcus* spp. (Bajwa 2019). Příkladem je studie, kde bylo celkem odebráno 257 vzorků z psích uší a bylo detekováno 42 kmenů *Pseudomonas aeruginosa* a 109 kmenů stafylokoků. Dále zde byly identifikované beta-hemolytiční streptokoci, *Proteus mirabilis* a *Escherichia coli* (Petrov et al. 2013). Tang et al. (2020) zjistili, že přibližně ve 21 % případů dominoval jeden druh, který představoval více než 90 % relativního množství ve vzorku nemocného jedince s ušní infekcí. Většina těchto informací byla podložena bakteriální kultivací a z toho důvodu mohly být některé nekultivované bakterie podceňované, zatímco jiné bakterie s vysokou mírou proliferace přeceňované. Pokroky v technologiích sekvenování nové generace ale umožňují metagenomickou analýzu, která se nejčastěji zaměřuje na gen 16S ribozomální RNA (16S rRNA), což umožňuje charakterizovat vysoce komplexní mikrobiální společenství v různých orgánech u lidí a zvířat a v různých prostředích (Kasai et al. 2021). Ve srovnání se zdravými psy měli psi se zánětem zvukovodu významně nižší zastoupení bakterií kmene *Proteobacteria* a vyšší početnost kmene *Firmicutes* se *Staphylococcus* jako hlavním rodem (Ngo et al. 2018). Odlišné výsledky uvádí Korbely et al. (2019), která zjistila relativně vyšší zastoupení kmene *Firmicutes* u zdravých psů ve srovnání s ušima psů s *otitis externa*. Zajímavostí je, že ze všech výše zmíněných bakterií se pouze *Klebsiella* spp. (Pye 2018) a bakterie rodu *Enterococcus* (Bajwa 2019) nevyskytuje v normální mikrobiotě ucha zdravého psa (viz kapitola 3.1.1.2), což dokazuje polyfaktoriální původ otitid, na kterém se podílí bakteriemi, které se v uchu běžně vyskytují (Petrov et al. 2013).

Bakterie *Staphylococcus* a *Pseudomonas* mohou produkovat biofilm, což způsobí, že i přes adekvátní léčbu bude infekce stále přetrvávat. Biofilm musí být narušen, aby mohlo dojít k jakékoliv účinné antimikrobiální terapii (Bajwa 2019). *Pseudomonas aeruginosa* může způsobovat až 35 % případů *otitis externa* nebo *otitis media* (Barnard & Foster 2018). Bývá často citlivý na perorální flurochinolony, gentamicin nebo polymixin B, ale pokud se bakterie stane rezistentní na tuto skupinu antibiotik, jsou další možnosti systémové léčby velmi drahé a podávané injekčně nebo nejsou povolena pro léčbu zvířat (Pye 2018).

3.1.7 Parazitičtí členovci

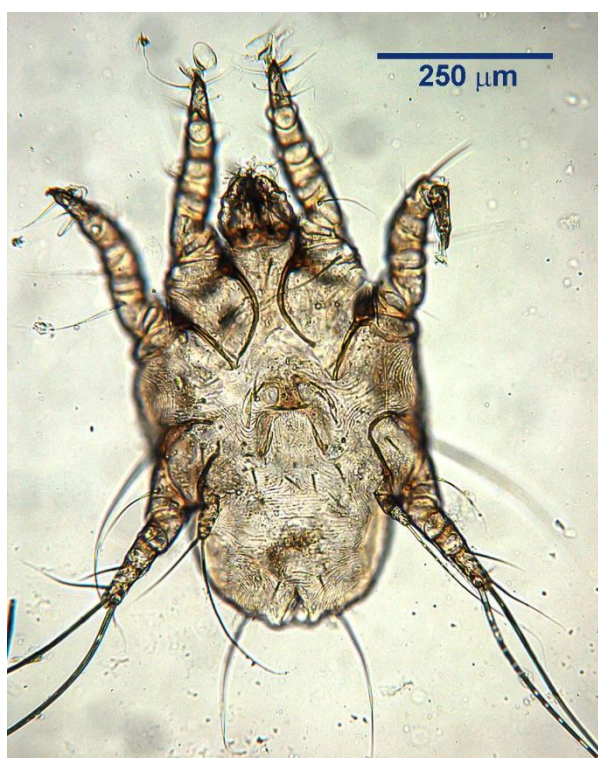
Ušní zánět může způsobit i roztoč strupovka ušní *Otodectes cynotis*, která způsobuje tzv. otodektový svrab (Carithers et al. 2016) označovaný také jako *otitis externa parasitaria* (Horáčková 2011). Přítomnost roztočů je velmi často doprovázena sekundární bakteriální a kvasinkovou infekcí (Silva et al. 2020). Roztoč *Otodectes cynotis* je celosvětově rozšířený parazit, který parazituje v zevním uchu psů a koček na horizontálním povrchu ušního kanálu. Primárním hostitelem jsou psi, kočky (Lefkaditis et al. 2021), lišky, fretky a výjimečně může napadnout i člověka (Yang & Huang 2016). Odhaduje se, že tento roztoč je u psů zodpovědný

za 50 % případů zánětů zevního ucha (*otitis externa*) a u koček až za 85 % případů (Taenzler et al. 2017). Velikost se u samečků uvádí v rozmezí 275–360 μm a u samic 350–450 μm , roztoči jsou viditelní i makroskopicky (Paterson 2020). Životní cyklus *O. cynotis* probíhá výhradně v ušních kanálcích zvířete a trvá 3 týdny. Vajíčko se po 4 dnech od naklazení vylíhne a projde čtyřmi stádii (larva, protonymfa, deutonymfa a dospělec) (Yang & Huang 2016). K rozvinutí zánětu dochází z důvodu nadměrné až přecitlivělé reakce jedince na antigen ve slinách roztoče nebo na fekální materiál (Taenzler et al. 2017). Důsledkem této reakce je intenzivní svědění (Yang & Huang 2016), které vyvolává nadměrné třepání hlavou a škrábání, čímž vzniká zčervenání kůže a ceruminózní zánět zevního zvukovodu viz kapitola 3.2.1 (Lefkaditis et al. 2021).

K infekci většinou dochází kontaktem s roztočem napadeným zvířetem. Jelikož strupovka dokáže krátkodobě přežívat v prostředí nebo na povrchu těla zvířete, je možná infekce i bez kontaktu (Lefkaditis et al. 2021). V prostředí mohou strupovky přežít až 12 dní v závislosti na teplotě prostředí a infekčnost mimo hostitele je pravděpodobně okolo 3 až 4 dnů (Yang & Huang 2016). Nejvíce jsou k infekci náchylní mladší jedinci a zvířata z chovů, kde jsou špatné hygienické podmínky a vyšší koncentrace zvířat na jednom místě (Tielemans et al. 2021).

Diagnostika otodektového svrabu bývá u psů problémová. Důvodem je, že k vyvolání ušního zánětu u psa stačí pouze 2-3 strupovky, které po vyvolání silného zánětu opouští zvukovod nebo jsou zničeny. Pravděpodobnost záchytu je tedy nízká (Popovic 2005). Onemocnění se zpravidla diagnostikuje mikroskopickým vyšetřením výtěru z ucha, kde lze vidět dospělé *O. cynotis* (viz obrázek 4) i typická vajíčka nebo otoskopicky přímým průkazem původce (Svobodová et al. 2013). Vodítkem je také tmavohnědý maz, který plní zvukovod a po zaschnutí připomíná usazenou vylouhovanou kávu („lógr“) (Yang & Huang 2016).

Otodektový svrab se léčí akaricidními přípravky, ale nejprve je zapotřebí zvukovod důkladně vyčistit olejovými ušními kapkami, salicylovým lihem nebo boralkoholem (Svobodová et al. 2013). Pokud se léčba otodektového svrabu odkládá, může dojít k vyvolání již zmíněné sekundární bakteriální nebo kvasinkové infekce (Yang & Huang 2016). Prevencí otodektového svrabu v místech, kde je chováno více zvířat najednou, je důkladná hygiena, léčebné zákroky provádět u všech zvířat najednou a při příjmu nových zvířat vyšetření proti *O. cynotis* (Svobodová et al. 2013).



Obrázek 4: Mikroskopické znázornění dospělé samičky *Otodectes cynotis*.
(Převzato z <https://wcvm.usask.ca/learnaboutparasites/parasites/otodectes-cynotis.php>)

3.1.8 Kvasinky

Mezi kvasinky, nalézané v případech otitid u psů, se řadí *Malassezia pachydermatis* a *Candida albicans* (Petrov et al. 2013). Obě kvasinky jsou zároveň přítomné v mikrobiotě ucha zdravého psa (Brito et al. 2009). Některé studie jako například Sihelská et al. (2017) vyvracejí přítomnost *Candida* spp. na kůži zdravých psů. Identifikovali pouze jeden izolát, a to z rektální sliznice a usuzují tedy, že pravděpodobně kvasinky *Candida* kolonizují převážně sliznici, jejich výskyt na kůži může být pouze ojedinělý případně spojený s propuknutím nemoci. To potvrzuje i Paterson (2020), která uvádí, že *Candida* spp. se v uších vyskytuje pouze příležitostně. U psů kvasinky nejčastěji kolonizují vlhká místa, jako jsou kožní řasy, mukokutánní spojení, uši a meziprstí (Sihelská et al. 2017). V uchu kvasinky kolonizují povrch zevního zvukovodu, kde je lze nalézt přilnuté ke shlukům exfoliovaných buněk dlaždicového epitelu (Karlapudi 2017). V adherenci a růstu kvasinek mohou hrát roli i mikro-environmentální faktory jako je bakteriální mikroflóra, pH, soli, imunitní reakce biochemie a fyziologie, vliv má i genotyp v závislosti na geografické oblasti a/nebo místě na kůži (Sihelská et al. 2017).

Ke kolonizaci kůže psů kvasinkami *Malassezia pachydermatis* dochází pravděpodobně již v prvních dnech života, jak k tomu dochází není známo, ale s největší pravděpodobností přenosem z matky na štěně po odstranění amniotické membrány,

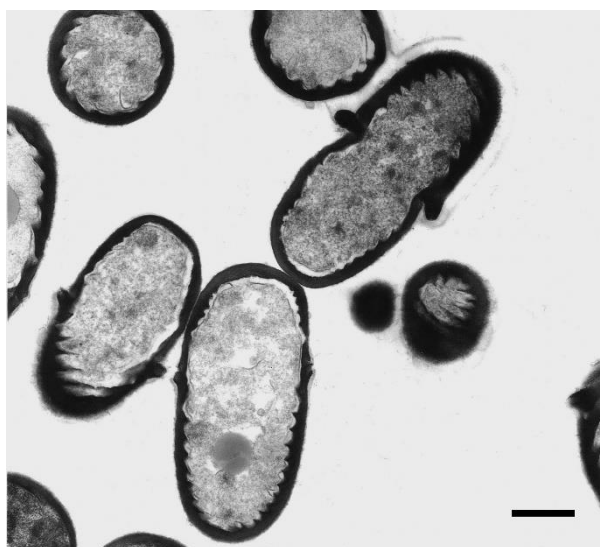
olizováním a kojením (Bond et al. 2020). Wagner a Schadler (2000) u 22 novorozeneých štěnat rotvajlerů našli kvasinky *Malassezia* v přibližně 40 % vzorků odebraných z pysků, nehtových lůžek a uší štěnat ve věku 3, 7 a 35 dnů.

3.1.8.1 *Malassezia pachydermatis*

Rod *Malassezia* je obvykle považován za monofyletický taxon ve kmeni *Basidiomycota* a podkmenu *Ustilaginomycotina*, což je vysoce diverzifikovaná skupina více než 1500 druhů rostlinných patogenů (Begerow et al. 2006). Spolu s *Malassezia pachydermatis* patří do rodu dalších zhruba 16 druhů: *M. stricta*, *M. furfur*, *M. sympodialis*, *M. japonica*, *M. globosa*, *M. slooffiae*, *M. obtusa*, *M. yamatoensis*, *M. dermatis*, *M. brasiliensis*, *M. psittaci*, *M. caprae*, *M. equina*, *M. nana*, *M. cuniculi* včetně *M. pachydermatis* (Sihelská et al. 2017).

Malassezia pachydermatis je lipofilní, nelipodependentní kvasinkový druh, který je součástí kožní mikrobioty - nemocných i zdravých psů, koček a dalších domácích i divokých zvířat (Brilhante et al. 2018). Příležitostně může být izolována i z lidské kůže, může být zapojena do nozokomiálních infekcí u hospitalizovaných těžce nemocných novorozenců. Druh byl také hlášen jako sporadické agens infekcí krevního řečiště u lidí, pacientů s oslabenou imunitou a neonatálních případů (Tragiannidis et al. 2010). Tradičně byla považována za jediný druh v rámci rodu, který není striktně závislý na lipidech, nedávná studie Triana et al. (2015) ale odhalila, že gen kódující syntézu mastných kyselin chybí u všech druhů *Malassezia*, což naznačuje, že celý rod je na lipidech závislý. Domněnka, že *M. pachydermatis* je lipofilní, ale není závislá na lipidech, bylo založeno na pozorování, že většina izolátů může růst na Sabouraud-dextrózovém agaru (SDA) bez přidaných lipidů (Peano et al. 2020). Což bylo vysvětleno tím, že k přípravě SDA se používá komerční pepton, který obsahuje malé množství mastných kyselin (např. kyseliny palmitové) (Wu et al. 2015). *Malassezia pachydermatis* je charakteristická svým kulatým až oválným nebo klasickým arašídovým tvarem (viz obrázek 5) s monopolárním pučením (Bajwa 2017). Pozoruhodným rysem genomů kvasinek rodu *Malassezia* je jejich malá velikost (~10 Mb), což je asi polovina velikosti jiných známých basidiomycetových hub, přičemž některé druhy mají méně než 4000 předpokládaných genů což může odrážet adaptaci na omezenou ekologickou niku. Buněčná stěna *Malassezia* spp. je neobvyklá tloušťkou (90-150 nm), morfologií (vnitřní spirálovité zvlnění), a složením (převaha (1 → 6) -β-D-glukanu, stopa mannanu, stěna bohatá na lipidy, kapsle a chitin výrazný v jizvě pupenu) (Bond et al. 2020). Genovou analýzou byly zjištěné další jedinečné vlastnosti *Malassezia*, zahrnující: nízkou schopnost degradovat sacharidy v důsledku redukce genů kódujících glykosylhydrolázu, závislost růstu na lipidech kvůli nedostatku genu syntézy mastných kyselin a současná expanze enzymů hydrolyzujících lipidy (jako jsou sekretované lipázy, fosfolipázy a kyselé sfingomyelinázy. Analýza genomů také odhalila přítomnost unikátních genů s neznámou funkcí, které byly pravděpodobně získány horizontálním přenosem (Wu et al. 2015). Patogeneze klinických infekcí *Malassezia pachydermatis* je stále nejasná. Studie Brilhante et al. (2018) se zabývala stanovením antifugální citlivosti, vyhodnocením virulence a patogenitou u 25 izolátů *M. pachydermatis* ze zvířat. Všechny izoláty byly klasifikované jako silné producenty robustního biofilmu, ukazující vícevrstevné blastokonidie a vodní kanály ve struktuře. Pokud jde o citlivost zralého

biofilmu, bylo pozorováno, že ketokonazol a amfotericin B byly léky, které nejvíce snižovaly jeho metabolickou aktivitu. Všechny kmeny byly pozitivní na produkci proteáz, zatímco 14/25 kmenů bylo pozitivních na fosfolipázy, z nichž dva byly silně pozitivní. Nebyla pozorována žádná hemolytická aktivita. V testech patogenity pomocí hád'átka obecného (*Caenorhabditis elegans*) byla pozorována významně vyšší úmrtnost u larev vystavených *M. pachydermatis* než u negativní kontroly s *E. coli*. Úmrtnost hlístic se pohybovala od 48,9 % do 95,9 % (průměr $68,9 \pm 18,2$), 96 hodin po vystavení hlístic *M. pachydermatis*. Všechny tyto vlastnosti spojené s virulencí zdůrazňují klinický význam *M. pachydermatis*.



Obrázek 5: Transmisní elektronová mikrofotografie *Malassezia pachydermatis*. Buňky mají silnou buněčnou stěnu s charakteristickým vnitřním spirálováním. Monopolární blastický vývoj je spojen s výraznou jízvou po pupenu. Měřítko = 500 nm. (Převzato z Bond et al. 2020).

Malassezia pachydermatis se z kvasinek nejvíce podílí na patologických procesech v uchu, vykytuje se ale i u zvířat i bez klinických příznaků (Puigdemont et al. 2021). V případě, kdy kožní populace *M. pachydermatis* u psů přeroste, působí jako oportunní patogen způsobující *otitis externa* a komplikace dermatitid u zvířat postižených atopickou dermatitidou, intertrigo endokrinopatií a primárními defekty keratizace (Puig et al. 2019). K přemnožení populace dochází v případech, kdy nastanou příznivé podmínky, jako je přítomnost mikroprostředí bohatého na lipidy, porucha imunitního systému hostitele a lokální nerovnováha mikroflóry (Brilhante et al. 2018). Význam rodu *Malassezia* pro veterinární lékaře v oblasti zájmových chovů se v kontextu *otitis externa* u psů je znám už od 50. let 20. století, na rozdíl od jiných psích dermatitid, kde byla role *Malassezia* prokázána až nedávno (Bond et al. 2020). Laboratorní průkaz otitid s podílem *Malassezia pachydermatis* je podložen přítomností zvýšeného počtu kvasinek při cytologickém vyšetření ušního exsudátu (Puig et al. 2019). Neexistuje ale žádné konkrétní číslo, které by ukazovalo na přemnožení kvasinek *M. pachydermatis*. Klíčovým faktorem je, zda dochází ke klinickým příznakům, především tedy ke zvýšenému svědění uší a selhání léčby bez antimykotik (Karlapudi 2017).

U některých psů může *M. pachydermatis* způsobit i alergickou reakci, která vede ještě k výraznějšímu svědění a nepohodlí (Ebani et al. 2023). U atopických psů byly ve srovnání se zdravými psy zjištěny vyšší hladiny imunoglobulinu E specifického pro *Malassezia*, což naznačuje, že *Malassezia* se může účastnit jako alergen (Bajwa 2017). Predisponující faktory ke vzniku infekce kvasinkou *Malassezia pachydermatis* je mastná kůže, vysoké teploty, vlhkost, léčba kortikoidy, narušený imunitní systém (Sihelská et al. 2017), přítomnost kožních záhybů a změněná hladina kožního pH (Bajwa 2017). Dále k onemocnění přispívají porušení kůže fyzikálními, chemickými a imunologickými mechanismy (Puig et al. 2019). Předpokládá se, že *Malassezia pachydermatis* má symbiotický vztah s komenzálními stafylokoky, které produkují vzájemně prospěšné růstové faktory a působí změny mikroprostředí (Bajwa 2017). Některá plemena psů mají predispozici ke zvýšenému riziku přemnožení malassezií, patří mezi ně: west highland white teriér, baset, americký kokršpaněl, shih-tzu, pudl, boxer, kavalír King Charles španěl, německý ovčák a jezevčík (Peano et al. 2020).

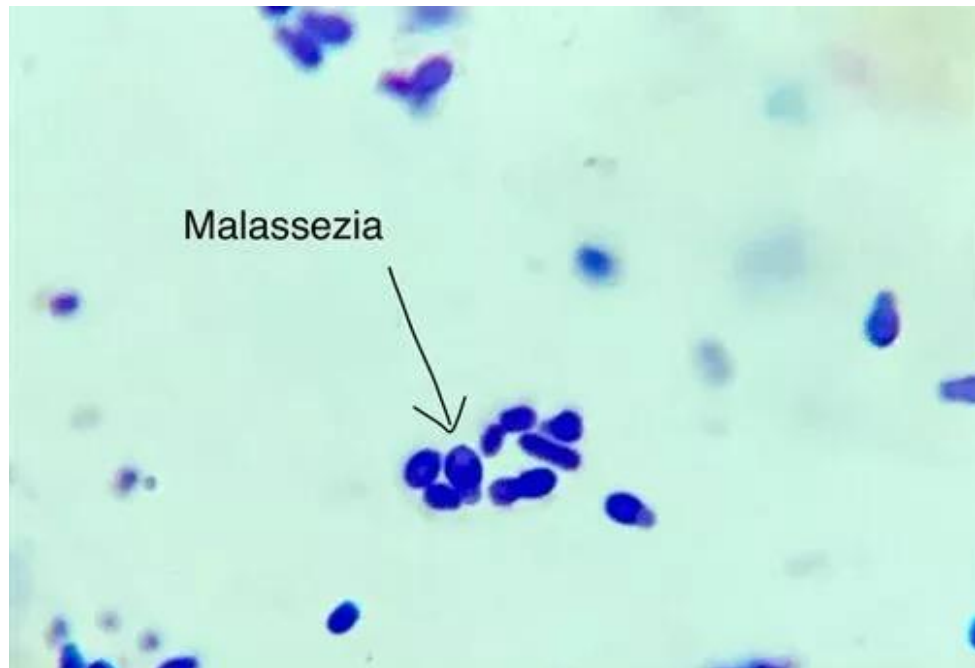
3.1.8.1.1 Výskyt

Kvasinka *Malassezia pachydermatis* se běžně vyskytuje na kůži a sliznici psů, vyskytuje se tedy i v uších, aniž by způsobovala *otitis externa*, ale zároveň je to i nejizolovanější kvasinka asociovaná s tímto onemocněním (Bismarck et al. 2020). Sihelská a et al. (2017), porovnávala výskyt *Malassezia pachydermatis* a *Candida albicans*, na kůži bylo identifikováno 84 izolátů *Malassezia pachydermatis* z čehož 36 izolátů bylo odebráno z vnějšího zvukovodu, 20 izolátů z mezivrstvy, 20 z podpažní jamky a 8 z krku. Vyplývá z toho, že se *Malassezia* spp. nejvíce vyskytuje ve vnějším zvukovodu (51,4 %). Může ale postihnout i jiná místa než zvukovod, podkožní jamky, mezivrstvy nebo ventrální stranu krku. Postihuje i okraje pysků, třísla, obličejové nebo ocasní záhyby, perianální a perivulvální kůži (Bajwa 2017). Ačkoli u psů převládá druh *M. pachydermatis* v případech dermatitidy nebo otitidy byly příležitostně hlášeny a identifikované i jiné druhy, jako je *M. furfur* (Bond et al. 2020).

3.1.8.1.2 Diagnostika

Diagnostika ušního zánětu způsobeného *M. pachydermatis* je založena na přítomnosti zvýšeného počtu kvasinek při přímým mikroskopickým pozorováním, odpovědi na antimykotikum a na pozorování kompatibilních lézí. Mikrobiologická kultivace se běžně neprovádí a vyžaduje se pouze v případě, že je přímá mikroskopie negativní u zvířete s podezřelou infekcí (Puig et al. 2019). V případě že se kultivace provádí, veterinární lékař nebo osoba způsobilá k tomu to úkonu, provede výtěr z ucha. Následuje cytologie (Bismarck et al. 2020), v které kvasinky *M. pachydermatis* vypadají jako tmavě modro/fialově zbarvený organismus ve tvaru arašídů viz obrázek 6 (Paterson 2020). Následně se výtěry rozetrou na Sabouraudův glukózový agar (SAD), možné je přidat i chramfenikolem a cykloheximid. Inkubace probíhá při teplotě 36 °C po dobu 7 dnů nebo do růstu typické *Malassezia pachydermatis*. Identifikace je následně potvrzena hmotnostní spektrofotometrií MALDI-TOF (Bismarck et al. 2020). V neposlední řadě dochází také k testování citlivosti, která umožňuje sledování výskytu kmenů *M. pachydermatis* rezistentních k azolům (Puig et al. 2019). Azolové deriváty, široce používány k léčbě *M. pachydermatis*, jsou v klinických případech

obvykle účinné. Testy *in vitro* však prokázaly sníženou citlivost této kvasinky k těmto antimykotikům (Brilhante et al. 2018). Dosud nebylo stanoveno standardizované testování antimykotické citlivosti *Malassezia pachydermatis*, přesto některé studie dokazují, že *Malassezia* izolovaná z nemocných zvířat s kožními lézemi mají menší citlivost k některým antimykotikům než izoláty ze zdravých zvířat (Cafarchia et al. 2012).



Obrázek 6: Znázornění *Malassezia pachydermatis* s charakteristickým tvarem arašidu (Převzato z <https://pennardvets.com/your-pet-and-malassezia/>)

Srovnání mykotické kultivace a cytologického vyšetření ukazuje, že cytologické vyšetření má dobrou specificitu, ale nízkou senzitivitu. V důsledku toho existuje potřeba specifické, citlivé, přesné a rychlé metody pro detekci a kvantifikaci kvasinek *M. pachydermatis* u psů s *otitis externa* (Cafarchia et al. 2005). Bylo vyvinuto několik testů qPCR pro detekci a kvantifikaci nejčastěji izolovaných druhů r. *Malassezia* z lidské kůže, (především *M. globosa* a *M. strictai*). Tyto testy obvykle amplifikovaly geny pro rRNA, u kterých bylo prokázáno, že jsou v genomech hub skupin askomycet a basidiomycet přítomny ve více kopiích a byly navrženy pro studium druhů r. *Malassezia* na lidské kůži spíše než pro jejich absolutní kvantifikaci (Black et al. 2013). Následně vyvinutá citlivá, rychlá a přesná technika pro detekci a kvantifikaci *M. pachydermatis* ze zevního zvukovodu psů je založená na genu pro β -tubulin jako alternativní cíl qPCR. Tento marker je přítomen pouze v jediné kopii u blízce příbuzných druhů včetně *M. globosa* a byl také navržen jako fylogenetický marker pro diferenciaci druhů r. *Malassezia* (Puig et al. 2019). V determinaci se běžně používá i spektrometrie MALDI-TOF (Bond et al. 2020).

3.1.8.1.3 Léčba

Terapie *Malassezia pachydermatis* je obvykle přizpůsobena podle faktorů, jako je lokalizované nebo generalizované onemocnění, celkový zdravotní stav pacienta, základní primární onemocnění a preference nebo kompilace klienta (Bajwa 2017). Léčba zánětu zevního zvukovodu způsobeného *M. pachydermatis* je obecně založena na lokální aplikaci antimykotik v kombinaci s antibiotiky ke kontrole bakteriální infekce a glukokortikoidy k potlačení zánětu (Bismarck et al. 2020). Rozsáhlá lokální terapie může být náročná u psů s hustou srstí, u velkých nebo agresivnějších psů, nebo pokud majitelé zvířat nejsou schopni splnit požadavky léčby (Miller et al. 2012). V případě pacientů s generalizovaným onemocněním je vhodnější k rychlejší a úplné remisi použít kombinaci lokální a systémové terapie (Bajwa 2017). Kvasinkové infekce u psů je možné léčit například perorálním ketokonazolem (5mg/kg/den) po dobu 15 až 30 dnů, dle závažnosti určitého případu (Karlapudi 2017). Pro mírné případy nebo pro lokalizované léze je častá lokální léčba antifungálními přípravky obsahujícími složky: 2 % ketokonazol, 1 % ketokonazol a 2 % chlorhexidin, 2 % mikonazol, 2 % climbazol, 2 % chlorhexidin nebo 3 % chlorhexidin. Obvykle jsou účinné 2 % chlorhexidinu, 2 % vápenné síry, 0,2 % enilkonazolu nebo 1 % sulfid selenu (Bajwa 2017). Nejčastěji používaná antimykotika pro psy se řadí do různých chemických tříd s různým mechanismem účinku viz tabulka 2. Řada aktivních látek zmíněných v tabulce 2 se ve veterinární medicíně využívá v produktech pro lokální aplikaci, jako jsou například dermatologické roztoky, šampóny a ušní formulace, které často zároveň obsahují glukokortikoidy a antibiotika (Peano et al. 2020). Jednou z možností léčby je také předepsání pulzní terapie s použitím perorálních antimykotik, jako je itrakonazol (Pinchbeck et al. 2002), ketokonazol a terbinafin (Berger et al. 2012). Podobně byla popsána aplikace 2% šamponu s climbazolem pro kontrolu přemnožení *Malassezia* a prevenci recidivy (Cavana et al. 2015). Pokud nebude zánět zevního zvukovodu způsobený kvasinkami včas a správně léčen, rozvine se v zánět středního ucha (Ebani et al. 2023). Onemocnění způsobené kvasinkou *M. pachydermatis* má celkově dobrou prognózu v případě, že je vynaložené důkladné úsilí k identifikaci příčinných faktorů (např. alergie, neoplazie, kožní záhyby nebo endokrinní onemocnění), aby se zabránilo opakované infekci. Jakmile jsou souběžně léčeny primární příčiny i samotné onemocnění, bývá léčba poměrně jednoduchá (Peano et al. 2020).

Tabulka 2: Antifungální látky používané k léčbě ušních zánětů a dermatitid způsobené kvasinkou *Malassezia* spp.. Zkratky uvedené v tabulce: L – lokální použití, S – systémové použití (Převzato z Peano et al. 2020).

| Mechanismus působení | Třída | Účinná látka | Použití | Poznámky |
|--|----------------------------|--------------|---------|--|
| Interakce se sterol-14 α -demethylázou, která se účastní biosyntézy ergosterolu | Deriváty azolů (imidazoly) | Ketokonazol | L / S | Uznávaná klinická účinnost pro psí <i>Malassezia</i> dermatitidu (orální podání). |
| Interakce se sterol-14 α -demethylázou, která se účastní biosyntézy ergosterolu | Deriváty azolů (imidazoly) | Mikonazol | L | Zásadně dostupný pro ušní použití, ale je dostupné i ve formulacích pro dermatologické použití v |

| | | | | |
|--|----------------------------|--------------|-------|---|
| | | | | mnoha zemích. |
| Interakce se sterol-14 α -demethylázou, která se účastní biosyntézy ergosterolu | Deriváty azolů (imidazoly) | Klotrimazol | L | Dostupný v ušních formulacích. |
| Interakce se sterol-14 α -demethylázou, která se účastní biosyntézy ergosterolu | Deriváty azolů (imidazoly) | Ekonazol | L | _____ |
| Interakce se sterol-14 α -demethylázou, která se účastní biosyntézy ergosterolu | Deriváty azolů (triazoly) | Intrakonazol | S | Uznávaná klinická účinnost pro psí <i>Malassezia</i> dermatitidu (orální podání). |
| Interakce se sterol-14 α -demethylázou, která se účastní biosyntézy ergosterolu | Deriváty azolů (triazoly) | Flukonazol | S | Tradičně se používá v případě systémových mykóz. Jedna studie prokázala určitou účinnost při léčbě dermatitidy <i>Malassezia</i> . |
| Interakce se sterol-14 α -demethylázou, která se účastní biosyntézy ergosterolu | Deriváty azolů (triazoly) | Posakonazol | L | Používá se především v humánní medicíně k léčbě invazivních mykotických infekcí. Nedávno byla na trh uvedena také formulace pro psy na bázi ušního posakonazolu |
| Působení proti membránovým sterolům | Polyenové makrolidy | Nystatin | L | Zásadně dostupný v ušních formulacích |
| Porucha syntézy fungálních sterolů inhibicí skvalenepoxidázy | Allylaminy | Terbinafin | L / S | V některých studiích bylo zjištěno, že je účinný u dermatitidy <i>Malassezia</i> při perorální léčbě. |
| Inhibice sestavování mikrotubulů | Benzimidazoly | Thiabendazol | L | Zásadně dostupný v ušních formulacích |

3.1.8.2 Rod *Candida*

Rod *Candida* zahrnuje 18 druhů: *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. orthopsilosis*, *C. metapsilosis*, *C. famata*, *C. inconspicua*, *C. rugosa*, *C. tropicalis*, *C. viswanathii*, *C. tropicalis*, *C. lusitaniae*, *C. dubliniensis*, *C. pelliculosa*, *C. kefyr*, *C. lipolytica*, *C. krusei*, *C. guilliermondi* včetně *C. Albicans* (Sihelská et al. 2017). U psů se při zánětu zevního zvukovodu může objevit *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata* a *Candida albicans*. To dokazuje i studie De Martino et al. (2016), která ze psího ucha postiženého kvasinkovou *otitis externa* vyzolovala 21 izolátů *M. pachydermatis*, 4 izoláty *Candida parapsilosis*, 2 izoláty *Candida tropicalis* a jeden izolát *Candida glabrata* a *Candida albicans*. Velikost jednotlivých druhů kvasinek *Candida* je rozmanitá, což dokazuje i studie Pezzotti et al. (2022), která se zabývala analýzou v molekulárním měřítku, chemometrií a identifikací druhů rodu *Candida*. Mezi studovanými druhy se buňky *C. tropicalis* jeví jako největší (~7,9 μm v průměru), zatímco buňky *C. glabrata* byly nejmenší (2,9 μm v

průměru). Buňky *C. albicans* a *C. krusei* vykazovaly střední velikosti (5,6 a 4,9 μm v průměru). Všechny druhy vykazovaly frakce buněk s mírně prodlouženým tvarem (maximální poměr stran buněk $\sim 1,3$). *Candida* coby saprofyt roste v kvasinkové formě, v kultuře nebo kontaktu s tkání tvoří blastokonidie, pseudohyfy a hyfy (Hirdes et al. 2016). Některé kvasinky r. *Candida*, zejména *C. albicans*, jsou endogenní saprofyty, ale jejich role jako oportunního patogenu je také známá. Spolu s *Cryptococcus neoformans* jsou tyto kvasinky jedním z nejvýznamnějších etiologických agens oportunních systémových mykóz zejména u imunokompromitovaných lidských pacientů (Dworecka-Kaszak et al. 2020). Jsou vysoce patogenní, s růstovou kapacitou při 37 °C, klíčením, adhezí na hostitelské buňky a sekrecí exoenzymů, především proteinázy a fosfolipázy (Hirdes et al. 2016).

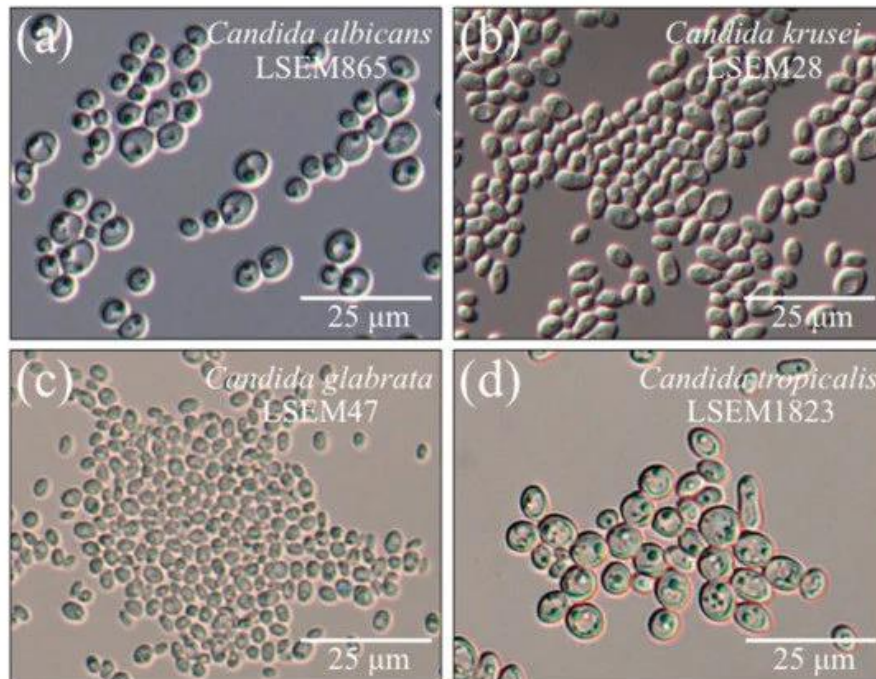
Kvasinkové onemocnění způsobené rodem *Candida* se nazývá kandidóza. Může se projevovat různými klinickými stavy, jako je dermatomykóza, otitidy, endoftalmitida, cystitida a v závažnějších případech může vést i k septikémii (Hirdes et al. 2016). Ačkoli je toto onemocnění v humánní medicíně široce známé, jen málo zpráv se týká domácích zvířat (Shokri & Khosravi 2016). *Candida* spp. způsobují, stejně jako *M. pachydermatis*, kožní a slizniční infekce. *Candida tropicalis* je stále častěji uváděna jako patogen, způsobující *otitis externa* u psů, a měla by být více zvažována v případech recidivující otitidy vyvolané kvasinkami (Boehm et al. 2020). Jsou známy i případy, kdy *Candida albicans* způsobila cerebrální infekci u psů, kteří vykazovali nervové příznaky. Docházelo k výrazné asymetrii telencefalických hemisfér s multifokálními až splývajícími nažloutlými nebo načervenalými oblastmi a částečnou ztrátou rozlišení mezi šedou a bílou hmotou (Souto et al. 2018). Přejít k patogenitě u druhů *Candida*, zejména u *Candida albicans*, nastává obecně v důsledku imunologického stavu hostitele, což vede k nerovnováze mikroflóry, která je spojena s důležitými faktory virulence, jako je tvorba biofilmu a produkce hydrolytických enzymů, a podporuje šíření kvasinek do jiných míst a orgánů (Sihelská et al. 2017). Kvasinková infekce způsobená *Candida albicans* se může vyvinout u psů, morčat, králíků a některých dalších hlodavců včetně krys a myší (Shokri & Khosravi 2016). Nedávná studie zabývající se výskytem různých patogenních a oportunních hub u kožních onemocnění domácích zvířat uvádí, že ve více než 19 % pozitivních houbových kulturách ze zevních zvukovodů byly identifikovány kvasinky r. *Candida*, především *Candida albicans* (Dworecka-Kaszak et al. 2020). Mezi faktory přispívající k infekci *C. albicans* u psů patří dlouhodobá terapie steroidy, poškození sliznic, dlouhodobá katetrizace v dolním močovém systému a imunosupresivní onemocnění (Jang et al. 2017).

3.1.8.2.1 Výskyt

Prevalence kvasinek *Candidas* spp. je v uchu u psů s *otitis externa* nižší, což dokazuje i studie Martino et al. (2016), kde bylo z celkového počtu 53 vzorků detekováno 57,4 % *M. pachydermatis* a 25,8 % *Candidas* spp.. *Candida albicans* je součástí normální flóry v gastrointestinálním, urogenitálním a horním dýchacím traktu psů (Jang et al. 2017). Ačkoli některé studie uvádějí, že se běžně vyskytuje i v mikrobiotě zvukovodu u zdravých psů (Brito et al. 2009), spíše by se dalo říct, že v uších zdravých psů je výskyt sporadický a je spíše podmíněn počínajícím zánětem jiné etiologie (Sihelská et al. 2017).

3.1.8.2.2 Diagnostika a léčba

Při cytologickém nálezů jsou si vizuálně velmi podobné s *M. pachydermatis*, ale *Candida spp.* mají lehce kulatější tvar s více definovaným pasem (viz obrázek 7) (Paterson 2020). Pro odlišení druhů *Candida* se používá subkultivace na oxoidním médiu jinak je celková diagnostika a léčba stejná jako u kvasinek rodu *Malassezia pachydermatis* viz kapitola 3.3.3.1.2 a 3.3.3.1.3 (De Martino et al. 2016).



Obrázek 7: Mikrofotografie čtyř druhů *Candida*. a) *C. albicans*, b) *C. krusei*, c) *C. glabrata* a d) *C. tropicalis*. (Převzato z Pezzotti et al. 2022).

Rezistence kvasinek k antimykotikům

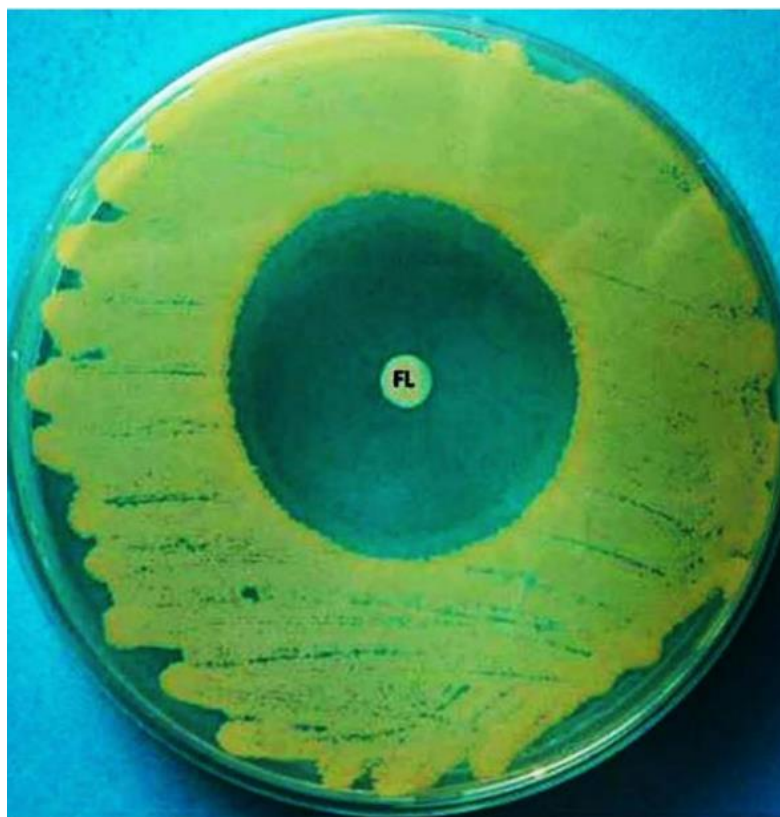
Léková rezistence je rostoucím problémem u mnoha infekčních mikroorganismů, především bakterií, ale také u některých lékařsky významných druhů kvasinek (Peano et al. 2020). Mechanismy antimykotické rezistence souvisejí se získanými nebo vnitřními vlastnostmi patogenu, které interferují s antifungálním mechanismem příslušného léčiva nebo které snižují cílové hladiny léčiva (Pfaller 2012). Mikrobiologická rezistence nastává, když antimikrobiální látka inhibuje růst patogenu pouze v koncentracích vyšších, než je rozmezí pozorované u kmenů divokého typu (WT) (termín WT označuje izolát bez mechanismů získané rezistence). Takto definované hraniční hodnoty jsou známé jako epidemiologické hraniční hodnoty (ECOFF nebo ECV). Klinická rezistence je určena situací, kdy je infikující organismus inhibován pouze koncentrací antimikrobiální látky, která je spojena s vyšší pravděpodobností terapeutického selhání. Jinými slovy, patogen je inhibován pouze antimikrobiální koncentrací, která je vyšší, než by bylo možné bezpečně dosáhnout při normálním dávkování (Peano et al. 2020). Rostoucí antimykotická rezistence u mnoha dermatofytů představuje vážnou globální výzvu (Aneke et al. 2019). Při samotné léčbě kvasinkových infekcí důležité zvolit skutečně účinné antimykotikum (Sihelská et al. 2019). Léčba mírných bakteriálních a houbových infekcí by měla být prováděna racionálně a specificky. Použití antibiotik a antimykotik mělo být omezeno na přesně definované případy, čímž by se napomohlo kontrole bakteriální i kvasinkové rezistence (Puigdemont et al. 2021).

Léčbu je vhodné zahájit až po testování citlivosti izolátů na vybraná antimykotika (Sihelská et al. 2019), což se v praxi děje minimálně. K testování citlivosti izolátů je k dispozici několik metod. Na základě testů *in vitro* některé studie uvádějí vysokou míru rezistence pro různé látky, například u ketokonazolu (Nascente et al. 2009a), klotrimazolu, mikonazolu (Peano et al. 2012) nebo thiabendazolu (Nascente et al. 2009b). Standardně se k *in vitro* testování antimykotické rezistence využívá metoda diskové difúze (viz obrázek 8.), kterou ve své studii použila i Sihelská et al. (2019), která hodnotila antimykotickou aktivitu u ketokonazolu, klotrimazolu, itrakonazolu, flukonazolu a nystatinu na 40 izolátech *M. pachydermatis*. Největší antifungální aktivitu vykazoval nystatin, kdy bylo zjištěno, že 32 izolátů je citlivých a pouze jeden izolát byl rezistentní. Nejviditelnější rezistence (5 izolátů) byla u klotrimazolu. Dva izoláty byly rezistentní proti ketokonazolu, klotrimazolu, itrakonazolu a flukonazolu a jeden izolát byl rezistentní proti všem testovaným antimykotikům. 28 izolátů *Malassezia* bylo citlivých na všechna testovaná antimykotika. Metody uznávané pro antifungální testování rezistence jsou metody institutu pro klinické a laboratorní standardy (CLSI, dříve Národní výbor pro klinické laboratorní standardy (NCCLS)) a Evropský výbor pro testování citlivosti na antibiotika (EUCAST) (Peano et al. 2020). Postup při metodě diskové difúze v případě antimykotické rezistence podle studie Sihelská et al. (2019): Suspenze kvasinek *Malassezia* byla připravena ve fyziologickém roztoku s 0,1% Tween 80 a upravena pomocí densitometru na hustotu buněk odpovídající 1 McFarlandově hodnotě. Pomocí sterilního tamponu bylo kvasinkové inokulum aplikováno na Sabouraudův dextrózový agar s chloramfenikolem ve třech směrech, dvakrát a s odstupem 15 minut. Na povrch inokulovaných ploten byly aplikovány dva nebo tři antifungální disky. Destičky byly inkubovány při 32 °C a zóny inhibice růstu byly odečteny po 72 hodinách.

Výsledky byly vyhodnoceny podle interpretačních kritérií (tabulka 3). Ke kontrole byl použit referenční kmen *M. pachydermatis* a referenční kmen *C. albicans*.

Tabulka 3: Interpretační kritéria pro hodnocení citlivosti kvasinek rodu *Malassezia* vůči antimykotikům (Převzato ze Sihelská et al. 2019).

| Antifungální činidlo | Citlivost <i>Malassezia</i> (\varnothing v mm) | Odolnost <i>Malassezia</i> (\varnothing v mm) |
|----------------------|--|---|
| Ketokonazol | 20 | < 20 |
| Klotrimazol | 10 | < 10 |
| Itrakonazol | 16 | < 16 |
| Flukonazol | 25 | < 25 |
| Nystatin | 16 | < 16 |



Obrázek 8: Metoda diskové difúze. Antifungální aktivita flukonazalu (FL). Flukonazol uprostřed inhibuje patogen, čímž se nerozšiřuje do středu a vytváří tzv. hranice za kterou se nerozšíří (Převzato ze Sihelska et al 2019)

Využití esenciálních silic při léčbě otitid u psů

Esenciální silice mají širokou škálu protiplísňových vlastností a jsou šetrné k životnímu prostředí (Bohmova et al. 2019). Použití některých esenciálních silic ze středomořských rostlin (např. tymián, rozmarýn, šalvěj nebo rozmarýn) proti *otitis externa* u domácích zvířat je v současné době doporučováno i řadou veterinářů, kteří na základě svých zkušeností dosáhli dobrých výsledků při léčbě těchto infekcí (Nardoni et al. 2017). Využití esenciálních silic je vhodnou alternativou pro léčbu zánětu zevního zvukovodu u psů, protože kvasinky a bakterie podílející se na *otitis externa* jsou často proti komerčním přípravkům odolné (Ebani et al. 2023). Další výhodou využití esenciálních silic je, že *Malassezia* je oportunní agens, které se většinou vyskytuje u atopických zvířat. Z toho důvodů by zlepšení stavu zevního zvukovodu mohlo být užitečné při omezení frekvence lokálního podávání antimykotik přispívajících k omezení vzniku lékové rezistence (Di Cerbo et al. 2016). Je ale zapotřebí věnovat pozornost podávání jakékoliv potencionálně dráždivé sloučeniny obsažené v aktivních esenciálních olejích. Například silice z třezalky tečkované (*Hypericum perforatum*) poskytla *in vitro* dobrou aktivitu proti *Malassezia furfur* v biofilmech, ale její použití není indikováno pro léčbu *in vivo* kvůli fotosenzibilizaci (Simonetti et al. 2016). Tomu by se dle studie Nardoni et al. (2017) mohlo zabránit vysokým naředěním dané esenciální silice. Nedošlo by k nežádoucím účinkům na kůži, zejména u atopických jedinců. Vhodně naředěné esenciální silice jsou vhodné pro přímou aplikaci na kůži a lze je použít při léčbě několika kožních onemocnění jak u zvířat (Mugnaini et al. 2013) tak u lidí (Casetti et al. 2012).

3.1.9 Popis esenciálních silic

Esenciální silice jsou těkavé, ve vodě nerozpustné olejové látky nebo sloučeniny produkované rostlinami pro jejich přežití, a to jak pro přilákání opylovačů, tak pro obranu (Neves et al. 2018). Jsou vylučovány a ukládány v glandulárních trichomech, modifikovaných epidermálních vlasových strukturách rostlin, v rezervoárech nebo kapsách, a dokonce i v mezibuněčných prostorech (Bismarck et al. 2020). Oleje jsou tedy souhrnná směs kapalin, které jsou intenzivní a mají příjemnou vůni, jejichž hlavní charakteristikou je těkavost, která je odlišuje od pevných olejů extrahovaných z lipidových semen (Neves et al. 2018). Skládají se hlavně z terpenů nebo fenylypropanoidů, které se mohou vyskytovat i současně (Reichling et al. 2009). Hlavní složky esenciálních silic jsou monoterpeny a seskviterpeny včetně sacharidů, alkoholů, etherů, aldehydů a ketonů, které jsou zodpovědné za vonné a biologické vlastnosti aromatických a léčivých rostlin (Váczí et al. 2018). Esenciální silice a další rostlinné extrakty mají antibakteriální, protiplísňové, a antivirové vlastnosti a byly celosvětově prověřeny jako potenciální zdroje nových antimikrobiálních sloučenin, alternativy k léčbě infekčních chorob a na podporu růstu a využití živin (Ebani et al. 2016). Antimikrobiální vlastnosti extraktů léčivých rostlin pocházejí z velkého množství sekundárních metabolitů. Jedná se o meziprodukty nebo konečné produkty rostlinného metabolismu, které nejsou zásadní pro životní procesy rostlin, hrají obrannou roli vůči bakteriím, houbám, prvokům a virům (Gorlenko et al. 2020). Sekundární metabolity zahrnují chininy, alkaloidy, lecitiny, polypeptidy, flavony, flavonoidy, kumarin, terpenoidy, silice a

taniny (Vercelli et al. 2021). Je důležité zmínit, že chemické složení a tím i biologické vlastnosti esenciálních olejů se liší v závislosti na různých endogenních a exogenních faktorech, jako je rostlinný druh a hemotyp, stáří, část rostliny, ze které jsou extrahovány, geografická oblast, klima, přítomnost a množství mikroorganismů, hmyzu a dalších (Štrbac et al. 2021). Esenciální silice dnes našly široké uplatnění v různých oblastech, proto se využívají v kosmetickém průmyslu, potravinářství, ale také k léčbě různých onemocnění, která je známá jako aromaterapie (Dhifi et al. 2016).

Esenciální silice mají antimikrobiální aktivitu, z toho důvodu mohou nahrazovat léčbu antibiotiky či antimykotiky (Bismarck et al. 2020), jelikož některé léky mohou způsobit přecitlivělost v daném místě, například v uších mohou dokonce poškodit i část vnitřního ucha (hlemýžďě rovnovážného labyrintu) nebo sluchového nervu (Neves et al. 2018). Doplnky, které obsahují esenciální oleje mají pozitivní vliv na některé nemoci, například na chronickou či atopickou dermatitidu, nosní hyperkeratózu nebo pyodermii. Dále má kladný vliv na zápach u psů anebo při použití jako přísady do ústní vody má antimikrobiální vlastnosti, případně pomáhá i při léčbě abscesů (Bismarck et al. 2020). Esenciální oleje mají též významné antiseptické, antioxidační, antiparazitární a insekticidní účinky (Chouhan et al. 2017). Hlavním omezením pro použití těchto rostlinných produktů je však nedostatečně prověřená bezpečnost použití. Některé esenciální oleje jsou tedy považovány za toxické pro domácí mazlíčky, zejména při použití u koček (Štrbac et al. 2021), důvodem je pravděpodobně nedostatek některých jaterních enzymů, které se podílejí na metabolických procesech (jako UDP-glukuronosyltransferáza u koček), což vede k hromadění některých účinných látek v organismu a jejich toxicitě (Court 2013). Proto je nutná opatrnost a racionální aplikace z hlediska adekvátního výběru rostlinných druhů, dávkování, koncentrace a způsobu použití. Kromě toho, protože esenciální oleje jsou náchylné k odpařování a nestabilitě, může technika enkapsulace dále zvýšit jejich účinnost *in vivo* a také umožnit řízené uvolňování. To může snížit potřebnou dávku a dodatečně zvýšit bezpečnost jejich aplikace (Štrbac et al. 2021).

3.1.10 Výroba esenciálních olejů

Esenciální oleje jsou velmi složité přírodní směsi, které jsou tvořeny aromatickými rostlinami jako sekundárními metabolity. Tyto sloučeniny se extrahují různými metodami a mohou obsahovat přibližně 20 až 60 složek s různými koncentracemi. Esenciální oleje se vyznačují několika hlavními složkami, jejichž vysoké koncentrace určují jejich biologické vlastnosti (Mugnaini et al. 2013). Vyrábí se pomocí vodní destilace (Nazzaro et al. 2017) neboli hydrodestilací, extrakcí rozpouštědlem, lisováním za studena, parní destilací a mikrovlnnou extrakcí (Štrbac et al. 2021). Nejčastější metodou je destilace vodní párou. Zajímavostí je že destilaci jako metodu výroby esenciálních olejů používali již Egypťané, Indové a Peršané před dvěma tisíciletími a zdokonalili ji Arabové v 9. století našeho letopočtu (Sakkas & Papadopoulou 2017). Například ve studii Simonetti et al. (2016) byla vysušená biomasa z kořenů Třezalky tečkované (*Hypericum perforatum*) pěstovaná za kontrolovaných podmínek s mlhovým bioreaktoru ROOTec a posléze byla extrahována rozpouštědly se vzrůstající polaritou (tj. methanol, chloroform a ethylacetát). Jednou z možností je vyrobit i

směsi z více esenciálních silic. Tyto sloučeniny by měly mít stejné vlastnosti jako rostliny, ze kterých pocházejí (Nardoni et al. 2017).

In vitro difúzí na agarovém disku je možné testovat antimikrobiální aktivitu esenciálních olejů (Bismarck et al. 2020). Tuto aktivitu nelze snadno porovnávat, protože různé studie využívají různé metody. Příkladem je již zmiňovaná difúze na agarovém disku (Rusenova & Parvanov 2009) nebo také mikroředění. Za ideálních podmínek při mikroředění dochází k přímému kontaktu mezi kvasinkami a všemi aktivními složkami esenciálního oleje, na rozdíl od diskové agarové difúze, kde aktivita esenciálního oleje závisí na difúzi aktivních složek v agaru. Všechny metody nemusí být využitelné u daného esenciálního oleje (Bismarck et al. 2020).

Techniky zapouzdření esenciálních silic jsou novější a zájem o ně roste v různých oblastech. Zapouzdření je proces ochrany aktivních složek fyzikálními nebo chemickými procesy, při kterých se vytváří ochranný povlak. Tímto způsobem je účinná látka fyzicky oddělena od okolí vytvořením ochranného povlaku. Vytvořené kapsle mohou mít různé velikosti (makro, mikro a nano) (Maes et al. 2019). Což by mohlo mít zvláštní význam, pokud jde o esenciální oleje a jejich aplikaci ve veterinární medicíně. Zapouzdření totiž snižuje interakci účinných látek s různými faktory a snižuje rychlost odpařování. Kromě toho tato technika umožňuje řízené uvolňování aktivní látky, což je důležité vzhledem k tomu, že různé aplikace často vyžadují zvýšenou retenci aktivních složek a různé profily uvolňování. Zapouzdření esenciálních olejů také snižuje jejich silný zápach, který může být významný s ohledem na extrémně citlivý čich u psů a koček (Radünz et al. 2018)

3.1.11 Využívané silice

Mezi nejčastěji zkoumané esenciální silice patří především silice z kajeputu střídavolistého (*tea tree*), viz kapitola níže 3.1.11.1, (Neves et al. 2018), dále pak silice z citronové trávy (*Cymbopogon citratus*), silice z pelargónie vonné (*Pelargonium odorata*), zimní saturejky (*Satureja hortensis*), oregana (*Origanum vulgare*), palmarosy (*Cymbopogon martinii*), meduňky lékařské (*Melissa officinalis*), tymiánu (*Thymus vulgaris*), listu skořice (*Cinnamomum zeylanicum*) a hřebíčku (*Caryophyllus aromaticus*), koriandrových semínek (*Coriandrum sativum*), které zkoumala studie zabývající se antifungální *in vitro* aktivitou esenciálních olejů proti klinickým izolátům *Malassezia pachydermatis* z roku 2020 a prokázala, že zejména silice ze zimní saturejky (*Satureja hortensis*), citronové trávy (*Cymbopogon citratus*), oregana (*Origanum vulgare*), palmarosy (*Cymbopogon martinii*) a olej z listů skořice (*Cinnamomum zeylanicum*) vykazují vynikající *in vitro* aktivitu proti klinickým izolátům *Malassezia pachydermatis* (Bismarck et al. 2020). Esenciální silice z kořene třezalky tečkované (*Hypericum perforatum*) ukázaly, že jsou slibnými biotechnologickými nástroji pro produkci antifungálních extraktů proti *Candida* spp. a dermatofytům (Tocci et al. 2011). Řada esenciálních silic ze středomořských rostlin (např. citroník limonový (*Citrus limon*), šalvěj muškátová (*Salvia sclarea*), šalvěj rozmarýna (*Rosmarinus officinalis*) a heřmánek římský (*Anthemis nobilis*) má antimykotickou aktivitu a některé z nich byly samostatně účinné proti *M. pachydermatis* jak *in vitro*, tak *in vivo* u psů s *Malassezia dermatitis*. Směs složená z citroníku limonového (*Citrus limon*) 1 %, šalvěje muškátové (*Salvia sclarea*) 0,5 %, Šalvěje rozmarýny (*Rosmarinus officinalis*) 1 % a

heřmánku římského (*Anthemis nobilis* či *Chamaemelum nobile*) 0,5 % přinesla vynikající výsledky u všech léčených psů s *otitis externa* způsobený *Malassezia pachydermatis* (Nardoni et al. 2017). Ze studie Mugnaini et al. 2013, která testovala antimykotickou formulaci směsi mateřídoušky úzkolisté (*Thymus serpyllum*) 2 %, oregana (*Origanum vulgare*) 5 % a Šalvěj rozmarýny (*Rosmarinus officinalis*) 5 %, vyplývá že daná směs se jevila jako všestranný nástroj pro omezení růstu plísní.

3.1.11.1 Kajeput střídavolistý (tea tree)

Melaleuca alternifolia, známá jako kajeput střídavolistý pochází z Austrálie (Silva et al. 2002). Domorodci v Austrálii drtily listy tea tree, aby si vytvořili antibakteriální obklady, staletí před vědeckými poznatky o mikroorganismech (Simões et al. 2002). Esenciální silice extrahované z listů hydrodestilací mají prokazatelné antivirové, antibakteriální a antiplísňové účinky (Silva et al. 2002). Od roku 1996 je složení silice z tea tree standardizováno a zároveň ustáleno pod mezinárodním názve „Oil of Melaleuca – typ Terpinin-4-ol (tea tree oil)“. Dříve existovala pouze australská norma, která stanovovala, že obsah terpinen-4-olu musí překročit 30 %, zatímco obsah 1,8-cineolu v oleji z tea tree nesmí překročit 15 %. Mezinárodní norma je velmi podobná australské, jen je obsáhlejší a specifikuje limity složení pro 14 z přibližně 100 složek (viz tabulka 4) (Carson & Riley 2001). Důvodem pro ustanovení obsahu cineolu pod 15 % je, že způsobuje alergické reakce a terpinen-4-olu mezi 30-40%, aby byla zajištěna jakákoliv antiseptická účinnost. Při dodržení stanovených požadavků na složení silice z tea tree, je velmi nízké riziko alergických či jiných nežádoucích reakcí organismu (Neves et al. 2018). Studie zabývající se léčbou infekce ušním roztočem *O. cynotis* za pomoci tea tree u 30 psů, kde esenciální silice z tea tree vykazovala akaricidní vlastnosti *in vitro* od první hodiny léčby též neprokázala žádné nežádoucí účinky (Neves et al. 2013). Tea tree silice má antioxidační účinky na monokulární buňky lidské periferní krve tím, že snižuje produkci reaktivních druhů kyslíku a sekreci IL-2 v T lymfocytech a zvyšuje sekreci protizánětlivých cytokinů, jako jsou interleukin-4 a interleukin-10 (Di Cerbo et al. 2016).

V tea tree silici jsou přítomny seskviterpeny, monoterpeny a jejich odpovídající alkoholy, jeho hlavními složkami s antimikrobiálním účinkem jsou ale terpinen-4-ol (40 %), γ -terpinen (23 %) a α -terpinen (10 %) (Neves et al. 2018). Čím vyšší je obsah terpinen-4-olu, tím vyšší je antimikrobiální aktivita. Identifikace složek těkavých olejů se provádí plynovou chromatografií (Barin et al. 2007).

Studii esenciální silice z tea tree na kvasinkové a bakteriální infekce v uších u psů se zabývala Rita Naves a spol. v Brazílii v roce 2018, která zjistila, že silice z tea tree vykazovala významné snížení *Malassezia pachydermatis*, a jelikož má dobré antimikrobiální spektrum a neobjevují se zde žádné nežádoucí reakce potvrzuje to důležitost vývoje použití esenciální silice z tea tree jako alternativní léčbu ušních infekcí u psů (Neves et al. 2018). Zajímavostí je, že v Kanadě výzkum provedený v letech 2003/2004 ukázal, že silice z tea tree je účinná jak proti otitis, tak i proti blechám u koček a psů (Lans et al. 2008). Dále ji lze využít jako silný repelent proti komárům, vším a roztočům, jako je *Otodectes cynotis* (Neves et al. 2018). Zajímavostí je že α -terpinen ze silice kajeputy střídavolisté vykazovala *in vitro* tripanocidní účinek, který prodlužoval životnost myši infikovaných *Trypanosoma evansi* (Baldissera et al. 2016).

Tabulka 4. Mezinárodní požadavky na složení silice z kajeputy střídavolisté (Carson & Riley 2001).

| Komponent | Minimum (%) | Maximum (%) |
|---------------|----------------------------|-------------|
| Terpinolene | 1,5 | 5 |
| 1,8-cineole | neuvedeno | 15 |
| a-terpinene | 5 | 13 |
| g-terpinene | 10 | 28 |
| r-cymene | 0,5 | 12 |
| terpinen-4-ol | 30 (v praxi často cca 40%) | Neuvedeno |
| a-terpineol | 1,5 | 8 |
| Limonene | 0,5 | 4 |
| Sabinene | Stopkové množství | 3,5 |
| Aromadendrene | Stopkové množství | 7 |
| d-cadinene | Stopkové množství | 8 |
| Globulol | Stopkové množství | 3 |
| Viridiflorol | Stopkové množství | 1,5 |
| a-pinene | 1 | 6 |

3.1.11.2 Oregano (*Origanum vulgare*)

Tato bylina se řadí do čeledi *Lamiaceae* a jejím hlavním zástupcem je *Origanum vulgare*. Oregano roste v nadmořských výškách 400-1800 m a na slunných místech. Obsah *O. vulgare* silice kolísá od 0,5-2 % až do 7 % a její hlavní složkou jsou izomerní fenoly karvakrol a thymol a také jejich prekurzory monoterpeny p-cymen a γ -terpinen v nižším podílu (Sakkas & Papadopoulou 2017). Oreganový esenciální olej neboli *Origanum vulgare* má hlavní složku antimikrobiální, což znamená že je účinná proti plísním, bakteriím a kvasinkám. Obsahuje 60 – 75 % fenolů (Sim et al. 2019).

Esenciální oleje z oregana je dále možné využít jako antioxidanty nebo k protizánětlivé aktivitě (Leyva-López et al. 2017). Podle studií souvisejících s antioxidačními vlastnostmi silice z oregana má nejintenzivnější antioxidační sílu s pozoruhodnými účinky v prevenci oxidace tuků díky vysokému obsahu thymolu a karvakrolu (McKay & Blumberg 2006). Předpokládá se, že by je bylo možné využít i proti kardiovaskulárním chorobám, ale jejich účinek na kardiovaskulární systém není zcela znám kvůli nedostatku studií (Dantas et al. 2015). Dále se uvádí, že esenciální oleje z oregana mají i antidiabetické účinky, které souvisejí již se zmíněnými hlavními složkami karvakrol a thymol (Yen et al. 2015) a některé druhy oregana patří mezi nejvíce studované byliny jako potenciální hypoglykemická terapeutická činidla (Cazzola & Cestaro 2014). U lidí bylo dokonce prokázáno, že mají esenciální oleje z oregana antiproliferační aktivitu. Bylo to prokázáno na různých modelech rakovinných buněk (Sharifi-Rad et al. 2017) a nakonec bylo popsáno, že esenciální oleje z oregana obsahují vysoce bioaktivní sloučeniny, které mají akaricidní a insekticidní účinky (Cetin et al. 2009). Oregano má celkem 19 druhů a dle toho se také liší jejich přesná účinnost a aktivita viz tabulka 5 (Leyva-López et al. 2017). Nejvýznamnějšími druhy jsou *O. vulgare* s

poddruhem *O. vulgare subsp. L. vulgare*, *O. vulgare subsp. L. glandulosum*, *O. vulgare subsp. L. gracile*, *O. heracleoticum* a *O. dictamnus*. Obecně platí, že koncentrace esenciálního oleje závisí na druhu, ročním období sběru rostliny, geografické poloze, části rostliny, která se používá, a metodě extrakce oleje (Sakkas & Papadopoulou 2017).

Dle studie Sim et al. (2019) bylo zjištěno, že *Malassezia pachydermatis* je citlivější na olej z oregana než na esenciální olej z tymiánu. Esenciální olej z oregana se používá i ve výživě psů, společně s hřebíčkem, rozmarýnem a vitamínem E tvoří přírodní antioxidační krmivo (Schlieck et al. 2021).

Tabulka 5: Znázorňuje biologické aktivity esenciálních olejů z oregana. Vysvětlení použitých zkratk v tabule: NO – oxid dusnatý, ROS - reaktivní formy kyslíku, které mohou způsobit oxidační stres/poškození (ROS, z angl. reactive oxygen species), RAW 264.7 je buněčná linie makrofágů, LPS – lipopolysacharid, DPPH - organická chemická sloučenina 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl, ABTS - V biochemii je ABTS chemická sloučenina používaná k pozorování reakční kinetiky specifických enzymů. Běžně se používá v enzymatickém imunisorbentním testu k detekci vazby molekul k sobě navzájem. (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)), MCF – 7 - Název buněčné linie Michigan-Cancer-Foundation-7. (Převzato z Leyva-López et al. 2017).

| Druhy oregana | Biologická aktivita | Účinek |
|-------------------------|---------------------|--|
| <i>O. acutidens</i> | Antioxidační | Prokázala vyplachovací aktivitu proti radikálu DPPH |
| <i>O. compactum</i> | Antioxidační | ABTS aktivita pohlcující radikály |
| | Cytotoxický | Netoxický při použití v buňkách MCF-7 |
| <i>O. dictamnus</i> | Antioxidační | Redukční/antioxidační síla železa |
| | Antiproliferační | Inhibuje proliferaci buněk karcinomu tlustého střeva a hepatokarcinomu |
| <i>O. ehrenbergii</i> | Antioxidační | Aktivita vychytávání radikálů DPPH |
| <i>O. glandulosum</i> | Antioxidační | Prokázal antiradikálovou aktivitu |
| <i>O. heracleoticum</i> | Protizánětlivé | Inhibice produkce NO |
| <i>O. libanoticum</i> | Antioxidační | Redukční/antioxidační síla železa |
| | Antiproliferační | Inhibují proliferaci buněk hepatokarcinomu |
| <i>O. majorana</i> | Protizánětlivé | Snížení sekrece zánětlivých cytokinů (TNF- α , IL-1 β a IL-6) v buňkách THP-1 |
| | Antigenotoxický | Snižuje chromozomální aberaci v buňkách kostní dřeně potkanů |
| | Cytotoxický | Inhibují životaschopnost buněk lidských buněčných linií rakoviny prsu (MCF-7) a prostaty |
| <i>O. microphyllum</i> | Antioxidační | Ukázal železitou redukční sílu |
| <i>O. minutiflorum</i> | Antioxidační | Zpomalená oxidace lipidů |
| <i>O. onites</i> | Antioxidační | Prokázalo vychytávání volných radikálů proti radikálu DPPH |
| | Antiangiogenní | Blokuje tvorbu trubic <i>in vitro</i> |
| <i>O. rotundifolium</i> | Antigenotoxický | Snižuje účinek aflatoxinu B 1 (AFB 1) v lidských periferních lymfocytech |

| | | |
|---|------------------|--|
| <i>O. syriacum</i> | Antioxidační | Aktivita vychytávání radikálů DPPH |
| <i>O. virens</i> | Antioxidační | Prokázala vyplachovací aktivitu proti radikálu DPPH |
| <i>O. vulgare</i> subsp. <i>hirtum</i> | Antioxidační | Celková redukční kapacita (Folin-Ciocalteuova metoda), aktivita pohlcující radikály při peroxidaci indukované UV zářením v lipozomálních membránách. |
| | Antiproliferační | Inhibovat proliferaci buněk epitelálního (A549) lidského plicního adenokarcinomu |
| | Cytotoxický | Snižte životaschopnost buněk způsobem závislým na koncentraci na buněčných liniích lidských keratinocytů (HaCaT) a rakoviny plic (A549) |
| | Hypoglykemický | Inhibiční aktivita α -amylázy a α -glukosidázy |
| <i>O. vulgare</i> subsp. <i>vulgare</i> | Antioxidační | Zabraňte autooxidaci esterů polynenasycených mastných kyselin |
| | Protizánětlivé | Inhibice hladin zánětlivých biomarkerů (MCP-1, VCAM-1 a ICAM-1) na aktivovaných primárních lidských neonatálních fibroblastech |
| | Antiproliferační | Inhibuje proliferaci buněk lidského adenokarcinomu prsu (MCF-7) a adenokarcinomu tlustého střeva (HT-29) |
| | Protinádorová | Snížení velikosti nádorů u nemocných myší |
| | Hypoglykemický | Inhibuje aktivitu α -amylázy a α -glukosidázy |

Pythium oligandrum

3.1.12 Taxonomie

Říše: Chromavelolata

Kmen: Heterokontophyta

Třída: Peronosporomycetes (Oomycetes)

Řád: Pythiales

Čeleď: Pythiaceae

Rod: *Pythium*

Druh: *Pythium oligandrum* (Lévesque & De Cock 2004)

3.1.13 Historie

První druhy rodu *Pythium* jako první popsal Drechsler (1943). Byly charakterizované svými ostnatými oogoniemi a tím, že parazitovali na jiných patogenních druzích *Pythium*. Tyto nepatogenní druhy rostlin *Pythium* byly hlášeny jako *Pythium oligandrum*, *Pythium acanthicum* a *Pythium periplocum* (Drechsler 1943). O přibližně 20 let později Lifshitz et al. (1984) zjistili že jiný druh *Pythium*, identifikovaný jako *Pythium nunn*, který

byl izolovaný z půdy v Coloradu, potlačil preemergentní útlum sazenic okurek způsobený *Pythium ultimum* ve skleníkových pokusech. Ve stejné době Foley a Deacon (1985) uvedli, že nový druh *Pythium*, označovaný jako *Pythium mycoparasiticum*, byl schopen parazitovat na řadě houbových patogenů. Další ostnaté oogonální druhy *Pythia* s mykoparazitickou aktivitou byly *Pythium acantophoron*, který byl objeven Lodhou & Webster (1990) a *Pythium lycopersicum*, který byl izolovaný v Turecku Karacou et al. (2008). Tyto dva druhy byly přidány do užšího výběru nepatogenních druhů *Pythia* (Karaca et al. 2008).

Chápání biologických principů působení *P. oligandrum* značně přispělo k odhalení složitého aparátu vyvinutého touto oomycetou ve vztahu k její schopnosti: 1) kolonizovat rhizosféru mnoha plodin a soutěžit o prostor a živiny, 2) přímo napadat řadu půdních houbových patogenů včetně askomycetů (Benhamou et al. 1997), patogenních oomycetů (Benhamou et al. 1999), sklerocia neboli klidové struktury (Rey et al. 2005) a basidomycetů (Ikeda et al. 2012). Za 3) podporují růst rostlin z důvodu produkce tryptaminu a prekurzoru auxinu (Le Floch et al. 2003) a za 4) poskytují lepší ochranu plodinám proti bakteriálním a houbovým chorobám pomocí aktivace imunitního systému rostlin (Benhamou et al. 2012).

Všechny dosud identifikované prospěšné druhy *Pythium* jsou považovány za potenciální biokontrolní látky z důvodu jejich agresivité vůči široké škále půdních patogenů, ale *Pythium oligandrum*, je organismem, který byl předmětem podrobnějších výzkumů, důvodem může být to že je běžným obyvatelem mnoha půd (Ribeiro & Butler 1992) nebo že antagonismus *Pythium oligandrium* proti patogenním druhům *Pythium* představuje relativně jedinečnou a vzácnou situaci v biologické kontrole, jelikož činidlo biologické kontroly je ze stejného rodu jako patogen, který kontroluje (Lévesque 2011).

3.1.14 Charakteristika *Pythium oligandrum*

Houba *Pythium oligandrum* je účinný mykoparazit hospodářsky významných patogenů plodin. Může přímo parazitovat na patogenu plísňě bramborové (*Phytophthora infestans*) a je přístupný genetické transformaci. *P. oligandrum* vytváří symbiotické vztahy s kořeny rostlin aktivně podporujícími růst rostlin a také poskytuje rostlině zvýšenou ochranu před dalšími patogeny (Kushwaha et al. 2017). *Pythium oligandrum* je půdní mikromyceta s mykoparazitickými vlastnostmi, která se úspěšně používá v zemědělství pro kontrolu plísňových infekcí na rostlinách. Je přirozeně rozšířen po celém světě (Načeradská et al. 2017). Někteří zástupci toho rodu jsou přítomné i ve vodním prostředí (Sankaranarayanan & Amaresan 2020). Expresí elicitinů aktivuje obranyschopnost rostliny a tím aktivuje rostlinu a chrání ji před následným napadením (Benhamou et al. 2012). Mykoparazitismus je v linii oomycet relativně vzácný a většina sekvenovaných oomycet je fytopatogenní. Celogenomové sekvenování více kmenů *P. oligandrum* tak napomůže vývoji tohoto druhu jako modelu mykoparazitismu. Poznatky z těchto analýz usnadní udržitelnou kontrolu chorob rostlin prostřednictvím lepšího pochopení mechanismů jak mykoparazitismu, tak primingu, které tento organismus projevuje (Kushwaha et al. 2017). Mykoparazitismus lze definovat jako schopnost mykoparazita přímo napadat patogenní houbu a/nebo oomycetu. Vztah vytvořený mezi *P. oligandrum* a rostlinou se spoléhá na svou pozoruhodnou schopnost rychle kolonizovat všechny kořenové tkáně podobným způsobem jako patogenní oomycety a

následně degenerovat bez poškození hostitelské tkáně (Benhamou et al. 2012). Jedna srovnávací studie na kultuře cukrové řepy ukázala, že mykoparazitická houba *P. oligandrum* byla účinnější než standardní chemické antimykotikum (Brožová 2002). Antifungální účinnost tohoto mikroorganismu přímo souvisí s jeho růstovými potřebami. *P. oligandrum* tvoří klasické, invazivní, velmi rychle rostoucí hyfy, kulovité oogonie s malými cípy o velikosti 21–31 μm a produkuje oligandrin, komplex různých enzymů a fermentů, které usnadňují jeho průnik do těla cílové houby. Další specifickou biologickou vlastností druhu *Pythium* je produkce sporangií, které uvolňují zoospory. Zoospory *P. oligandrum* napadají hyfy cílových hub (Načeradská et al. 2017). Tento organismus v podstatě získává potřebné růstové živiny pouze konzumací cílových hub. Když nezůstanou žádné další živiny, zmizí z oblasti (Laing & Deacon 1991).

Velikost sestavení genomu *P. oligandrum* je 41,9 Mb s 15 007 předpokládanými geny kódujícími proteiny (Faure et al. 2020). *P. oligandrum* přechází z vegetativního růstu ve formě mycelia na pohlavní rozmnožování, 4 až 7 dní po inokulaci do kultivačního média. Vyznačuje svými ostnatými oogoniemi (přibližně 20 μm v průměru) napříč hostitelskou kolonií, produkující četné fruktifikační orgány na rozdíl od hostitelské kolonie parazitované druhy (Bělonožníková et al. 2022a). Produkuje rychle rostoucí hyfy, kulaté oogonie s hroty a velké množství enzymů (chitinázy, celulázy, proteázy a glukonázy) společně označovaných oligandrin, které rozkládají buněčnou stěnu hostitelských buněk, což vede k úplné destrukci cytoplazmy a smrti hostitele (Gerbore et al. 2014). U hostitelských druhů oospory *P. oligandrum* také hojně klíčí, ale sexuální reprodukce u *Pythia* vyžaduje steroly. K extrakci těchto sterolů, *P. oligandrum* produkuje dva typy proteinových elicitorů, včetně extracelulárního proteinu oligandrinu a proteinových frakcí buněčné. Oospory *P. oligandrum* klíčí pomalu a nepravidelně (obvykle 8–12 hodin) (Bělonožníková et al. 2022a). Největší výhodou *P. oligandrum* je, že neexistují žádné zprávy ani důkazy o negativních účincích na organismy, které očekávají cílené patogenní houby. Využívá se u lidí i u zvířat (Načeradská et al. 2017). Lokální použití *P. oligandrum* v posledních letech stoupá. Důvodem může být to že standardní systémové a lokální terapie jsou relativně drahé, vyžadují dlouhodobou aplikaci a mohou způsobit vedlejší účinky (například u zvířat s dermatofytózou) kvůli povaze jejich aktivních složek (Gabrielová et al. 2018). Dalším důvodem je to, že je pro lidi i zvířata nepatogenní (Tan et al. 2015)

Pythium oligandrum je oomyceta používaná ve veterinární medicíně k léčbě dermatofytózy u zvířat. Ovicidní potenciál proti různým typům vajíček parazitů nebyl donedávna zkoumán, až studie Luca et al. (2022), zjistila, že *Pythium oligandrum* má ovicidní účinek, což podpořilo vyhlídky na jeho použití v metodách dekontaminace různých povrchů nebo prostředí, kde se vyskytují vajíčka škrkavek od masožravců. Studie Načeradské z roku 2017 se zabývá *in vitro* vizualizací antifungálních účinků *P. oligandrum* proti myceliální formě tří běžných dermatofytních patogenů: *M. canis*, *M. gypseum* a *T. mentagrophytes* u koček. Zjistilo se že *P. oligandrum* má antifungální účinnost proti již zmíněným dermatofytním patogenům. Makroskopicky vykazovaly kolonie hub v kontaktu s tímto biologickým antimykotikem rychlou ztrátu hyf, pravděpodobně v důsledku přímé eliminace *P. oligandrum* (Načeradská et al. 2017). Pozitivní vliv *P. oligandrum* u koček postižených *Microsporum canis* dokazuje i novější studie u koček v Českém útulku, kterou se opět zabývala doktorka Načeradská et al. (2021). Prokázala se dokonce i srovnatelná účinnost

alternativní léčby přípravkem obsahující *P. oligandrum* a antimitotické léčby intrakonazolem. Z toho důvodu je alternativní léčba doporučována jako levnější a šetrnější alternativa k itrakonazolu pro léčbu a prevenci dermatofytóz, zejména v útlucích nebo velkochovech, kde je klasický způsob terapie drahý a obtížně zvládnutelný i u nemocných zvířat (FeLV nebo FIV pozitivní).

3.1.15 *Pythium oligandrum* při kvasinkových infekcích

P. oligandrum je schopno přímo napadat několik houbových patogenů pomocí různých mechanismů (Gerbore et al. 2014), ale využití výhradně při kvasinkové infekci se zatím zkoumalo pouze u rostlin. Nejprve *P. oligandrum* působí jako mykoparazit, vylučuje různé hydrolytické enzymy, které degradují buněčnou stěnu hostitele (zejména chitinázy, celulázy, endo- β -1,3-glukanázy, různé exoglykosidázy, proteázy a fosfatázy) a soutěží s patogeny o živiny a prostor. Jako příklad lze uvést, že genom *P. oligandrum* obsahuje 114 glykosidových hydroláz, z nichž 79 je sekretováno (Bělonožníková et al. 2022b). Posléze *P. oligandrum* produkuje řadu elicitorů nazývaných oligandriny (tj. OLI-D1, OLI-D2 a OLI-S1) a proteinové frakce buněčné stěny (tj. POD-1, POD-1a, POD-1b, POD-2 a POS-1) (McGowan & Fitzpatrick 2017). Tyto nízkomolekulární proteiny indukují obranné systémy rostlin, čímž iniciují lokálně i systémově indukovanou rezistenci proti houbovým, oomycetovým a bakteriálním patogenům. Za třetí, *P. oligandrum* obsahuje další proteiny, které mohou ovlivnit imunitní systém rostliny (Bělonožníková et al. 2022a).

4 Metodika

V diplomové práci jsem sbírala vzorky psů s příznaky otitid a zdravých psů (resp. psů bez příznaků otitid). Vzorky se odebíraly výtěrový tampónem sterilním s transportním médiem AMIES a s aktivním uhlím viz obrázek 9. (výrobce: DIALAB, kód produktu: 300285; dodáno ArgoMed, a.s., Jazlovce-Říčany).



Obrázek 9: Výtěrové sterilní tampóny s transparentním médiem AMIES a s aktivním uhlím doručené ke kultivaci.

Vzorky psů s příznaky ušní infekce byly odebírány ve spolupráci se dvěma veterinárními klinikami v Praze, vybranými na základě ochotě ke spolupráci a dojezdové vzdálenosti od mého bydliště:

- Výuková veterinární ambulance ČZU (Kamýcká 129, 165 00 Praha 6 – Suchdol)
- Veterinární Klinika Nusle – Schwetter a kol. (Boleslavova 20, 140 00 Praha 4 – Nusle)

Obě pracoviště obdržela výtěrové sterilní tampóny s transparentním médiem AMIES a aktivním uhlím, stručný návod k odběrům a krátký anamnestický protokol. Další komunikace s klinikami probíhala následovně:

- vždy, když se objevil pes s příznaky otitid, ošetřující lékař zhotovil a vyšetřil cytologický preparát a po potvrzení nálezu kvasinek vzorek odebral zmíněným tampónem
- veterinární lékař po souhlasu majitele vyplnil krátký anamnestický protokol (viz obrázek 10)
- já jsem veterinární kliniky každý druhý den kontaktovala a vzorky si přebírala

Informace o vzorku - kvasinky

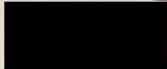
Číslo vzorku: 3a (22.11.2022) U22

Jméno: FRODO

Pohlaví: samec Plemeno: Fr. buldoček

Nález na cytologii: Kvasinky ++, bakterie g.

Krátká anamnéza: akutí zánět, dříve kontrola po terapii otitidy ušima a brachyury.

Podpis majitele: 

Informace o vzorku - kvasinky

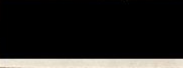
Číslo vzorku: 1 U24

Jméno: Geg

Pohlaví: ♂ Plemeno: Staffbull

Nález na cytologii: kvasinky ++, koky +

Krátká anamnéza: operace otitidy, jednovrstevná PO, neposlady 6 měsíců zpět

Podpis majitele: 

Obrázek 10: Příklad jednoduchých anamnestických protokolů.

Vzorky zdravých psů bez klinických příznaků otitid jsem sbírala od psů přátel, rodiny a známých. Většinou jsem je odebírala sama u majitele doma nebo venku a poté jsem požádala o vyplnění protokolu.

Sběr materiálu probíhal od 26. července 2022 do 2. února 2023. Odebrané vzorky byly následně uchovávány v ledničce při teplotě cca 4 až 5 °C. Každý vzorek byl transportován na Výzkumný ústav rostlinné výroby v Praze – Ruzyni do laboratoře. Celá následující spolupráce probíhala pod odborným dohledem RNDr. Davida Novotného, Ph.D.

Materiál

V diplomové práci jsem na záchyt kvasinek testovala celkem 35 psů, z toho 18 zdravých a 17 jedinců s příznaky otitid. Pro potřebu studie byli rozděleni do dvou skupin: psi s příznaky otitid a zdraví psi (viz tabulky 6 a 7). V tabulkách jsou uvedeny data získaná z anamnestických protokolů: číslo, které určuje, v jakém pořadí byly odebrány, jméno, pohlaví, věk, cytologický nález a případně i krátká anamnéza. U zdravých psů se cytologie neprováděla z toho důvodu není ani uvedena v tabulce 7.

Do kategorie psů s otitidami jsem zařadila psy, u kterých probíhal akutní, chronický, recidivující ušní zánět. Zánět v uších byl většinou definován přítomností klinických příznaků (třes hlavou, škrábání v uchu, erytém, edém a další klinické příznaky, které jsou zmíněné v kapitole 3.1.4.2) a pozitivním nálezem mikroorganismů v uchu při cytologickém vyšetření. Každý pes zařazený do této kategorie prošel na veterinárních klinikách (Veterinární Klinika Nusle - Schwetter a kol. a Výuková veterinární ambulance na ČZU) minimálně klinickým, otoskopickým nebo cytologickým vyšetřením.

Kategorie zdravých psů byla definována jako skupina psů, u kterých nebyly zaznamenány žádné projevy připomínající otitidy, z toho důvodu nebyly tyto vzorky odebírány na veterinárních klinikách.

Tabulka 6: Základní anamnestická data psů s otitidami

| Číslo vzorku: | Jméno: | Pohlaví: | Věk: | Plemeno: | Cytologie: | Krátká anamnéza: |
|---------------|---------|----------|-----------|-----------------------------|--|--|
| 1. | Bob | Samec | 7 let | Stafordširský bulteriér | Kvasinky + | - |
| 2. | Ruppert | Samec | 11 let | Kříženec | Kvasinky + | Častá recidiva kvasinkové otitis – údajně způsobená nekvalitním krměním |
| 3. | - | Samec | 10 let | Kříženec | Kvasinky + | Neuvedeno |
| 4. | Erwin | Samec | - | Stafordširský bulteriér | Kvasinková otitis ++ | Atopická dermatitida – zánětlivé kožní onemocnění, opakující se záněty uší |
| 5. | Filip | Samec | - | Čivava | Směšena bakteriální a kvasinková infekce, kvasinky + | Geriatrický pacient, otitis poprvé, unilaterální – pravé ucho |
| 6. | O64 | Samec | - | Francouzský buldoček | Kvasinková infekce unilaterální, kvasinky +++ | kvasinková infekce podruhé – recidiva (poprvé v červenci 2020) |
| 7. | Gimmy | Samice | - | West highland white teriér | Kvasinky ++ a bakterie + | Chronické otitidy |
| 8. | Zara | Samice | - | Alpský jezevčíkovitý brakýř | kvasinky, bakterie, neutrofilly | Zápach z ucha |
| 9. | Shelly | Samice | 13 měsíců | Border colie | Kvasinky + | - |
| 10. | Arthur | Samec | 6 let | kříženec | Kvasinky + | - |

| | | | | | | |
|-----|--------|--------|-----------|-------------------------|---|--|
| 11. | Oliver | Samec | 4 roky | Australský ovčák | Kvasinky + | - |
| 12. | Nera | Samice | 5 let | Kříženec | Nedělalo se | Opakované problémy, protřepávání hlavou, škrábání uší, terapie v posledním roce nebyla |
| 22. | Frodo | Samec | Neuvedeno | Francouzský buldoček | Kvasinky ++, bakterie ojedinele | Akutní zánět, 22. listopadu 2022 kontrola po terapii Otodinem a orilaieemght |
| 23. | Dona | Samice | Neuvedeno | Pudl střední | Kvasinková otitis | Před třemi dny koupel v salónu |
| 24. | Gegi | Samec | Neuvedeno | Stafordširský bulteriér | Kvasinky ++, bakterie kulovitého tvaru (koky) + | Opakované otitidy, jednostranné – pravé ucho, naposledy před půl rokem (červen 2022) |
| 34. | Lia | Samice | Neuvedeno | Rhodéský ridgeback | Kvasinky ojedinele v levém uchu | 2 dny klepe hlavou, bez hypertermie |
| 35. | Tina | Samice | 6 let | Anglický kokršpaněl | Smíšená infekce (kvasinky, bakterie) | Chronické otitidy |

Tabulka 7: Základní anamnestická data zdravých psů

| Číslo vzorku: | Jméno: | Pohlaví: | Věk: | Plemeno: | Krátká anamnéza: |
|---------------|---|----------|------------------------------------|-------------------|---|
| 13. | Bella | Samice | 6 let | Německý ovčák | Bez příznaků |
| 14. | Arya Laoghaire Endless Energy (LGH – Lyrii) | Samice | 5 a půl roku | Border collie | Ortopedické problémy, dříve zlomenina karpální kosti, žádné jiné příznaky |
| 15. | Darlet Tarlet (Darletka) | Samice | 1 rok | Border collie | Bez zdravotních problémů |
| 16. | Ginna | Samice | Cca 4 roky (adopce z útulku) | Kříženec | Bolest při doteku pravého ucha – pravděpodobně psychologického rázu |
| 17. | Viscorgó Barack (Zazu) | Samice | 3 roky | Mudi | Bez příznaků |
| 18. | Ayta Krayta Ze Zvolské chalupy (Maze) | Samice | 8 let | Border collie | Bez příznaků |
| 19. | Amy | Samice | 13 let | kříženec | Bez příznaků |
| 20. | A new hope Dreamfall (Bugi) | Samice | 2 roky | Border collie | Bez příznaků |
| 21. | Laila | Samice | 1 a půl roku | Kříženec | Bez příznaků |
| 25. | Kikina | Samice | 18 let | Yorkshire terrier | geriatrický pacient, od 16 let postupná ztráta sluchu – |

| | | | | | |
|-----|--------|--------|-----------|-----------------------|--|
| | | | | | momentálně hluchá, šedý zákal od 17 let, ortopedický pacient – luxace patelly, osteochondróza páteře, žádné příznaky otitis. |
| 26. | Trip | Samec | 13 měsíců | Border collie | Bez příznaků |
| 27. | Rochet | Samice | 3 roky | Jack russel teriér | Bez příznaků |
| 28. | Viki | Samice | 3 roky | Border collie | Bez příznaků |
| 29. | Pira | Samice | 11 měsíců | Parson russell teriér | Bez příznaků |
| 30. | Bailey | Samice | 6 let | Jack russell teriér | Bez příznaků |
| 31. | Heja | Samice | 11 měsíců | Border collie | Bez příznaků |
| 32. | Mandy | Samice | 9 let | Kříženec | Bez příznaků |
| 33. | Jaydee | Samice | 2 roky | Border collie | Bez příznaků |

Laboratorní metody

4.1.1 Kultivace kvasinek

Materiál na kultivaci:

- Sabouraud Dextrosa agar (SAD) – výrobce: HiMedia Laboratories (Thane (West) - 400 604, Maharashtra, India) - kat. č. M063, dodavatel: ČADERSKÝ-ENVITEK, spol. s r.o. (Bednářova 21, 619 00, Brno).
- Petriho misky o průměru 90 mm (140 kusů) - výrobce: GAMA GROUP a.s. (Mánesova 11/3b, 370 01, České Budějovice).
- Parafilm – dodavatel: VERKON s.r.o. (Pod Harfou 933/70, 190 00, Praha 9).

Materiál na přípravu preparátu:

- dvě sterilní jehly
- kahan
- kapka pitné vody
- injekční stříkačka
- Klasický mikroskop – Olympus CX41 a stereomikroskop SZ6045
- Podložní a krycí mikroskopická skla

Materiál na přeočkování:

- Petriho misky o průměru 60 mm - výrobce: GAMA GROUP a.s. (Mánesova 11/3b, 370 01, České Budějovice)
- 2% Malt extract agar (MA2) – složený ze surovin: malt extractu (dodavatel: VWR International s. r. o. (Pražská 442, 281 67, Stříbrná Skalice) a agaru (dodavatel: VERKON s.r.o. (Pod Harfou 933/70, 190 00, Praha 9)
- Plynový nebo lihový kahan
- sterilní jehla nebo klička

Postup:

Před samotnou kultivací jsem připravila Sabouraud Dextrosa agar (SDA), který se skládá z: mykologického peptonu 10 g/l, dextrózy 40 g/l a agaru 15 g/l. Příprava probíhala následovně:

- Navážení 6,5 g přípravku do 100 ml destilované vody.
- Zahřívání do úplného rozpuštění.
- Sterilizace v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut.

Následně jsem agarové živné médium nalila do plastových Petriho misek o průměru 90 mm. Každý zkoumaný vzorek byly inkubovány ve 4 Petriho miskách se SDA.

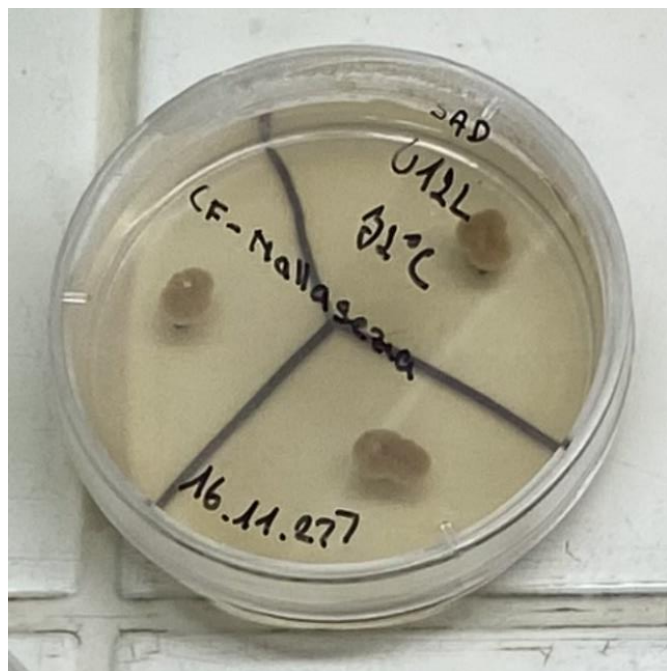
Na ztuhlý SDA v Petriho miskách jsem následně krouživým pohybem nanasla vzorek výtěrovým sterilní tampónem. Pro udržení mikroklimatu a snížení rizika kontaminace jsem misky uzavřela ze stran parafilmem a označila. Vzorky byly inkubovány při dvou kultivačních teplotách, tj. 32 °C a 35 °C (dvě misky od každého vzorku v dané teplotě). Kontrolu vzorku jsem prováděla po 7 dnech inkubace. Při kontrole se zjišťovala přítomnost kvasinek a jejich morfotyp a četnost kolonií v Petriho misce. Misky jsem nejprve prohlédla pouhým okem a poté jsem vytvořila preparáty dle postupu:

- na podložní sklo pod mikroskop jsem připravila injekční stříkačkou kapku vody
- následně jsem sterilní jehlou pod mikroskopem odebrala část kolonie, kterou jsem pomocí druhé sterilní jehly nanasla na do kapky vody na podložním skle a zakryla krycím sklem; pokud ve vzorku narostlo více různých kolonií, jehlu jsem opálila nad kahanem a proces opakovala.
- připravený preparát jsem pozorovala mikroskopem (Olympus CX41) při zvětšení 60x a posuzovala přítomnost bakterií a kvasinek

Vzorky s přítomností kvasinek jsem přeočkovávala do Petriho misek s průměrem 60 mm s 2% malt extrakt agarem (MA2) – složený ze surovin: malt extractu a agaru (obrázek 11). Postup přeočkování:

- sterilní jehlou jsem pod mikroskopem odebrala část kolonie kvasinek a přenesla do jednoho z vyznačených polí na dně Petriho misky (aby bylo možné zkontrolovat, zda nám kolonie roste a zároveň jasně kde ji hledat)
- po opálení jehly jsem proces opakovala i u zbylých dvou polí. Misky jsem následně uzavřela parafilmem a byly inkubovány při teplotě 32 °C
- z každého pozitivního vzorku jsem vytvořila vždy dvě přeočkované misky

Narostlé kolonie na přeočkováných miskách jsem posléze znovu přeočkovala na další dvě Petriho misky (průměr 60 mm), ale tentokrát jsem je nepřeočkovávala jehlou na jedno místo, ale pomocí kličky jsem vzorek nabrala a rozetřela jej po celém obvodu misky. Inkubace trvala týden při teplotě 32 °C a posléze se udělala izolace DNA a PCR z narostlých kolonií pro identifikaci zjištěných kmenů hub z vnějšího zvukovodu psů.



Obrázek 11: Petriho miska (průměr 60 mm) s přeočkovanou kvasinkou *Malassezia pachydermatis*.

4.1.2 Identifikace kvasinek metodou PCR

K získání DNA pro přípravu na PCR byla použita sada Phire Plant Direct PCR Kit z pětidenní kultury vypěstované na 2% malt extrakt agaru (MA2). Pro identifikaci byl amplifikován a následně sekvenován úsek z ITS oblast jaderné ribozomální DNA pomocí primerů ITS1F a ITS4 (Gardes & Bruns 1993).

PCR reakce probíhala následovně:

- denaturace při 98 °C 10 min, 35 cyklů: 98 °C 35s, 60 °C 20s, 72 °C 20s
- extenze při 72 °C 10 min.

Sekvenování amplifikovaných úseku bylo servisně provedeno ve firmě Macrogen. Získané sekvence byly zkontrolovány a porovnány pomocí programů Chromas a BioEdit. Druhová identita byla určena porovnáním sekvence DNA s databází NCBI pomocí programu BLAST.

4.1.3 Zjištění vlivu esenciálních silic na růst *Malassezia pachydermatis*

Cílem této části bylo zhodnocení *in vitro* antimykotické aktivity esenciální silice z tea tree a oregana proti *Malassezia pachydermatis* z uší psů se zánětem zevního zvukovodu, s chronickým zánětem nebo se zánětem středního ucha. Esenciální silice zařazené do studie byly vybrány pro svoji pozitivní účinnost, jak se uvádí v literatuře a pro svou dostupnost na trhu. Silice z oregana byly dodány firmou Biomedica, spol. s r.o. (Pekařská 8, 155 00, Praha 5) a silice z tea tree od téže společnosti. Složení silic je uvedeno v tabulce 8.

Tabulka 8: Znázorňující použité silice a jejich chemické složení.

| Latinský / český název | Čeleď | Složení silice |
|--|----------------------------------|---|
| <i>Origanum vulgare</i> / Dobromysl obecná (oregano) | <i>Lamiaceae</i> / Hluchavkovité | para-Cymene 4,7 % Thymol 2,5 % Carvacrol 71, 8% Linalool 2,8 % alpha-Pinene 0,2 % gamma-Terpinene 5,3 % |
| <i>Melaleuca alternifolia</i> / Kajeput střídavolistý (tea tree) | <i>Myrtaceae</i> / Myrtotvaré | Cineole 3 % para-Cymene 0,5 – 5 % Limonene 0,5 – 4 % alpha-Pinene 1 – 10 % Sabinene 3,5 % alpha-Terpinene 5 – 13 % gamma-Terpinene 15 – 25 % Terpinene-4-ol 39 % alpha-Terpineol 1,5 – 8 % Terpinolene 1,5 – 5 % |

použitý materiál na médium a na přeočkování do zkumavek:

- skleněné zkumavky s kovovým uzávěrem - 15 ml
- Sabouraud dextozové tekuté médium (SDM), složené ze 40 g dextrózy, 10g peptonu a 1000ml destilované vody
- reagenční lahve 400ml
- klička
- plynový kahan
- skleněné zkumavky s médiem

K přípravě pokusu bylo zapotřebí vzorky znovu přeočkovat. Vybrala jsem 5 kmenů, které se v tomto pokusu využily (čísla vzorků: 21, 23, 29, 15, 22). Důvody výběru daných vzorků:

- dobře rostoucí kmeny
- rozdílné kmeny *Malassezia pachydermatis* (nebyla zde možnost setkání psů a přenesení stejného kmene viz tabulka 9)

Postup přípravy:

Startovní kultury:

Kmeny hub jsem očkovala do zkumavek se SDM. Před očkovaním jsem připravila zkumavky následovně:

- do dvou reagenčních lahví jsem navážila nebo odměřila po 8 g dextrosy, 2g peptonu a 200ml destilované vody a promíchala
- pomocí mikropipety jsem do každé zkumavky aplikovala 10ml SDM (celkem bylo 25 zkumavek – od každého vybraného kmene 5 zkumavek / opakování).

Následující den jsem pomocí kličky zaočkovala zkumavky se SDM vybranými kmeny *Malassezia pachydermatis* z Petriho misek a v třepacím inkubátoru inkubovala po dobu 1 týdne při teplotě 30 °C. (viz obrázek 12).



Obrázek 12: Startovní kultura *Malassezia pachydermatis* vyrostlá ve zkumavce se Sabouroudovým dextrózovým médiem (SDM).

Před zahájením experimentu bylo dále zapotřebí připravit veškeré náčiní, které se jsem dala sterilizovat do autoklávu:

- na dvě esenciální silice jsme potřebovala celkem 250 zkumavek a 25 zkumavek na spočítání koncentrace, jelikož bylo 5 variant na jeden kmen a jednu silici, každá varianta měla 5 opakování; celkem bylo zapotřebí 25 zkumavek na jeden kmen a jednu silici v 5 koncentracích včetně kontroly tudíž na jedenu silici bylo zapotřebí 125 zkumavek
- špičky na mikropipety velikosti a 100, 200, 1000 μ l a 10 ml

- reagenční lahve se SDM – 2375 ml, jelikož do každé zkumavky jsem dávala 9,5 ml média (složení: dextróza: 95 g, peptone: 23,75 g a 2375 ml destilované vody)

Postup experimentu:

- Připravila jsem 4 koncentrace a jednu kontrolu pro esenciální silice tea tree oil i oreganum oil. Kontrola obsahovala pouze 200 µl DMSO (dimethylsulfoxid) a 47,5 ml SDM na 5 zkumavek (jeden kmen).
- Použité koncentrace esenciálních silic: 250 µl/l, 125 µl/l, 62,5 µl/l, 31, 25 µl/l, které byly použity při zjišťování vlivu esenciálních silic na množení *M. pachydermatis*; každá silice byla rozpuštěna ve 200 µl DMSO
- Koncentrace *Malassezia pachydermatis* v testovaném inokulu byla sjednocena ředěním na $2,25 - 6,06 \cdot 10^8$ na 6 buněk / ml.
- Připravené koncentrace jsem rozpipetovala: 9,5 ml do každé zkumavky dle označení silice a koncentrace a posléze se do každé zkumavky dala inokulum 0,5 ml z každého kmene.
- Nakonec jsem zkumavky dala do kultivovat do třepacího inkubátoru do teploty 30°C, aby kultury narostly a následně bylo možné zjistit rozdíl mezi kulturou s esenciální silicí a kontrolní kulturou bez přídavku silice a tzn. zda došlo nebo nedošlo k potlačení množení *Malassezia pachydermatis*. Kultivace trvala 14 dní.

Pro získání dat jsem využila spektrofotometrii na přístroji Genesys UV 10 (Thermo Scientific), kde jsem měřila absorbanci (jednotka: A), která udává kolik světla bylo pohlceno měřeným vzorkem v porovnání se slepým vzorkem (blank). Nulovou absorbanci bude mít vzorek, který nepohlíží žádné světlo, absorbance 1 vzorek, kterým prošla jedna desetina světla a při absorbanci 2 jedna setina vstupujícího světla atd.

Postup:

- Z každé zkumavky jsem dávala mikropipetou do kyvety 1 ml suspenze.
- jako blank na porovnání jsem použila tekuté médium SDM.

Vliv silic z oregana a tea tree jsem vyhodnocovala spektrofotometricky jako porovnání hodnoty absorbance v kultivačních zkumavkách se silicí a v kontrolních zkumavkách s *Malassezia pachydermatis*. Přičemž byla sledována absorbance při 550 nm. Hodnota slepého vzorku (blanku) byla 0 A.

4.1.4 Experimenty s *Pythium oligandrum*

Kmen *Pythium oligandrum* my byla poskytl společnost BIOPREPARÁTY s.r.o. (Tylišovská 1/772, 166 00, Praha 6). Poté jsem kmen přeočkovala na Petriho misky s MA2 a nechala ho 4 dny inkubovat při teplotě 25 °C. Celkem jsem realizovala tři experimenty s *Pythium oligandrum*:

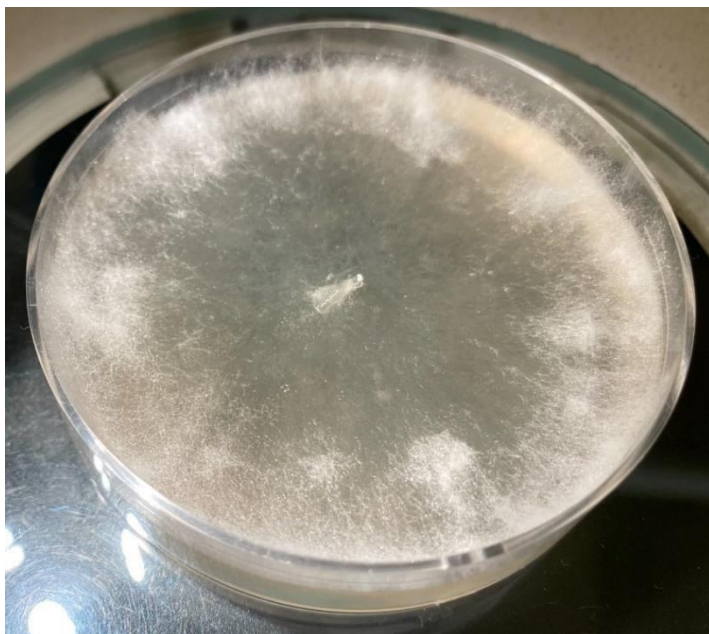
- 1) zjišťování interakce *P. oligandrum* s *M. pachydermatis* při bodovém zaočkování kvasinky

- 2) zjišťování interakce *P. oligandrum* s *M. pachydermatis* při zaočkování kvasinky formou suspenze
- 3) zjištění schopnosti *P. oligandrum* růst při teplotách 30 a 32 °C

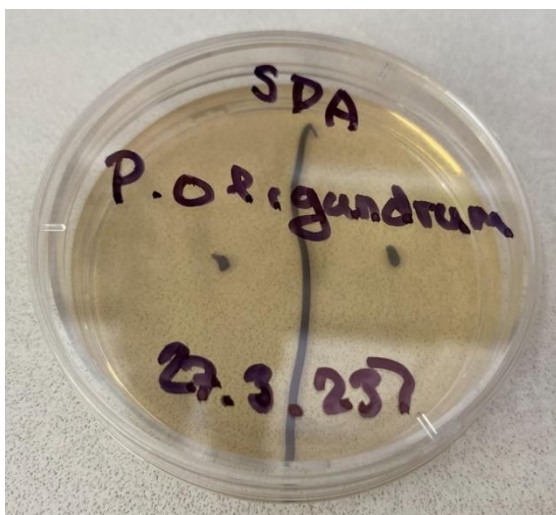
Příprava na experimenty:

Startovní kultury:

- Kmen *Pythium oligandrum* (viz obrázek 13) jsem dvou bodově přeočkovala na 6 Petriho misek průměru 60 mm se SDA a na 6 misek s ME2 (viz obrázek 14). Na každý experiment jsem použila dvě misky od obou kultivačních agarů. Misky s *P. oligandrum* jsem inkubovala při teplotě 25 °C.
- Souběžně bylo zapotřebí přeočkovat i kmeny *Malassezia pachydermatis*, využila jsme stejné kmeny jako při pokusu s esenciálními silicemi. Každý kmen jsem přeočkovala na 6 Petriho misek (průměr 60 mm) se SAD pomocí kličky, abych na každý experiment měla dvě misky se startovními kulturami. Poté jsem je dala inkubovat při teplotě 32 °C.



Obrázek 13: Kolonie *Pythium oligandrum* po 4 dnech od přeočkování na MA2 při teplotě 25°C.



Obrázek 14: Znárodnění toho, jak vypadalo dvoubodové přeočkování mykoparazitické houby *Pythium oligandrum*

Pro přípravu pokusu bylo dále zapotřebí připravit:

- Regenční lahve se SDA (26 g přípravku se 400ml destilované vody) – na přípravu 215 Petriho misek (90 mm), na dva experimenty bylo zapotřebí po 100 Petriho miskách a na třetí 15 misek. Podrobnější informace jsou napsané u každého pokusu zvlášť.
- Regenční lahve s MA2 (8 g peptonu + 8 gramů agaru se 400ml destilované vody) - na přípravu 215 Petriho misek (90 mm), na dva experimenty bylo zapotřebí po 100 Petriho miskách a na třetí 15. Podrobnější informace jsou napsané u každého pokusu zvlášť.

Připravené lahve jsem sterilizovala v autoklávu a poté nalila na Petriho misky (průměr 90 mm) a nechala agary ztuhnout do dalšího dne. Dále bylo zapotřebí vysterilizovat náčiní v autoklávu:

- skleněné zkumavky 10 kusů (od každého kmene 2 zkumavky)
- špičky na mikropipetu velikosti 10 ml

Zjišťování interakce *P. oligandrum* s *M. pachydermatis* při bodovém zaočkování kvasinky

Materiál:

- 50 Petriho misek o průměr 90 mm se SDA na jeden kmen včetně kontrol (použila jsem 5 kmenů a od každého kmene jsem dělala 5 opakování, takže na kmen bylo zapotřebí 25 misek + kontroly, též od každého kmene 5 opakování.)
- 25 Petriho misek o průměr 90 mm s MA2 na jeden kmen včetně kontrol (použila jsem 5 kmenů a od každého kmene jsem dělala 5 opakování, takže na kmen bylo zapotřebí 25 misek + kontroly, též od každého kmene 5 opakování.)

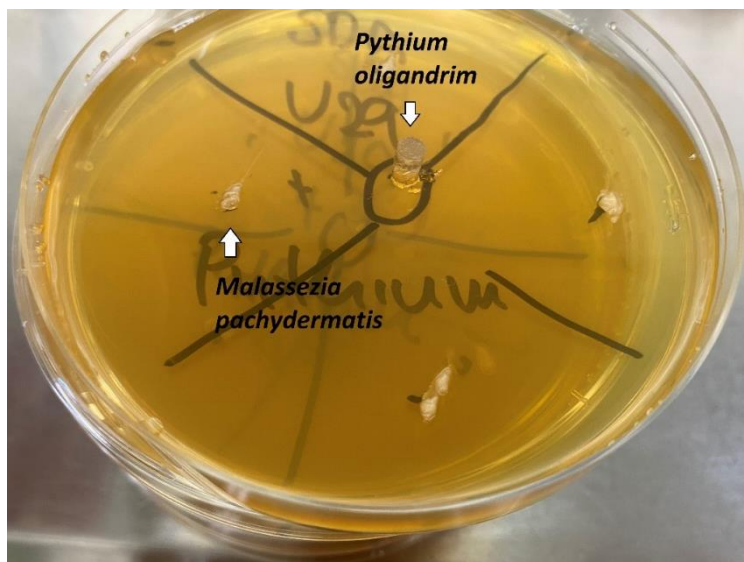
- korkovrt o vnitřním průměru cca 3 mm
- sterilní jehla
- plynový nebo lihový kahan

Postup:

Nejdříve jsem na Petriho misky s agary čtyřbodově přeočkovala kolonie kvasinek *M. pachydermatis* viz obrázek 15 a poté jsem zaočkovala jednotlivé misky vždy jedním bločkem ME2 o průměru přibližně 3 mm s kulturou *P. oligandrum* vyřízlým pomocí korkovrtu ze startovní kultury a umístila jej doprostřed misky viz obrázek 16. Po opálení korkovrtu kahanem jsem proces opakovala u dalších kmenů. Do misek s kontrolami jsem přeočkovala pouze *M. pachydermatis*. Nakonec jsem misky nechala v inkubační třepačce při teplotě 30 °C. Hodnocení probíhalo po 4 dnech a byly porovnávány Petriho misky se stejnými kmeny, na stejných i rozdílných agarech a s kontrolami.



Obrázek 15: Čtyř bodové přeočkování kvasinek *M. pachydermatis* při zjišťování interakce s *P. oligandrum*.



Obrázek 16: Umístění *P. oligandrum* při zjišťování interakce *P. oligandrum* s kvasinkami *Malassezia pachydermatis*.

Zjišťování interakce *P. oligandrum* s *M. pachydermatis* při zaočkování kvasinky formou suspenze

Materiál:

- 50 Petriho misek o průměr 90 mm se SDA na jeden kmen včetně kontrol (použila jsem 5 kmenů a od každého kmene jsem dělala 5 opakování, takže na kmen bylo zapotřebí 25 misek + kontroly, též od každého kmene 5 opakování.)
- 25 Petriho misek o průměr 90 mm s MA2 na jeden kmen včetně kontrol (použila jsem 5 kmenů a od každého kmene jsem dělala 5 opakování, takže na kmen bylo zapotřebí 25 misek + kontroly, též od každého kmene 5 opakování.)
- korkovrt o vnitřním průměru cca 3 mm
- destilovaná voda
- sterilní skleněných zkumavky 10 kusů (na každý kmen dvě zkumavky)
- plynový kahan
- klička
- mikropipety
- špičky velikost: 1 a 10 ml

Postup:

Nejdříve jsem na připravené agary pomocí korkovrtu vyřízla část *P. oligandrum* a umístila jej doprostřed misky, proces jsem po opálení trubičky opakovala u dalších kmenů. Poté jsem si připravila suspenzi:

- Použila jsem 10 zkumavek – na každý kmen 2 zkumavky
- Do zkumavek jsem mikropipetou napipetoval 5 ml destilované vody
- Kličkou jsem seškrábala všechny kolonie z jedné misky a dala je do zkumavky s destilovanou vodou
- Zkumavku jsem poté důkladně protřepala, aby se kvasinky neusazovaly u dna; následně jsem mikropipetou napipetovala 0,5 ml vzniklé suspenze po krajích misky s *P. oligandrum* a umístila do třepacího inkubátoru při teplotě 30 °C.

Suspenzi jsem ve stejném množství nalila i do misek s kontrolami, kde nebylo umístěné *P. oligandrum* a dala je též do třepacího inkubátoru při teplotě 30 °C. Výsledný efekt jsem hodnotila po 4 dnech porovnáním misek se stejnými kmeny, na stejných i rozdílných agarových mediích a s kontrolami.

Zjištění schopnosti *P. oligandrum* růst při teplotách 30 a 32 °C

Optimální teplota pro růst *P. oligandrum* se udává 25 °C: Při této teplotě, ale dochází k omezenému množení *M. pachydermatis*. Cílem experimentu bylo zjistit zda *P. oligandrum* roste i při vyšších teplotách, které jsou vhodnější pro růst kolonií *M. pachydermatis*.

Materiál:

- 15 Petriho misek o průměr 90 mm se SDA – na každou teplotní varinatu 5 misek
- 15 Petriho misek o průměr 90 mm s ME2 - na každou teplotní varinatu 5 misek
- korkovrt o vnitřním průměru 3mm
- plynový kahan

Postup:

Pomocí korkovrtu jsem vyřízla část *P. oligandrum* a umístila jej do středu misky s agary. Misky jsem si následně rozdělila na tři skupiny dle inkubačních teplot; 25, 30 a 32 °C. Po 4 dnech jsem pravítkem změřila nárůst *P. oligandrum* na všech miskách. Výsledná data jsem porovнала.

5 Výsledky

5.1 Identifikace kvasinek

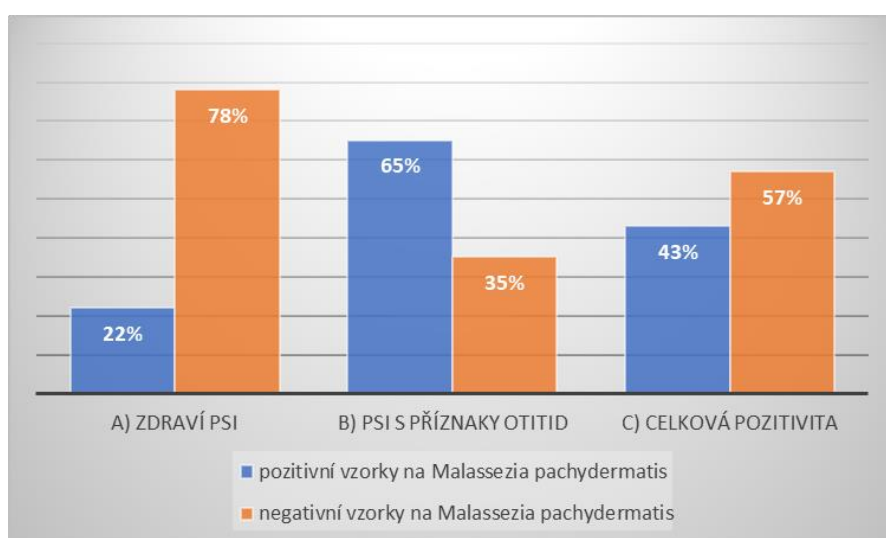
Po kultivaci a identifikaci kvasinek metodou PCR jsem z celkového počtu 35 vzorků identifikovala 15 vzorků s *M. pachydermatis* (viz tabulka 9). Rozdíl mezi kultivační detekcí a PCR identifikací byl jeden vzorek, přesněji vzorek 10 nebyl potvrzen PCR. Pro potřeby této studie jsem využila psi s příznaky otitid a zdravé psy bez příznaků viz obrázek 17. Z výsledků vyplývá, že kvasinky rodu *Malassezia* se vyskytují v mikrobiotě ucha i bez průkazu onemocnění *otitis externa* případně jiného ušního zánětu.

Z identifikovaných kmenů *Malassezia pachydermatis* jsem si vybrala rozdílné a dobře rostoucí kmeny (čísla vzorků: 15, 21, 22, 23, 29), které jsem následně využila v experimentální části práce. Jednalo se o tři kmeny od psů s otitidami (21, 22, 23) a o dva kmeny od zdravých psů bez otitid (15, 29).

Tabulka 9: Souhrn výsledků získaný po kultivační detekci a PCR identifikaci kvasinek doplněný informace, zda byla možnost setkání psů a přenesení případně stejného kmene.

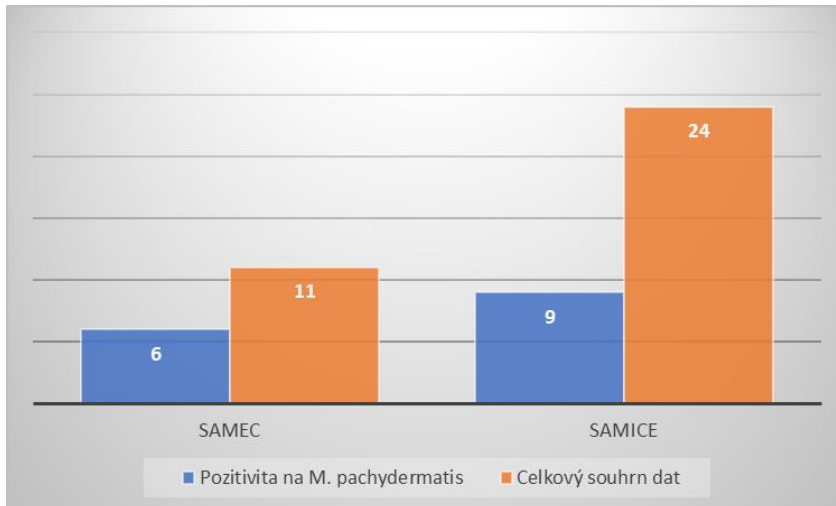
| Číslo vzorku: | Kultivační detekce | Identifikace <i>Malassezia pachydermatis</i> : | Možnost kontaktu mezi sledovanými psy |
|---------------|--------------------|--|---------------------------------------|
| 1. | Negativní | Negativní | Ne |
| 2. | Negativní | Negativní | Ne |
| 3. | Negativní | Negativní | Ne |
| 4. | Pozitivní | Pozitivní | Ne |
| 5. | Pozitivní | Pozitivní | Ne |
| 6. | Pozitivní | Pozitivní | Ne |
| 7. | Pozitivní | Pozitivní | Ne |
| 8. | Pozitivní | Pozitivní | Ne |
| 9. | Pozitivní | Pozitivní | Ne |
| 10. | Pozitivní | Negativní | Ne |
| 11. | Pozitivní | Pozitivní | Ne |
| 12. | Pozitivní | Pozitivní | Ano s 13 |
| 13. | Pozitivní | Pozitivní | Ano s 12 |
| 14. | Negativní | Negativní | Ano s 15 |
| 15. | Pozitivní | Pozitivní | Ano se 14 |
| 16. | Negativní | Negativní | Ne |
| 17. | Negativní | Negativní | Ano s 18, 19, 20, 21 |
| 18. | Negativní | Negativní | Ano se 17, 19, 20, 21 |
| 19. | Negativní | Negativní | Ano se 17, 18, 20, 21 |
| 20. | Negativní | Negativní | Ano se 17, 18, 19, 21 |
| 21. | Pozitivní | Pozitivní | Ano se 17, 18, 19, 20 |
| 22. | Pozitivní | Pozitivní | Ne |
| 23. | Pozitivní | Pozitivní | Ne |
| 24. | Pozitivní | Pozitivní | Ne |
| 25. | Negativní | Negativní | Ne |
| 26. | Negativní | Negativní | Ne |
| 27. | Negativní | Negativní | Ano s 29, 30 |

| | | | |
|-----|-----------|-----------|--------------|
| 28. | Negativní | Negativní | Ne |
| 29. | Pozitivní | Pozitivní | Ano s 27, 30 |
| 30. | Negativní | Negativní | Ano s 27, 30 |
| 31. | Negativní | Negativní | Ne |
| 32. | Negativní | Negativní | Ano s 33 |
| 33. | Negativní | Negativní | Ano s 34 |
| 34. | Negativní | Negativní | Ne |
| 35. | Negativní | Negativní | Ne |

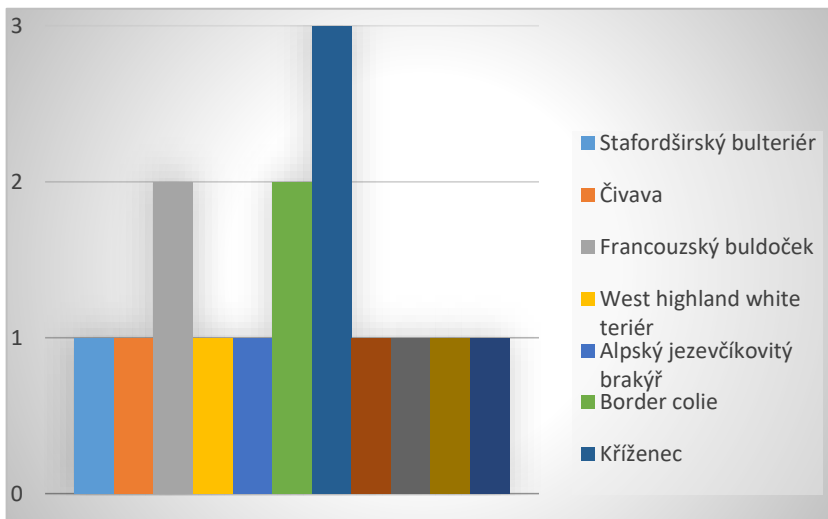


Obrázek 17: Výsledky identifikace *Malassezia pachydermatis* ve skupině vyšetřovaných psů; (A) u klinicky zdravých psů (n=18), (B) u psů klinickými příznaky otitid (n= 17) a (C) v celkovém souboru 35 psů.

Kvasinky *M. pachydermatis* jsem identifikovala u obou pohlaví. Četnější záchyt jsem ale detekovala u samců (viz obrázek 18), jelikož z celkového počtu 35 testovaných psů (11 samců a samic) bylo pozitivních 54,54 % samců a 37,5 % samic. Dále jsem zjišťovala, zda u pozitivních kmenů po identifikaci kvasinek, existuje plemenná predispozice. Z výsledku vyplývá, že v omezeném setu vzorků se *M. pachydermatis* nejčastěji vyskytla u kříženců, border colií a francouzských buldočků viz obrázek 19.



Obrázek 18: Poměr mezi pohlavími pozitivních psů na *M. pachydermatis* po PCR v porovnání s celkovým souborem testovaných psů; pozitivních samců bylo 54,54 % a samic 37,5 %.

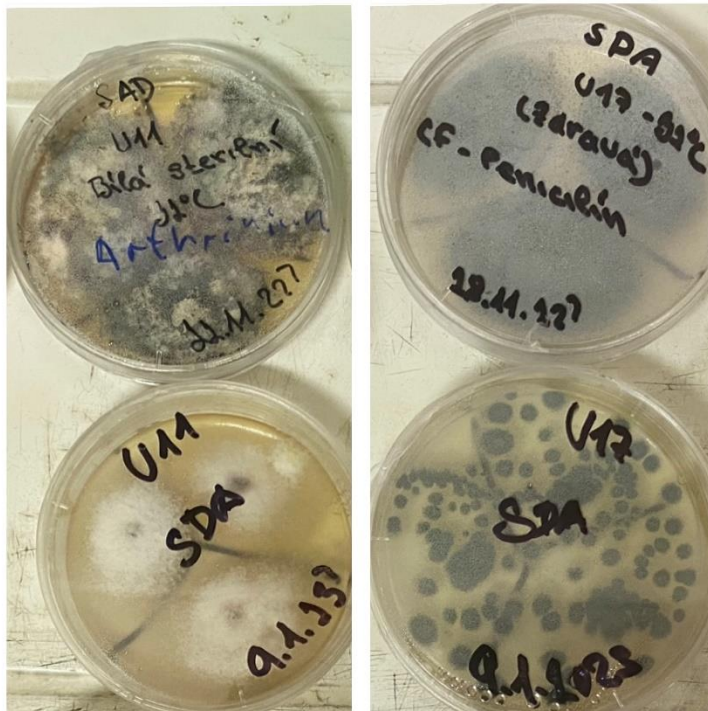


Obrázek 19: Plemena psů, u kterých byla potvrzena a identifikována *M. pachydermatis*. Svislá osa určuje počet záchytů.

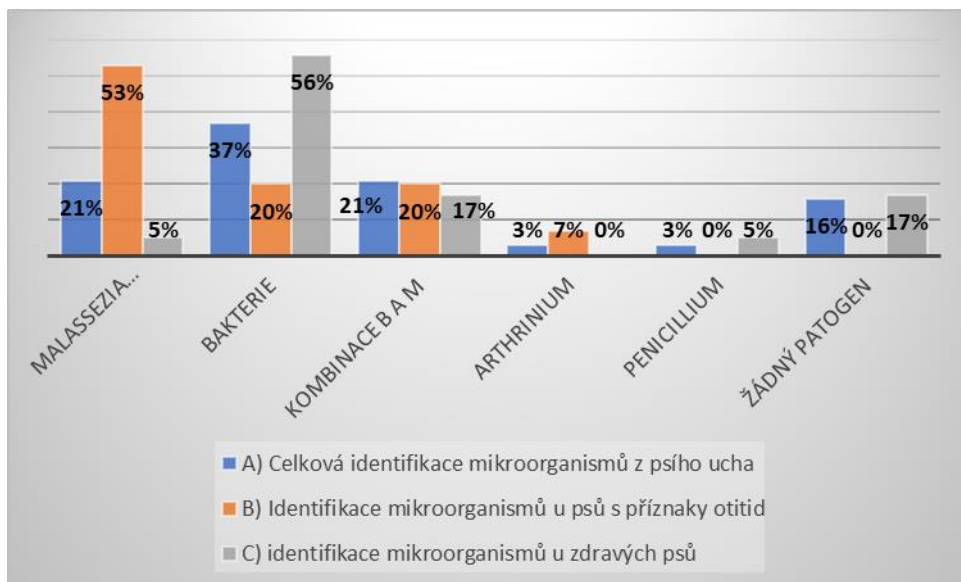
Z kvasinek způsobující otitidy u psů jsem metodou PCR identifikovala pouze kvasinky *Malassezia pachydermatis*, nebyly tedy identifikované žádné kmeny *Candida* spp..

Celkově z hub jsem, ale při kultivaci narazila pravděpodobně i na *Arthriniium* a *Penicillium*. Identifikovala jsem je pouze podle jejich charakteristického tvaru a velikosti pod mikroskopem a typickým růstem na agaru viz obrázek 20. Dále se zde vyskytovaly pouze bakterie, které byly též identifikované pouze mikroskopicky. Z důvodu zaměření diplomové práce na kvasinky jsem tyto výsledky více neidentifikovala..

Celkově byly nejhojněji zastoupené bakterie a posléze kombinace *Malassezia pachydermatis* a bakterií. Na rozdíl od výsledků psů s příznaky otitid, kde byl největší záchyt *Malassezia pachydermatis* a na druhém místě byla kombinace bakterií a kvasinek *Malassezia pachydermatis* zároveň se samotnými bakteriemi. Vše je znázorněné na obrázku 21.



Obrázek 20: Kolonie hub *Arthriniu* (nalevo) a *Penicilliu* (napravo), které byly získané kultivační detekcí a přeočkované na misky s MA2.



Obrázek 21: Výsledky identifikace mikroorganismů ve skupině vyšetřovaných psů; (A) v celkovém souboru 35 psů, (B) u psů s klinickými příznaky otitid (n=17) a (C) u klinicky zdravých psů (n=18). Zkratka: kombinace B a M = kombinace bakterií a kvasinek *Malassezia pachydermatis*. Pozn. *Arthriniu* a *Penicilliu* bylo určeno pouze mikroskopicky po kultivační detekci (nedělalo se PCR).

5.2 Zjišťování vlivu esenciálních silic na růst *Malassezia pachydermatis*

Z vyhodnocení dat spektrofotometrie jsem zjistila, že v kontrolních zkumavkách bylo naměřeno cca 1,5 A což znamená, že došlo k množení *M. pachydermatis*. Ve všech zkumavkách se silicí, kde byla naměřena hodnota nižší než 1,5 došlo k potlačení množení kvasinek *M. pachydermatis*.

Ze získaných dat (viz tabulka 10) je zřejmé, že silice z oregana potlačovala množení *M. pachydermatis* více než silice z tea tree (viz tabulka 11). Silice z oregana průměrně vykazovala nižší absorbanci (hustotu kultur kvasinek) o 0,74655 A v porovnání s kontrolními zkumavkami. U silice z oregana průměrně zaznamenala největší potlačení *M. pachydermatis* při druhé nejvyšší použité koncentraci (125 μ l / l).

Při porovnání naměřených hodnot silice z oregana a tea tree u jednotlivých kmenů jsem zjistila:

- U kmene U15 byla průměrná hodnota absorbance u silice z tea tree vždy o polovinu větší. Nejnižší průměrnou hodnotou silice z oregana byla 0,2522 A při koncentraci 125 μ l / l, při téže koncentraci byla u silice z tea tree naměřena průměrná hodnota 1,4026, což byla i nejnižší průměrná naměřená hodnota této silice u kmene U15. Nejvyšší průměrná hodnota absorbance u silice z oregana byla 0,737 A při nejvyšší použité koncentraci 250 μ l / l. U tea tree byla naopak nejvyšší průměrná hodnota 1,58 A při nejnižší použité koncentraci - 31,5 μ l (viz obrázek 22).
- U kmene U21 jsem zjistila, že při koncentraci 250 μ l / l byl pouze zanedbatelný rozdíl mezi naměřenými hodnotami u silic. Důležité je ale zmínit, že se jednalo o nejvyšší průměrnou hodnotu u silice z oregana, a naopak o nejnižší průměrnou hodnotu u silice z tea tree. Nejmenší naměřená absorbance u silice z oregana byla opět při koncentraci 125 μ l / l (0,2004 A), při této koncentraci jsem ale naopak u tea tree naměřila nejvyšší hodnoty u kmene U21 (1,345 A) (viz obrázek 23).
- U kmene U22 jsem celkově zaznamenala nejvyšší průměrné hodnoty v porovnání s ostatními kmeny. Nejvyšší průměrná hodnota absorbance byla u obou silic při nejnižší použité koncentraci 31,5 μ l / l; u silice z oregana 1,4054 A a u silice z tea tree 1,5198. Nejnižší průměrná hodnota u oregana (0,8738 A) byla opět při koncentraci 125 μ l / l a u silice z tea tree byla nejnižší průměrná hodnota 1,4038 A při koncentraci 62,5 μ l / l (viz obrázek 24).
- U kmene U 23 jsem zaznamenala úplně nejmenší průměrnou hodnotu u oregana (0,0202 A) při nejvyšší použité koncentraci 250 μ l / l, při které jsem zde zjistila i nejnižší průměrnou hodnotu absorbance silice z tea tree (1,214 A). Naopak při nejnižší použité koncentraci (31,5 μ l / l) jsem zaznamenala nejvyšší průměrné hodnoty obou silic; u silice z oregana 1,446 A a u silice z tea tree 1,6974 A (viz obrázek 25).
- U kmene U 29 jsem opět zaznamenala průměrně nejnižší hodnotu absorbance při 125 μ l / l (0,404 A), při této koncentraci jsem zároveň zjistila i nejvyšší průměrnou hodnotu u tea tree (1,3296 A), která měla průměrnou nejnižší hodnotu naměřenou opět při 250 μ l / l. Největší průměrnou hodnotu jsem u silice z oregana naměřila

0,74 A při koncentraci 31,5 µl / l. Zajímavostí je, že hodnoty tea tree byly ve všech koncentracích přibližně stejné (viz obrázek 26).

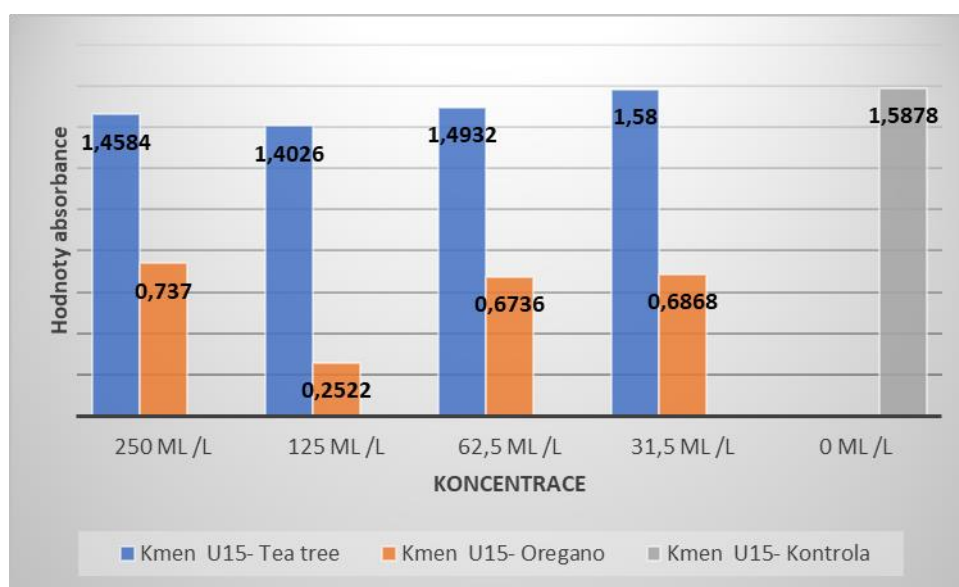
Tabulka 10: Znázornění získaných hodnot absorpance (A) koncentrací jednotlivých zkumavek v porovnání se slepým vzorkem (SDM). Od každého kmene, silice a koncentrace jsem hodnotila 5 zkumavek. Z výsledných dat jsem následně získala: průměr, maximum, minimum a směrodatnou odchylku. Dvě zkumavky v průběhu tepelné inkubace praskly z toho důvodu nebyly hodnocené.

| Kmen | Silice | Konc. | 1. | 2. | 3. | 4. | 5. | Průměr | Max. | Min. | Směrodatná odchylka |
|------|----------|-------------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|-------|-------|---------------------|
| U15 | Tea tree | 250 µl / l | 1,566 | 1,321 | 1,483 | 1,449 | 1,473 | 1,4584 | 1,566 | 1,321 | 0,0792 |
| U15 | Tea tree | 125 µl / l | 1,526 | 1,313 | 1,452 | 1,311 | 1,411 | 1,4026 | 1,526 | 1,311 | 0,082652526 |
| U15 | Tea tree | 62,5 µl / l | 1,354 | 1,481 | 1,563 | 1,528 | 1,54 | 1,4932 | 1,563 | 1,354 | 0,074563798 |
| U15 | Tea tree | 31,5 µl / l | 1,8 | 1,483 | 1,499 | 1,499 | 1,619 | 1,58 | 1,8 | 1,483 | 0,120376077 |
| U21 | Tea tree | 250 µl / l | 0,859 | 1,464 | 1,163 | 0,784 | 0,777 | 1,0094 | 1,464 | 0,777 | 0,267465587 |
| U21 | Tea tree | 125 µl / l | 1,353 | 1,466 | 1,283 | 1,278 | - | 1,345 | 1,466 | 1,278 | 0,07589137 |
| U21 | Tea tree | 62,5 µl / l | 1,501 | 1,075 | 1,461 | 0,915 | 1,093 | 1,209 | 1,501 | 0,915 | 0,230918167 |
| U21 | Tea tree | 31,5 µl / l | 1,188 | 1,48 | 1,221 | 1,315 | 1,372 | 1,3152 | 1,48 | 1,188 | 0,105298433 |
| U22 | Tea tree | 250 µl / l | 1,567 | 1,661 | 1,4 | 1,326 | 1,408 | 1,4724 | 1,661 | 1,326 | 0,12275276 |
| U22 | Tea tree | 125 µl / l | 1,484 | 1,521 | 1,382 | 1,515 | 1,385 | 1,4574 | 1,521 | 1,382 | 0,061639598 |
| U22 | Tea tree | 62,5 µl / l | 1,484 | 1,382 | 1,364 | 1,467 | 1,322 | 1,4038 | 1,484 | 1,322 | 0,061930283 |
| U22 | Tea tree | 31,5 µl / l | 1,613 | 1,514 | 1,308 | 1,623 | 1,541 | 1,5198 | 1,623 | 1,308 | 0,113735483 |
| U23 | Tea tree | 250 µl / l | 1,271 | 1,29 | 1,367 | 0,871 | 1,271 | 1,214 | 1,367 | 0,871 | 0,175118246 |
| U23 | Tea tree | 125 µl / l | 1,815 | 1,651 | 1,703 | 1,435 | 1,588 | 1,6384 | 1,815 | 1,435 | 0,126040628 |
| U23 | Tea tree | 62,5 µl / l | 1,756 | 1,714 | 1,736 | 1,853 | 1,458 | 1,7034 | 1,853 | 1,458 | 0,131562305 |
| U23 | Tea tree | 31,5 µl / l | 1,766 | 1,709 | 1,658 | 1,651 | 1,703 | 1,6974 | 1,766 | 1,651 | 0,041417871 |
| U29 | Tea tree | 250 µl / l | 1,103 | 1,428 | 1,103 | 1,156 | 1,15 | 1,188 | 1,428 | 1,103 | 0,122080301 |
| U29 | Tea tree | 125 µl / l | 1,43 | 1,187 | 1,331 | 1,354 | 1,346 | 1,3296 | 1,43 | 1,187 | 0,079096397 |
| U29 | Tea tree | 62,5 µl / l | 1,074 | 1,412 | 1,341 | 1,347 | 1,312 | 1,2972 | 1,412 | 1,074 | 0,116288263 |
| U29 | Tea tree | 31,5 µl / l | 1,31 | 1,289 | 1,292 | 1,204 | 1,324 | 1,2838 | 1,324 | 1,204 | 0,041868365 |
| U15 | Oregano | 250 µl / l | 0,93 | 1,298 | 0,097 | 0,059 | 1,301 | 0,737 | 1,301 | 0,059 | 0,554860343 |
| U15 | Oregano | 125 µl / l | 0,332 | 0,184 | 0,298 | 0,229 | 0,218 | 0,2522 | 0,332 | 0,184 | 0,054451446 |
| U15 | Oregano | 62,5 µl / l | 0,698 | 0,825 | 0,716 | 0,423 | 0,706 | 0,6736 | 0,825 | 0,423 | 0,133540406 |
| U15 | Oregano | 31,5 µl / l | 0,718 | 1,063 | 0,338 | 0,96 | 0,355 | 0,6868 | 1,063 | 0,338 | 0,299630039 |
| U21 | Oregano | 250 µl / l | 0,97 | 0,982 | 0,811 | 0,902 | 1,102 | 0,9534 | 1,102 | 0,811 | 0,096015832 |
| U21 | Oregano | 125 µl / l | 0,143 | 0,261 | 0,248 | 0,168 | 0,182 | 0,2004 | 0,261 | 0,143 | 0,046089478 |
| U21 | Oregano | 62,5 µl / l | 0,485 | 0,431 | 0,471 | 0,46 | 0,498 | 0,469 | 0,498 | 0,431 | 0,022917242 |
| U21 | Oregano | 31,5 µl / l | 0,89 | 1,103 | 0,93 | 0,56 | 0,925 | 0,8816 | 1,103 | 0,56 | 0,177054342 |
| U22 | Oregano | 250 µl / l | 0,867 | 1,328 | 0,855 | 1,19 | 0,89 | 1,026 | 1,328 | 0,855 | 0,195508568 |
| U22 | Oregano | 125 µl / l | 0,757 | 0,746 | 0,919 | 0,89 | 1,057 | 0,8738 | 1,057 | 0,746 | 0,114754346 |
| U22 | Oregano | 62,5 µl / l | 1,016 | 1,14 | 0,713 | 0,77 | 0,84 | 0,8958 | 1,14 | 0,713 | 0,159019999 |
| U22 | Oregano | 31,5 µl / l | 1,567 | 1,247 | 1,663 | 0,921 | 1,629 | 1,4054 | 1,663 | 0,921 | 0,283620592 |
| U23 | Oregano | 250 µl / l | 0,216 | 0,049 | 0,079 | 0,05 | 0,057 | 0,0902 | 0,216 | 0,049 | 0,06382288 |
| U23 | Oregano | 125 µl / l | 0,269 | 0,883 | 0,769 | 0,745 | 0,739 | 0,681 | 0,883 | 0,269 | 0,212486235 |
| U23 | Oregano | 62,5 µl / l | 0,868 | 0,658 | 0,949 | 0,987 | 0,87 | 0,8664 | 0,987 | 0,658 | 0,11385359 |
| U23 | Oregano | 31,5 µl / l | 1,239 | 1,619 | 1,434 | 1,306 | 1,632 | 1,446 | 1,632 | 1,239 | 0,159447797 |
| U29 | Oregano | 250 µl / l | 0,555 | 0,577 | 0,461 | 0,51 | 0,122 | 0,445 | 0,577 | 0,122 | 0,1663334 |
| U29 | Oregano | 125 µl / l | 0,63 | 0,073 | 0,55 | 0,363 | - | 0,404 | 0,63 | 0,073 | 0,214262689 |

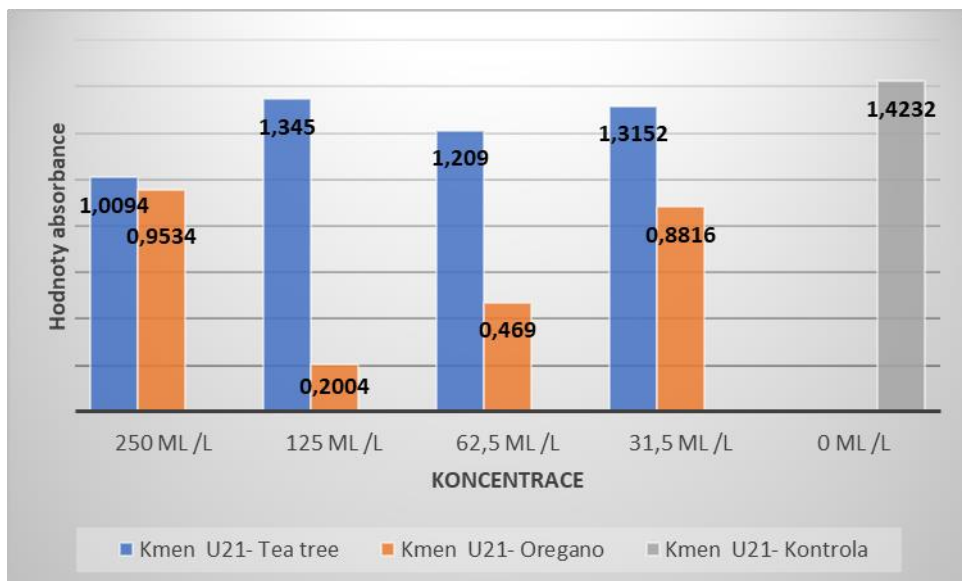
| | | | | | | | | | | | |
|-----|----------|------------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|-------|-------|-------------|
| U29 | Oregano | 62,5 µl /l | 0,667 | 0,678 | 0,351 | 0,408 | 0,457 | 0,5122 | 0,678 | 0,351 | 0,135161237 |
| U29 | Oregano | 31,5 µl /l | 0,711 | 0,554 | 0,616 | 1,009 | 0,81 | 0,74 | 1,009 | 0,554 | 0,160046243 |
| U15 | Kontrola | 0 | 1,551 | 1,723 | 1,708 | 1,434 | 1,523 | 1,5878 | 1,723 | 1,434 | 0,111296721 |
| U21 | Kontrola | 0 | 1,621 | 1,536 | 0,884 | 1,501 | 1,574 | 1,4232 | 1,621 | 0,884 | 0,272535796 |
| U22 | Kontrola | 0 | 1,533 | 1,441 | 1,402 | 1,5 | 1,512 | 1,4776 | 1,533 | 1,402 | 0,048598765 |
| U23 | Kontrola | 0 | 1,803 | 1,711 | 1,703 | 1,617 | 1,629 | 1,6926 | 1,803 | 1,617 | 0,06692563 |
| U29 | Kontrola | 0 | 1,393 | 1,371 | 1,19 | 1,394 | 1,346 | 1,3388 | 1,394 | 1,19 | 0,076439257 |

Tabulka 11: Porovnání 5 izolovaných kmenů *M. pachydermatis* (U) a silic s kontrolami. Vliv potlačení množení *Malassezia pachydermatis* je znázorněn jako rozdíl hodnot absorbance silicí s danou koncentrací a kontrolou. Čím vyšší je rozdíl tím došlo k většímu potlačení množení.

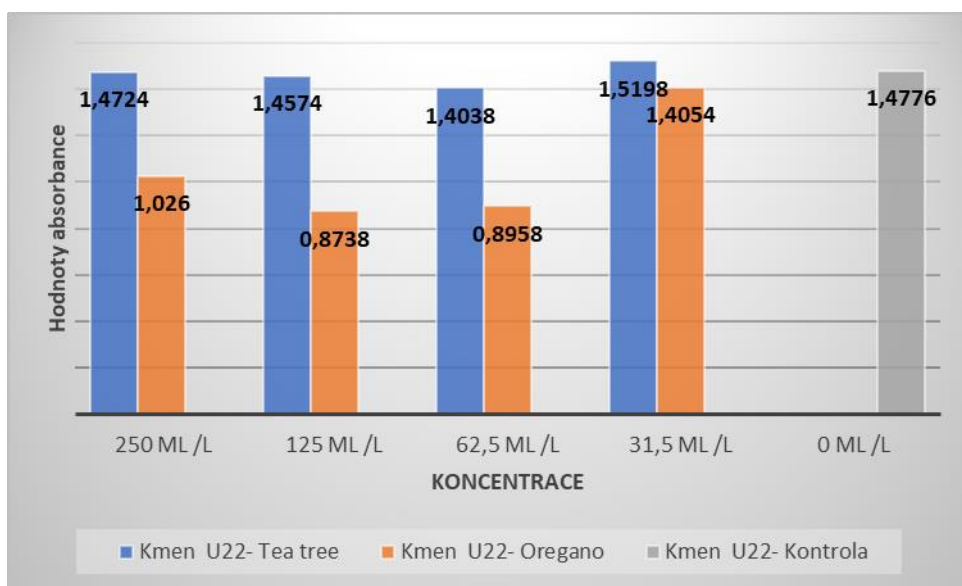
| | U15 | U21 | U22 | U23 | U29 |
|---|---------|----------|----------|-----------|---------|
| Tea tree silice s koncentrací 250 µl /l - kontrola | -0,1294 | -0,4138 | -0,00520 | -0,1728 | 0,3586 |
| Tea tree silice s koncentrací 125 µl /l - kontrola | -0,1852 | -0,07819 | -0,02020 | -0,4786 | -0,1508 |
| Tea tree silice s koncentrací 62,5 µl /l - kontrola | -0,0946 | -0,2142 | -0,07380 | -0,0542 | -0,0092 |
| Tea tree silice s koncentrací 31,5 µl /l - kontrola | -0,0078 | -0,108 | 0,0422 | 0,0107999 | -0,0416 |
| Silice z oregana s koncentrací 250 µl /l - kontrola | -0,7754 | -0,528 | -0,4252 | -1,6428 | -0,8516 |
| Silice z oregana s koncentrací 125 µl /l - kontrola | -1,2602 | -1,281 | -0,5774 | -1,052 | -0,8926 |
| Silice z oregana s koncentrací 62,5 µl /l - kontrola | -0,8388 | -1,0124 | -0,5554 | -0,8666 | -0,7844 |
| Silice z oregana s koncentrací 31,5 µl /l - kontrola | -0,8256 | -0,5998 | -0,0457 | -0,287 | -0,5566 |



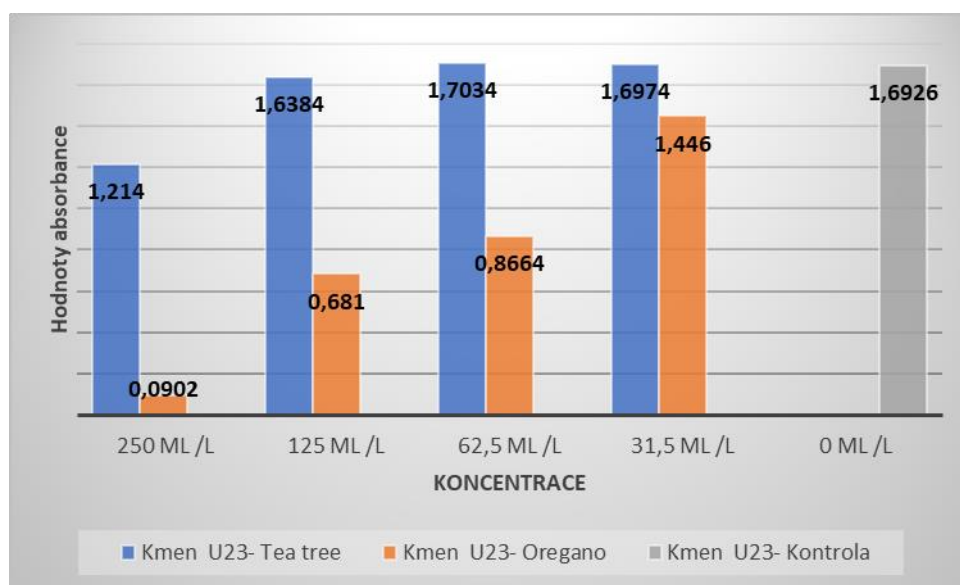
Obrázek 22: Porovnání vlivu esenciálních silic z oregana a tea tree u kmene U15. Vodorovná osa znázorňuje použité koncentrace



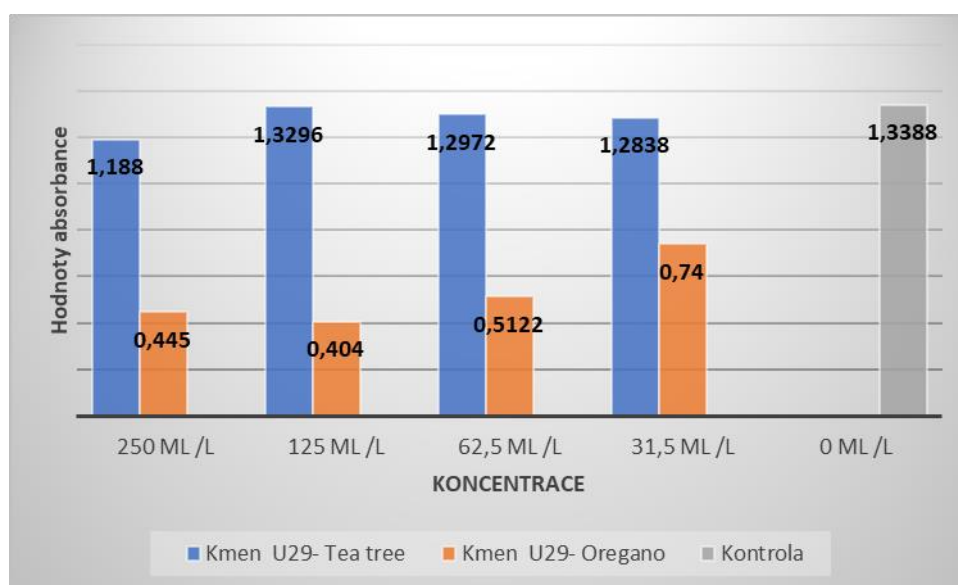
Obrázek 23: Porovnání vlivu esenciálních silic z oregana a tea tree u kmene U21. Vodorovná osa znázorňuje použité koncentrace



Obrázek 24: Porovnání vlivu esenciálních silic z oregana a tea tree u kmene U22. Vodorovná osa znázorňuje použité koncentrace



Obrázek 25: Porovnání vlivu esenciálních silic z oregana a tea tree u kmene U23. Vodorovná osa znázorňuje použité koncentrace.



Obrázek 26: Porovnání vlivu esenciálních silic z oregana a tea tree u kmene U29. Vodorovná osa znázorňuje použité koncentrace.

5.3 Zjištění schopnosti *P. oligandrum* růst při teplotách 30 a 32 °C

Zjistila jsem, že obecně *Pythium oligandrum* roste lépe a rychleji na MA2. kolonie dosahovala k okraji Petriho misek a bylo zde viditelné typické bílé mycelium. Naopak na SDA byl kolonie buď malá s tím, že kolonie byly méně zřetelné a bez viditelného bílé mycelia, nebo jsem nezaznamenala žádnou kolonii.

Výsledky růstových experimentů při rozdílných teplotách ukazují, že *P. oligandrum* roste stejně rychle při teplotě 30°C a 32 °C, pakliže je umístěné na MA2 (viz tabulka 12) jako, na kontrolních miskách s MA2 při 25 °C. V případě SDA byl nárůst nižší a celkově bylo *P. oligandrum* více splhlé a ve 12 z 15 případů (vč. kontrol) jsem nezaznamenala typické bílé mycelium. V některých případech byly kolonie i špatně měřitelné.

Tabulka 12: Nárůst *Pythium oligandrum* na Malt extract agaru (MA2) a Sabouroud dextrosa agaru (SDA) při teplotě 30 a 32 °C v porovnání s kontrolami, které byly inkubované při 25 °C; velikost kolonie 83 mm značí, že kolonie pokryla celé dno Petriho misky.

| Typ půdy | replikace č.: | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|----------|---------------------------------|----|----|----|----|----|
| MA2 | Velikost kolonie (mm) při 30°C | 83 | 83 | 83 | 83 | 83 |
| | Velikost kolonie (mm) při 32°C | 83 | 83 | 83 | 83 | 83 |
| | Velikost kolonie (mm) při 25 °C | 83 | 83 | 83 | 83 | 83 |
| SDA | Velikost kolonie (mm) při 30°C | 82 | 8 | 67 | 56 | 46 |
| | Velikost kolonie (mm) při 32°C | 70 | 34 | 77 | 83 | 37 |
| | Velikost kolonie (mm) při 25°C | 63 | 68 | 32 | 81 | 59 |

5.4 Interakce *Pythium oligandrum* a *Malassezia pachydermatis*

Z výsledků pokusů zjišťování vlivu *P. oligandrum* na kvasinky *Malassezia pachydermatis* sem zjistila, že v případě SDA docházelo nejčastěji k situaci, kdy kolonie kvasinek *M. pachydermatis* přerostly *P. oligandrum*, které téměř nebo vůbec nenarostlo na rozdíl od MA2 (viz obrázek 27).



Obrázek 27: Porovnání vlivu *P. oligandrum* proti stejnému kmeni (U29) *M. pachydermatis* na různých půdách; nalevo malt extract agaru je viditelný nárůst *P. oligandrum* a napravo sabouroud dextrosovém agaru nedošlo skoro k žádnému nárůst.

V experimentech na MA2 *P. oligandrum* přerostlo *M. pachydermatis* (viz obrázek 28). K těmto situacím docházelo jak při testech, kdy byla kolonie kvasinek *M. pachydermatis* umístěna 4 bodově na Petriho misku tak při použití suspenze z kvasinek (viz tabulky 13 a 14).

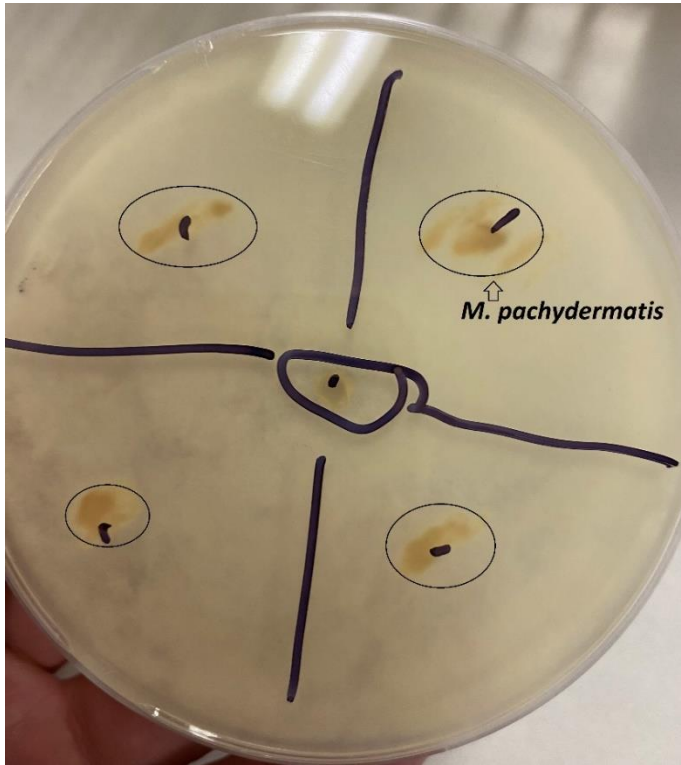
V porovnání s kontrolami se samotnými *M. pachydermatis* docházelo na SDA nejčastěji k přibližně stejnému množství kolonií jako na SDA s *P. oligandrum*. Na rozdíl od MA2, kde u kontrol docházelo k průměrnému množení *M. pachydermatis* o 10 mm a u misek s *P. oligandrum* maximálně o 2 mm anebo k žádnému.

Tabulka 13: Reakce *Pythium oligandrum* v případě 4 bodového očkování kvasinek s *pythiem* uprostřed. Od každého kmene s agarem bylo hodnoceno 5 misek.

| Kmen | Agar | Popis misek |
|------|---|---|
| U15 | SDA | - 4x kvasinka <i>Malassezia pachydermatis</i> přerostla <i>Pythium oligandrum</i> , které téměř nenarostlo - 1x žádná viditelná kolonie rustu <i>P. oligandrum</i> + kolonie bakterií + kolonie kvasinek |
| U21 | | - 1x <i>Pythium</i> přerostlo <i>M. pachydermatis</i> - 4x žádná viditelná kolonie <i>P. oligandrum</i> , kolonie kvasinek narostly + výskyt bakterií |
| U22 | | - 2x <i>Pythium</i> přerostlo <i>M. pachydermatis</i> - 3x výskyt bakterií, <i>Pythium</i> vůbec vytvořilo žádnou viditelnou kolonii, kolonie <i>Malassezia pachydermatis</i> narostly lehce |
| U23 | | - 3x kvasinka <i>Malassezia pachydermatis</i> přerostla <i>Pythium oligandrum</i> , které téměř nenarostlo - 2x nenarostlo <i>Pythium</i> ani <i>Malassezia pachydermatis</i> |
| U29 | | - 5x <i>M. pachydermatis</i> velký nárůst, ale nedošlo překrytí <i>Pythia</i> - souběžné |
| U15 | | MA2 |
| U21 | - 5x <i>Pythium</i> přerostlo <i>M. pachydermatis</i> | |
| U22 | - 5x <i>Pythium</i> přerostlo <i>M. pachydermatis</i> | |
| U23 | - 5x <i>Pythium</i> přerostlo <i>M. pachydermatis</i> | |
| U29 | - 5x <i>Pythium</i> přerostlo <i>M. pachydermatis</i> | |

Tabulka 14: Reakce *Pythium oligandrum* v případě použití suspenze kvasinek *Malassezia pachydermatis* s *Pythiem* uprostřed. Od každého kmene s agarem bylo hodnoceno 5 misek

| Kmen | Agar | Popis misek |
|------|---|---|
| U15 | SDA | - 4x kvasinka <i>Malassezia pachydermatis</i> přerostla <i>Pythium oligandrum</i> , které téměř nenarostlo - 1x vzájemné přerůstání <i>Pythia</i> s <i>M. pachydermatis</i> bez typického bílého mycelia |
| U21 | | - 4x <i>Malassezia pachydermatis</i> přerostla <i>Pythium oligandrum</i> , které téměř nenarostlo - 1x <i>Pythium oligandrum</i> přerostlo <i>Malassezia pachydermatis</i> |
| U22 | | - 5x <i>Malassezia pachydermatis</i> přerostla <i>Pythium oligandrum</i> , které téměř nenarostlo |
| U23 | | - 3x nárůst <i>Pythium</i> i <i>M. pachydermatis</i> (více <i>M. pachydermatis</i>) - 2x kvasinka <i>Malassezia pachydermatis</i> přerostla <i>Pythium oligandrum</i> , které téměř nenarostlo |
| U29 | | - 5x kvasinka <i>Malassezia pachydermatis</i> přerostla <i>Pythium oligandrum</i> , které téměř nenarostlo |
| U15 | | MA2 |
| U21 | - 2x <i>Pythium</i> přerostlo <i>M. pachydermatis</i> - 3x vzájemné přerůstání <i>Pythium oligandrum</i> s <i>M. pachydermatis</i> | |
| U22 | - 5x <i>Pythium</i> přerostlo <i>M. pachydermatis</i> | |
| U23 | - 5x <i>Pythium</i> přerostlo <i>M. pachydermatis</i> | |
| U29 | - 5x vzájemné přerůstání <i>Pythium oligandrum</i> s <i>Malassezia pachydermatis</i> | |



Obrázek 28: Znázornění případů, kde *P. oligandrum* překrylo *M. pachydermatis*. V kruzích jsou znázorněné kvasinky *M. pachydermatis* a po celém obvodu misky i přes samotné kvasinky je narostlé *P. oligandrum*.

6 Diskuze

Ve své diplomové práci se zabývám kvasinkami způsobující otitidy u psů a možnostmi její terapie pomocí esenciálních silic a mykoparazitické houby *Pythium oligandrum*. Cílem práce byla izolace původců z klinických případů otitid psů, kultivace a identifikace ve spolupráci s laboratoří VURV, růstové experimenty s *Pythium oligandrum in vitro* a růstové experimenty cílené na posouzení případného inhibičního efektu vybraných esenciálních silic (oregano, tea tree).

Přítomnost kvasinek na povrchu kůže nebo ve zvukovodu lze hodnotit řadou metod, například mikroskopickým vyšetřením, otoskopii, cytologickým vyšetřením sekretu nebo mikrobiologickou kultivací (Neves et al. 2018). V případě, že je potřeba kvasinky identifikovat je zapotřebí využít mikrobiologickou kultivaci (Bismarck et al. 2020). S ohledem na to, že jsem cílila primárně na PCR identifikaci kvasinek a přípravu izolátů/kultur pro další využití, tak jsem tuto metodu též zvolila a odebrané vzorky rozetřela na Sabouraudův dextrsový agar (SDA), stejně jako ve studii Bismarck et al. 2020. Z celkem 35 odebraných vzorků se mi podařilo kvasinky kultivovat v 16 případech, a to ze 4 klinicky zdravých psů a z 12 psů s příznaky ušního zánětu. Negativní kultivační výsledek u 5 psů pozitivních cytologicky si vysvětluji tím, že byla nejdříve provedena cytologie a až posléze byl proveden výtěr pro tuto studii. Ušní zánět tedy mohl být pouze v počátku a kvasinky nemusely být na výtěrový tampón zachyceny. Dalším důvodem může být to, že v některých případech probíhala bakteriální i kvasinková infekce zároveň a na výtěrový tampón se tak mohly zachytit pouze bakterie.

Během své práce se mi podařilo identifikovat pomocí metody PCR 15 kmenů *Malassezia pachydermatis* z celkem 16 izolátů, které pocházely ze 4 klinicky zdravých a 11 psů s příznaky ušního zánětu. Jeden izolát se nepovedlo identifikovat, což si vysvětluji tím, že metody kultivace a PCR jsou založeny na odlišných principech a mají různé citlivosti a specificity. Kultivační metoda může být méně citlivá a specifická než PCR (Puig et al. 2019).

Přítomnost kvasinek a její podstata je diskutována snad v každém literárním zdroji zabývajícím se etiologií otitid u psů. Výsledky první části potvrdily, že kvasinky *Malassezia pachydermatis* se v mikrobiotě ucha vyskytují i u zvířat bez klinických příznaků ušních infekcí, neboť jsem kvasinky potvrdila kultivačně a pomocí PCR ve 4 z 18 testovaných klinicky zdravých psů. Přítomností kvasinek jako součásti mikrobioty zevního zvukovodu se zabývala řada autorů a moje výsledky, ačkoli na malém souboru psů, s nimi korespondují. Sihelská et al. (2017) se zabývala celkovou mikrobiotou kůže i mikrobiotou ucha u zdravých psů a identifikovala celkem 84 izolátů *Malassezia pachydermatis* z čehož 36 izolátů bylo odebráno z vnějšího zvukovodu, 20 izolátů z meziprstí, 20 z podpažní jamky a 8 z krku. Analogicky i dřívější studie Brito et al. (2009) identifikovala druhy kvasinek přítomné na různých anatomických místech včetně uší u zdravých psů. Ve mé práci se mi nepodařilo nalézt žádné kvasinky rodu *Candida*. Data o jejich přítomnosti či nepřítomnosti se mezi publikovanými studii liší. Výše zmíněná studie Brito et al. (2009) potvrzuje i výskyt *Candida albicans* v normální mikrobiotě ucha. Důvodem samozřejmě může být mimo jiné i rozdílný počet odebraných vzorků, Brito et al. (2009) analyzovali 529 vzorků, zatímco v mojí studii bylo analyzováno pouze 35 vzorků. Sporadický výskyt potvrzuje i studie Paterson

(2020), která popisuje princip cytologického vyšetření a mimo jiné i kvasinky, které lze v psích uších identifikovat, ale neuvádí přesná data.

Výskyt kvasinek *Candida albicans* v uších vylučuje i studie Sihelská et al. (2017), která ze 70 odebraných vzorků identifikovala pouze jeden izolát *Candida albicans*, a to z rektální sliznice a usuzuje tedy, že kvasinky r. *Candida* kolonizují převážně sliznici GIT a jejich výskyt na kůži může být pouze ojedinělý, kontaminativní nebo spojený s chorobným stavem kůže. Na skutečné posouzení toho, zda se kvasinky *Candida albicans* vyskytují v normální mikrobiotě kůže, resp. zevního zvukovodu zdravých psů, by bylo zapotřebí další studie s větším počtem vzorků a s několika opakováními, aby bylo možné potvrdit, že se tato kvasinka objevuje pouze ojediněle nebo je spojena pouze s otitidami. Otázkou je i možný selektivní vliv následné kultivace. V mé studii jsme provedli prvotní pomožení vzorků na Sabouraudém dextrsovému agaru (SDA). Podle literatury jde o univerzální médium vhodné pro kultivaci kvasinek, které zároveň zabraňuje růstu rychlejších bakterií (Bismarck et al. 2020), ale možný selektivní efekt a případné vymizení *Candida albicans* v kompetici s *Malassezia pachydermatis* nelze vyloučit. Tomu by se dalo do budoucna předejít PCR diagnostikou přímo v materiálu odebraném z uší, tak jak prováděli např. Puig et al. (2019), detekující kvasinky pouze na základě otoskopického vyšetření a zvýšeného počtu kvasinek přímým mikroskopickým pozorováním. Sterilním tamponem odebírali vzorky a po extrakci uchovávali DNA při -20 °C, dokud nebyla použita jako templát v qPCR.

Na výskyt *Malassezia pachydermatis* má velký vliv plemenná predispozice. Ta souvisí mj. s fyzickými vlastnostmi kůže, jako je přítomnost kožních záhybů u basetů nebo převislých uší u amerických kokršpanělů. Predispozici ke zvýšenému riziku přemnožení malassezií mají plemena jako west highland white teriér, baset, americký kokršpaněl, shih-tzu, pudl, boxer, kavalír King Charles španěl, německý ovčák, francouzský buldoček a jezevčík (Peano et al. 2020). Výsledky mé práce navenek nekorespondují s výše uvedeným faktem, neboť nejvyšší počet kultivačně pozitivních vzorků jsme získala z kříženců, dále pak omezeného počtu border colíí a francouzských buldočků (viz obrázek 19). Nízký počet vyšetřených psů s dominancí kříženců v mém souboru neumožňuje plemennou dispozici hodnotit. Výskyt u dvou jedinců plemene francouzský buldoček, ale s literárními daty dobře koresponduje.

Z důvodu zaměření mé práce na kvasinky jsem metodu PCR identifikovala pouze kvasinky, ostatní mikroorganismy byly po kultivaci identifikované pouze mikroskopicky a posléze jsem více nspecifikovala. Celkem jsem tedy PCR metodou identifikovala 15 kmenů kvasinek *Malassezia pachydermatis* a mikroskopicky za pomoci školitele jsem identifikovala bakterie a dva izoláty hub rodu *Arthrimum* (Apiosporaceae) a *Penicillium* (Trichocomaceae), identifikované dle jejich charakteristického tvaru, velikosti a růstu na agaru (viz obrázek 20). Důvodem nálezu těchto hub bude pravděpodobně kontaminace vzorků při odběru nebo při manipulaci se vzorkem, jelikož se tyto houby dle studie Cabañes et al. (1996) v psí srsti vyskytují, ale nevyskytují se vyloženě v uších. Výskyt *Arthrimum* v psí srsti potvrzuje i studie ZhiYuan et al. (2017), která se zabývala rozmanitostí hub degradujících keratin z povrchu těla různých psů v zájmovém chovu.

Z výsledků kultivace a identifikace mikroorganismů od všech 35 psů jsme zjistila, že nejhojněji jsou v uších psů zastoupené bakterie a posléze kombinace bakterií a kvasinek *Malassezia pachydermatis*, což koreluje s výsledky studie Ngo et al. (2018), která uvádí, že v ušní mikrobiotě psů se nachází 22 kmenů bakterií, a pouze 2 kmeny kvasinek z čehož jedny

jsou *Candida* spp., které se v uchu vyskytují pravděpodobně pouze příležitostně nebo s rozvíjejícím onemocněním (Sihelská et al. 2017). Při vyhodnocení výsledků pouze od psů s klinickými příznaky otitid, jsem došla k závěru, že byl zánět nejčastěji způsoben kvasinkami *Malassezia pachydermatis* (53 %) a na druhém místě byla kombinace bakterií a kvasinek *Malassezia pachydermatis* (20%) zároveň se samotnými bakteriemi (20%) viz obrázek 21, což ve své studii potvrzuje i Pereira a Clemente (2021), kteří též uvádí, že nejčastějším patogenem způsobující *otitis externa* jsou kvasinky *Malassezia pachydermatis* a až posléze jsou uvedené bakterie (*S. pseudintermedius* a *Pseudomonas aeruginosa*). Toto tvrzení, ale nepotvrzují autoři studie Neves et al. (2018), kteří došli k závěru, že celkového počtu 56 vzorků od psů s *otitis externa* byly způsobené v 62,5 % kombinací bakterií a kvasinek, ve 33,9 % bakteriemi a v 3,6 % kvasinkami. Důvodem rozdílných může být geografické umístění, jelikož vzorky odebírané pro studii Neves et al. (2018) byly odebírané v Brazílii a vzorky pro tuto studii v České republice. Důvodem samozřejmě může být mimo jiné i rozdílný počet odebraných vzorků. Ušní zánět může být dále způsoben parazity, přesněji strupovkou ušní (*Otodectes cynotis*) nebo cizím předmětem (Kasai et al. 2021). Z důvodu zaměření na kvasinky nebyly takové psi zařazeni do odběru vzorků na veterinárních klinikách.

Využití esenciálních silic může být vhodnou alternativní, resp. doplňkovou terapií ušních zánětů způsobených kvasinkami, a to hned z několika důvodů. řada silic má širokou škálu antifungálních vlastností, jsou šetrné k životnímu prostředí (Bohmova et al. 2019), mají též významné antiseptické, antioxidační, antiparazitární a insekticidní účinky (Chouhan et al. 2017) a u atopických zvířat mohou zlepšit stav zevního zvukovodu (Di Cerbo et al. 2016). Hlavním důvodem pro jejich širší využití je ale stoupající antimykotická rezistence kvasinek na běžně používaná antimykotika (Ebani et al. 2023). Z těchto důvodů jsem se rozhodla esenciální silice zařadit do této studie a *in vitro* ověřit jejich inhibiční efekt na kmeny kvasinek *Malassezia pachydermatis* izolované ze psů v ČR.

Mezi nejčastěji zkoumané esenciální silice patří především silice z kajeputu střídavolistého (tea tree, *Melaleuca alternifolia*) (Neves et al. 2018), dále pak silice z citronové trávy (*Cymbopogon citratus*), silice z pelargónie vonné (*Pelargonium odorata*), saturejky zimní (*Satureja hortensis*), oregana (*Origanum vulgare*), palmarosy (*Cymbopogon martinii*), meduňky lékařské (*Melissa officinalis*), tymiánu (*Thymus vulgaris*), listu skořice (*Cinnamomum zeylanicum*), hřebíčku (*Caryophyllus aromaticus*) a koriandrových semínek (*Coriandrum sativum*) (Bismarck et al. 2020). S ohledem na omezené časové a experimentální možnosti jsem experimentů zařadila esenciální silici z oregana a z tea tree, mj. také pro jejich dostupnost na trhu a cenovou přijatelnost.

Mezi nejčastější metody využívané při testování inhibičního efektu esenciálních silic se řadí difúze na agarovém disku, mikroředění (Bismarck et al. 2020) a metoda zkumavkové difúze (Bozin et al. 2006). Pro tuto studii jsem zvolila metodu zkumavkové difúze stejně jako ve studii Bozin et al. (2006), je to rychlá jednoduchá metoda, která poskytuje spolehlivé výsledky a zároveň umožňuje srovnání s jinými silicemi (Chouhan et al. 2017).

Koncentrace esenciálních silic, které jsou používány při inhibičním efektu esenciálních silic pro *Malassezia pachydermatis* se mezi různými autory liší, mimo jiné i v závislosti na tom, o jaké esenciální silice jde. Obecně se nejčastěji ve studiích používala koncentrace 250 μ l / l. Tuto koncentraci použila například i studie Schlemmer et al. (2019), která studovala *in*

vitro aktivitu karvakrolu, cinnamaldehydu a thymolu v kombinaci s antimykotiky proti *Malassezia pachydermatis*. Z důvodu, že se tato koncentrace v literatuře objevovala nejčastěji, rozhodla jsem se ji použít jako koncentraci nejvyšší. Od této koncentrace jsem odvodila i další tři použité koncentrace v této studii, tím, že jsem je vždy snažila o polovinu, aby mezi nimi byl dostatečný rozdíl a bylo možné vyhodnotit vliv ředění.

Pro vyhodnocení dat jsem využila spektrofotometrii, přesněji přístroj Genesys UV- 10, který vyhodnocuje absorbanci daného roztoku. Absorbance udává, kolik světla bylo pohlceno měřeným vzorkem v porovnání se slepým vzorkem (blank). Jelikož testované zkumavky s *Malassezia pachydermatis* a silicí s danou koncentrací byly inkubované v tekutém sabouroud dextrosove médiu (SDM) využila jsem jako blank též SDM. Stejným postupem testovali *in vitro* antimykotickou citlivost kmenů *Malassezia pachydermatis* izolovaných od psů s chronickým a akutním ušním zánětem autoři studie Chiavassa et al. (2014).

Z výsledků spektrofotometrie vyplývá, že obě testované silice alespoň v některých replikacích vedly k potlačení množení *Malassezia pachydermatis*. U tea tree silice však docházelo jen k opravdu malému rozdílu naměřených hodnot v kultivačních zkumavkách se silicí v porovnání s kontrolními zkumavkami a v některých případech byla dokonce koncentrace v testované zkumavce se silicí větší než v kontrolní zkumavce, což znamená, že nedošlo k žádnému potlačení množení *M. pachydermatis*. Esenciální silice z tea tree v mé studii tedy neměla žádný významný inhibiční účinek, což nekoresponduje s výsledky studie Neves et al. (2018), která uvádí, že silice z tea tree vykazovala významné snížení kvasinek *M. pachydermatis*. Důvodem rozdílných výsledků mohou být rozdílné použité metody. V mé studii byla uplatněna metoda zkumavkové difúze, a ve studii Neves et al. (2018) metoda diskové difúze na agaru. Metoda zkumavkové difúze tedy nemusela být vhodná pro využití esenciální silice z tea tree (případně naopak), jelikož všechny metody nemusejí být využitelné u všech esenciálních silic (Bismarck et al. 2020). Například již zmíněnou metodu diskové difúze na agaru nebo mikrodiluční metodu, kterou využila studie Cavana et al. (2018), která testovala *in vitro* aktivitu esenciálních silic proti *M. pachydermatis*. Zkoumala inhibiční účinek u osmi esenciálních silic, včetně silice z tea tree, která i zde vykazovala nejlepší inhibiční účinek na *M. pachydermatis*. Tuto metodu, ale využila i pilotní studie Campos et al. (2018), která zkoumal antimykotickou aktivitu u 12 různých esenciálních silic, včetně esenciální silice z tea tree proti veterinárním izolátům *M. pachydermatis* a zjistila, že v porovnání s ostatními testovanými esenciálními silicemi měla silice z tea tree nejnižší antimykotickou aktivitu a celkově ani neprokázala významný inhibiční účinek proti *M. pachydermatis* u psů. K objasnění těchto diskrepancí by bylo při zjišťování vlivu esenciální silice z tea tree na kultury *M. pachydermatis* zřejmě vhodné vyzkoušet paralelně různé metody, což bylo mimo moje možnosti.

Esenciální silice z oregana, na rozdíl od silice z tea tree, vykazovala v mé studii výraznou inhibici kvasinek. Průměrně došlo k potlačení množení kvasinek *M. pachydermatis* v testovaných zkumavkách se silicí o 50 % v porovnání hodnot absorbance s kontrolními zkumavkami. Esenciální silice z oregana má obecně antimikrobiální aktivitu, je účinná proti plísním, bakteriím i kvasinkám (Sim et al. 2019). S tím, že má esenciální silice z oregana celkově dobrý inhibiční účinek na kvasinky *M. pachydermatis* korespondují výsledky několika studií. Například Bismarck et al. (2020) testovali 22 esenciálních silic z čehož celkově nejlepšího inhibičního účinku dosáhla citronová tráva, ale dále také silice z listu

skořice, hřebíčku, manuky, meduňky indické, oregana, palmarosy a zimní saturejky vykazovaly silnou antifungální aktivitu. S tím, že má oregano antifungální účinek koresponduje i studie Waller et al. (2022) nebo Sim et al. (2019), kde zjistili, že *Malassezia pachydermatis* je citlivější na esenciální silice z oregana než na silice z tymiánu. Esenciální silice z oregana dosáhla v mé studii nejlepšího inhibičního účinku při koncentraci 125 μ l /l, což byla druhá nejvyšší použitá koncentrace. Esenciální silice z oregana by tak teoreticky mohla být využívána při lehčích formách otitid jako alternativní terapie nebo jako doplněk normální léčby antimykotiky, což by mohlo být téma navazujícího výzkumu.

Pythium oligandrum je mykoparazitická houba, která se používá jako biologická kontrola proti různým patogenům (Luca et al. 2022). Především díky výzkumu realizovanému v České republice je této houbě věnována velká pozornost s ohledem na její terapeutické využití při klinických kožních mykózách člověka a zvířat (Načeradská et al. 2017; Gabrielová et al. 2018; Načeradská et al. 2021). Autoři citovaných studií popisují efekt *P. oligandrum* na vláknité parazitické houby, nikoli však na kvasinky. Právě možnost použití *P. oligandrum* proti kvasinkám mě inspirovala k sérii jednoduchých *in vitro* experimentů, které by mohly být východiskem pro další práci, a to jak v *in vitro*, tak *in vivo* experimentálních systémech.

Elad et al. (1981) se uvádí, že se jí nejlépe daří při teplotách mezi 20-25 °C. Při těchto teplotách se množí a aktivně napadá cílové mykotické patogeny. Nižší nebo vyšší teplota může ovlivnit růst a aktivitu *Pythium oligandrum* a snížit účinnost biologické kontroly. Toto tvrzení mi potvrdila i firma BIOPREPARÁTY s.r.o., která mi kmen *P. oligandrum* poskytla. Růstové preference patogenních kvasinek ze savčí kůže logicky leží ve vyšších teplotách. Kvasinky *Malassezia pachydermatis* u psů se nejlépe množí při teplotě kolem 28-32°C, což odpovídá teplotám na povrchu kůže psa; při teplotách nad 37°C se množení *M. pachydermatis* může zpomalit nebo úplně zastavit. Na druhé straně, při nízkých teplotách se rychlost množení kvasinek *M. pachydermatis* může snížit (Bohn et al. 2008). V rámci hledání vhodné experimentální teploty, umožňující růst jak *Pythia*, tak kvasinek, jsem zjišťovala schopnost *P. oligandrum* růst při teplotách 30 a 32 °C. Výsledky této části studie dokázaly, že *P. oligandrum* roste stejně rychle při teplotě 25, 30, i 32 °C, což koreluje s výsledky Samuel et al. (2000), hodnotící vliv teploty na růst a spolupráci *Pythium lilacinus* a *P. oligandrum*, při různých rozmezích od 15 °C. V případě *P. oligandrum* byl zjištěn optimální růst mezi 25 a 32 °C; u vyšších teplot už docházelo poklesu růstu. Úspěšného růstu jsem, ale dosáhla pouze v případě, kdy bylo *P. oligandrum* kultivované na 2% malt extract agaru (MA2). Při kultivaci na Sabouraud dextrózovém agaru (SDA) docházelo ke sníženému nárůstu kolonie s tím, že kolonie byly méně zřetelné a bez viditelného bílé mycelia, nebo jsem nezaznamenala žádnou kolonii. Kultivační půdu SDA jsem zvolila, protože je vhodná pro kvasinky (Bismarck et al. 2020) a jelikož jsem v této studii zjišťovala i vliv *P. oligandrum* na kvasinky, potřebovala jsem znát schopnosti růstu i na této kultivační půdě. Z výsledků je ale evidentní, že SDA není pro kultivaci „našeho“ kmene *P. oligandrum* vhodný.

Z vyhodnocení interakce *P. oligandrum* a *Malassezia pachydermatis* při bodovém zaočkování kvasinky nebo formou suspenze vyplývá, že na MA2 *P. oligandrum* přerostlo *M. pachydermatis*. Naopak v případě SDA docházelo nejčastěji k situaci, kdy kolonie kvasinek *M. pachydermatis* přerostly *P. oligandrum*, u kterého téměř nebo vůbec nenarostly žádné kolonie (to koresponduje s výše popsanou neochotou *P. oligandrum* růst na tomto médiu. Není mi známa jediná studie, která by se zabývala vlivem *P. oligandrum* na kvasinky *M.*

pachydermatis, s kterou bych mohla tyto výsledky porovnat. Další *in vitro* výzkum by se mohl zabývat interakcemi na jiných médiích, například na agaru V8 nebo Potato dextrózovém agaru (PDA), které byly použité ve studii Cao et al. (2016) k izolaci a charakterizaci *Pythium oligandrum* z rhizosféry pšenice v Číně a byl zde u obou agarů zaznamenán odpovídající nárůst *P. oligandrum*. Současně by bylo vhodné mikroskopicky a ultrastrukturně posoudit charakter případné interakce *P. oligandrum* s kvasinkami, neboť bude zřejmě odlišný od situace, kdy *Pythium* „likviduje“ hyfy jiných typů parazitických hub (Gabrielová et al. 2018).

7 Závěr

Při otitidách u psů hrají kromě bakterií ne zcela jasnou roli kvasinky. Nejčastěji diagnostikovaným druhem je *Malassezia pachydermatis*. Při porovnání vzorků psů s klinickými příznaky otitid se vzorky od psů bez příznaků jsem kultivačně potvrdila běžný výskyt *M. pachydermatis* i v normální mikrobiotě zevního zvukovodu psů v ČR.

Z důvodu zvyšující se antimykotické rezistence na léky běžně používané k léčbě otitid je vhodné hledat alternativní možnosti terapie. Jednou z možností je využití esenciálních silic, které mají širokou škálu protiplísňových vlastností a jsou zároveň i šetrné k životnímu prostředí. Testování inhibičního efektu esenciálních silic z oregana a tea tree na mnou získané „lokální“ kmeny *Malassezia pachydermatis* ze zdravých i nemocných psů prokázalo významný inhibiční vliv silice z oregana proti množení kvasinek *M. pachydermatis* v kultuře. Esenciální silice z tea tree vykazovala minimální inhibiční vlastnosti proti *M. pachydermatis*. Esenciální silice z oregana by tak teoreticky mohla být využívána při lehčích formách otitid jako alternativní terapie nebo jako doplněk normální léčby antimykotiky, což by mohlo být téma navazujícího výzkumu.

Další variantou alternativní terapie otitid u psů je léčba za pomoci mykoparazitické houby *Pythium oligandrum*, u které již bylo zjištěno že má antifungální vlastnosti proti dermatofytům jako *M. canis*, *M. gypseum* a *T. mentagrophytes* a která by tak mohla být zajímavá i při otitidách způsobených kvasinkami. Výsledky mojí experimentální práce dokumentují schopnost *P. oligandrum* v laboratorních podmínkách přerůst kolonie *M. pachydermatis*. Doporučila bych udělat další výzkum růstu na jiných agarech a s větším počtem vstupních dat, aby byly výsledky více specifické.

8 Literatura

- Aneke CI, Nwogwugwu CC, Ugochukwu ICI, Chah KF. 2019. Antifungal activity of ethanolic extracts of *Ocimum gratissimum* and *Vernonia amygdalina* leaves against dermatomycotic agents isolated from domestic animals in South Eastern Nigeria. *Comparative Clinical Pathology* **28**:1791–1795.
- Bajwa J. 2017. Canine *Malassezia* dermatitis. *The Canadian Veterinary Journal* **58**:1119–1121.
- Bajwa J. 2019. Canine *otitis externa* — Treatment and complications. *The Canadian Veterinary Journal* **60**:97–99.
- Baldissera MD, Grando TH, Souza CF, Gressler LT, Stefani LM, Silva AS, Monteiro SG. 2016. *In vitro* and *in vivo* action of terpinen-4-ol, γ -terpinene, and α -terpinene against *Trypanosoma evansi*. *Experimental Parasitology* **162**:43–48.
- Barin C, Ellensohn R, Jesus E. 2007. Óleo essencial de *Melaleuca Alternifolia*: otimização do método analítico **6**:67–72.
- Barnard N, Foster A. 2018. How to treat *Pseudomonas* otitis in dogs. *Veterinary Record* **182**:109–110.
- Begerow D, Stoll M, Bauer R. 2006. A phylogenetic hypothesis of *Ustilaginomycotina* based on multiple gene analyses and morphological data. *Mycologia* **98**:906–916.
- Bělonožníková K, Hýsková V, Chmelík J, Kavan D, Čerovská N, Ryšlavá H. 2022a. *Pythium oligandrum* in plant protection and growth promotion: Secretion of hydrolytic enzymes, elicitors and tryptamine as auxin precursor. *Microbiological Research* **258**:126976.
- Bělonožníková K, Hýsková V, Vašková M, Křížek T, Čokrtová K, Vaněk T, Halířová L, Chudý M, Žufić A, Ryšlavá H. 2022b. Seed Protection of *Solanum lycopersicum* with *Pythium oligandrum* against *Alternaria brassicicola* and *Verticillium albo-atrum*. *Microorganisms* **10**:1348.
- Benhamou N, le Floch G, Vallance J, Gerbore J, Grizard D, Rey P. 2012. *Pythium oligandrum*: an example of opportunistic success. *Microbiology* **158**:2679–2694.
- Benhamou N, Rey P, Chérif M, Hockenhull J, Tirilly Y. 1997. Treatment with the Mycoparasite *Pythium oligandrum* triggers induction of Defense-Related reactions in tomato roots when challenged with *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *Phytopathology* **87**:108–122.
- Benhamou N, Rey P, Picard K, Tirilly Y. 1999. Ultrastructural and cytochemical aspects of the interaction between the mycoparasite *Pythium oligandrum* and soilborne plant pathogens. *Phytopathology* **89**:506–517.
- Berger DJ, Lewis TP, Schick AE, Stone RT. 2012. Comparison of once-daily versus twice-weekly terbinafine administration for the treatment of canine *Malassezia* dermatitis – a pilot study. *Veterinary Dermatology* **23**:418-e79.
- Bismarck D, Dusold A, Heusinger A, Müller E. 2020. Antifungal *in vitro* activity of essential oils against clinical isolates of *Malassezia pachydermatis* from canine ears: A report from a practice laboratory. *Complementary Medicine Research* **27**:143–154.
- Black J, Dean T, Byfield G, Foadie K, Menetrez M. 2013. Determining Fungi rRNA copy number by PCR. *Journal of Biomolecular Techniques* **24**:32–38.
- Boehm TMSA, Parzefall B, Klinger CJ, Wielaender F, Vovk LU, Scabell P, Mueller RS. 2020. Recurrent polyp formation with *Candida tropicalis* infection and otitis in a dog. *Tierärztliche Praxis Ausgabe K: Kleintiere / Heimtiere* **48**: 365–368.

- Bohmova E, Conkova E, Harcarova M, Sihelska Z. 2019. Interactions between Clotrimazole and selected essential oils against *Malassezia pachydermatis* clinical isolates. Polish Journal of Veterinary Sciences **22**:173–175.
- Bohn J, Kulichová M, Proksa B. 2008. *Malassezia pachydermatis* - reproduction and development. Folia Veterinaria **52**: 94-96.
- Bond R, Morris DO, Guillot J, Bensignor EJ, Robson D, Mason KV, Kano R, Hill PB. 2020. Biology, diagnosis and treatment of *Malassezia* dermatitis in dogs and cats Clinical Consensus Guidelines of the World Association for Veterinary Dermatology. Veterinary Dermatology **31**:28–74.
- Bozin B, Mimica-Dukic N, Simin N, Anackov G. 2006. Characterization of the volatile composition of essential oils of some *Lamiaceae* spices and the antimicrobial and antioxidant activities of the entire oils. Journal of Agricultural and Food Chemistry **54**: 1822–1828.
- Bremont T, Guillemaille D, Fusellier M, Bourdeau P, Bruet V. 2018. Grass awn associated *otitis media* with unperforated tympanic membrane in a dog. Revue de Médecine Vétérinaire **169**: 217–220.
- Brilhante RSN et al. 2018. *Malassezia pachydermatis* from animals: Planktonic and biofilm antifungal susceptibility and its virulence arsenal. Veterinary Microbiology **220**: 47–52.
- Brito EHS, Fontenelle ROS, Brilhante RSN, Cordeiro RA, Monteiro AJ, Sidrim JJC, Rocha MFG. 2009. The anatomical distribution and antimicrobial susceptibility of yeast species isolated from healthy dogs. Veterinary journal **182**: 320–326.
- Brožová J. 2002. Exploitation of the mycoparasitic fungus *Pythium oligandrum* in plant protection - A review. Plant Protection Science **38**: 29–35.
- Cabañes FJ, Abarce ML, Bragulat MR, Castellá G. 1996. Seasonal study of the fungal biota of the fur of dogs. Mycopathologia **133**: 1-7.
- Cafarchia C, Figueredo LA, Iatta R, Montagna MT, Otranto D. 2012. *In vitro* antifungal susceptibility of *Malassezia pachydermatis* from dogs with and without skin lesions. Veterinary Microbiology **155**: 395–398.
- Cafarchia C, Gallo S, Romito D, Capelli G, Chermette R, Guillot J, Otranto D. 2005. Frequency, body distribution, and population size of *Malassezia* species in healthy dogs and in dogs with localized cutaneous lesions. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation: Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc **17**: 316–322.
- Campos JM, Sardi LS, Freires CA, Silva LCF, Santana MHO, Goncalves LRG. 2018. *In vitro* antifungal activity of essential oils against *Malassezia pachydermatis* from dogs. Brazilian Journal of Microbiology **49**: 248-254.
- Cao Y, Li Y, Zheng Y, Liu J, Wang L. 2016. Isolation and characterization of *Pythium oligandrum* from the rhizosphere of wheat in China. Journal of Plant Pathology and Microbiology **7**: 1-5.
- Carithers D, Crawford J, de Vos C, Lotriet A, Fourie J. 2016. Assessment of afoxolaner efficacy against *Otodectes cynotis* infestations of dogs. Parasites & Vectors **9**: 635.
- Carson CF, Riley TV. 2001. Safety, efficacy and provenance of tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil. Contact Dermatitis **45**:65–67.
- Casetti F, Bartelke S, Biehler K, Augustin M, Schempp CM, Frank U. 2012. Antimicrobial activity against bacteria with dermatological relevance and skin tolerance of the essential oil from *Coriandrum sativum* L. fruits. Phytotherapy Research **26**: 420–424.
- Cavana P, Petit J-Y, Perrot S, Guechi R, Marignac G, Reynaud K, Guillot J. 2015. Efficacy of a 2% climbazole shampoo for reducing *Malassezia* population sizes on the skin of naturally infected dogs. Journal De Mycologie Medicale **25**: 268–273.

- Cavana P, Zambonelli P, Bridigi P, Vizziello A, Petrucci F, Poli A. 2018. *In vitro* activity of essential oils against *Malassezia pachydermatis* and proposed *in vivo* application. *Journal de Mycologie Médicale* **28**: 345-351.
- Cazzola R, Cestaro B. 2014. Chapter 9 - Antioxidant spices and herbs used in diabetes. Pages 89–97 in Preedy VR, editor. *Diabetes: Oxidative Stress and Dietary Antioxidants*. Academic Press, San Diego.
- Cetin H, Cilek JE, Aydin L, Yanikoglu A. 2009. Acaricidal effects of the essential oil of *Origanum minutiflorum* (*Lamiaceae*) against *Rhipicephalus turanicus* (Acari: *Ixodidae*). *Veterinary Parasitology* **160**: 359–361.
- Chiavassa E, Tizzani P, Peano A. 2014. *In Vitro* antifungal susceptibility of *Malassezia pachydermatis* strains isolated from dogs with chronic and acute *otitis externa*. *Mycopathologia* **178**: 315-319.
- Chouhan S, Sharma K, Guleria S. 2017. Antimicrobial activity of some essential oils— Present status and future perspectives. *Medicines* **4**: 58.
- Classen J, Bruehschwein A, Meyer-Lindenberg A, Mueller RS. 2016. Comparison of ultrasound imaging and video otoscopy with cross-sectional imaging for the diagnosis of canine *otitis media*. *The Veterinary Journal* **217**: 68–71.
- Cole LK. 2010. Anatomy and physiology of the canine ear. *Veterinary Dermatology* **21**: 221–231.
- Court MH. 2013. Feline drug metabolism and disposition: pharmacokinetic evidence for species differences and molecular mechanisms. *The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice* **43**: 1039–1054.
- Dantas BPV et al. 2015. Participation of the TRP channel in the cardiovascular effects induced by carvacrol in normotensive rat. *Vascular Pharmacology* **67**: 48–58.
- De Martino L, Nocera FP, Mallardo K, Nizza S, Masturzo E, Fiorito F, Iovane G, Catalanotti P. 2016. An update on microbiological causes of canine *otitis externa* in Campania Region, Italy. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* **6**: 384–389.
- Dhifi W, Bellili S, Jazi S, Bahloul N, Mnif W. 2016. Essential oils chemical characterization and investigation of some biological activities: A Critical Review. *Medicines* **3**:25.
- Di Cerbo A, Centenaro S, Beribè F, Laus F, Cerquetella M, Spaterna A, Guidetti G, Canello S, Terrazzano G. 2016. Clinical evaluation of an antiinflammatory and antioxidant diet effect in 30 dogs affected by chronic *otitis externa*: preliminary results. *Veterinary Research Communications* **40**: 29–38.
- Drechsler C. 1943. Two species of *Pythium* occurring in southern States. *Phytopathology* **33**: 261–299.
- Dworecka-Kaszak B, Biegańska MJ, Dąbrowska I. 2020. Occurrence of various pathogenic and opportunistic fungi in skin diseases of domestic animals: a retrospective study. *BMC Veterinary Research* **16**: 248.
- Ebani VV, Nardoni S, Bertelloni F, Giovanelli S, Rocchigiani G, Pistelli L, Mancianti F. 2016. Antibacterial and antifungal activity of essential oils against some pathogenic bacteria and yeasts shed from poultry. *Flavour and Fragrance Journal* **31**: 302–309.
- Ebani VV, Pieracci Y, Cagnoli G, Bertelloni F, Munafò C, Nardoni S, Pistelli L, Mancianti F. 2023. *In vitro* antimicrobial activity of *Thymus vulgaris*, *Origanum vulgare*, *Satureja montana* and their mixture against clinical isolates responsible for canine *otitis externa*. *Veterinary Sciences* **10**: 30.
- Elad Y, Chet R, Henis A, Katan J. 1981. Biological control of soilborne pathogens by a mixed culture of antagonistic fungi, bacteria and actinomycetes. *Soil Biology and Biochemistry* **13**: 379-385.
- Faure C et al. 2020. Long-Read genome sequence of the sugar beet rhizosphere mycoparasite *Pythium oligandrum*. *G3 Genes|Genomes|Genetics* **10**: 431–436.

- Foley MF, Deacon JW. 1985. Isolation of *Pythium oligandrum* and other necrotrophic mycoparasites from soil. Transactions of the British Mycological Society **85**: 631–639.
- Gabrielová A, Mencl K, Suchánek M, Klimeš R, Hubka V, Kolařík M. 2018. The oomycete *Pythium oligandrum* can suppress and kill the causative agents of dermatophytoses. Mycopathologia **183**: 751–764.
- Gardes M, Bruns TD. 1993. It's primers with enhanced specificity for *Basidiomycetes*—Application to the identification of mycorrhizae and rusts. Molecular Ecology **2**: 113–118.
- Gerbore J, Benhamou N, Vallance J, Le Floch G, Grizard D, Regnault-Roger C, Rey P. 2014. Biological control of plant pathogens: advantages and limitations seen through the case study of *Pythium oligandrum*. Environmental Science and Pollution Research International **21**: 4847–4860.
- Gorlenko CL, Kiselev HY, Budanova EV, Zamyatnin AA, Ikryannikova LN. 2020. Plant secondary metabolites in the battle of drugs and drug-resistant bacteria: New Heroes or worse clones of antibiotics?. Antibiotics **9**: 170.
- Gotthelf LN. 2004. Diagnosis and treatment of *otitis media* in dogs and cats. Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice **34**: 469–487.
- Heine PA. 2004. Anatomy of the ear. Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice **34**: 379–395.
- Hirdes VB, Nunes AR, Neves Katiellen Ribeiro, Abdala JV, Rocha AP de F, Zielke M, Costa RM, Sampaio LCL. 2016. Cutaneous candidiasis in a dog. Scholars Academic Journal of Biosciences **4**: 422–424.
- Horáčková K. 2011. Významní ektoparazité psa a kočky. Praktické lékařství **7**: 128–131.
- Ikeda S, Shimizu A, Shimizu M, Takahashi H, Takenaka S. 2012. Biocontrol of black scurf on potato by seed tuber treatment with *Pythium oligandrum*. Biological Control **60**: 297–304.
- Jang I-S, Yoon W-K, Hyun C. 2017. *Candida albicans* urinary tract infection in a Shih Tzu dog with immune-mediated hemolytic anemia. Korean Journal of Veterinary Research **57**:139–141.
- Jimenez AG, Paul K, Zafar A, Ay A. 2022. Effect of different masses, ages, and coats on the thermoregulation of dogs before and after exercise across different seasons. Veterinary Research Communications (e11259) DOI: 10.1007/s11259-022-10045-2.
- Karaca G, Tepedelen G, Belghouthi A, Paul B. 2008. A new mycoparasite, *Pythium lycopersicum*, isolated in Isparta, Turkey: morphology, molecular characteristics, and its antagonism with phytopathogenic fungi. FEMS microbiology letters **288**: 163–170.
- Karlapudi SK. 2017. Diagnosis and management of *Malassezia* otitis in dogs **6**:36–38.
- Kasai T, Fukui Y, Aoki K, Ishii Y, Tateda K. 2021. Changes in the ear canal microbiota of dogs with *otitis externa*. Journal of Applied Microbiology **130**:1084–1091.
- Korbelik J, Singh A, Rousseau J, Weese JS. 2019. Characterization of the otic bacterial microbiota in dogs with *otitis externa* compared to healthy individuals. Veterinary Dermatology **30**: 228-e70.
- König HE, Liebich HG. 2002. Anatomie domácích savců 2 - Splanchnologie, cévní a nervová soustava. Hajko & Hajková, Bratislava.
- Kraijer-Huver IMG, Haar G ter, Djajadiningrat-Laanen SC, Boevé MH. 2009. Peri- and retrobulbar abscess caused by chronic *otitis externa, media* and *interna* in a dog. Veterinary Record **165**:209–211.
- Kushwaha SK, Vetukuri RR, Grenville-Briggs LJ. 2017. Draft genome sequence of the mycoparasitic oomycete *Pythium oligandrum* strain CBS 530.74. Genome Announcements **5**: e00346-17.

- Laing SAK, Deacon JW. 1991. Video microscopical comparison of mycoparasitism by *Pythium oligandrum*, *P. nunn* and an unnamed *Pythium* species. *Mycological Research* **95**: 469–479.
- Lans C, Turner N, Khan T. 2008. Medicinal plant treatments for fleas and ear problems of cats and dogs in British Columbia, Canada. *Parasitology Research* **103**: 889–898.
- Le Floch G, Rey P, Benizri E, Benhamou N, Tirilly Y. 2003. Impact of auxin-compounds produced by the antagonistic fungus *Pythium oligandrum* or the minor pathogen *Pythium* group F on plant growth. *Plant and Soil* **257**: 459–470.
- Lefkaditis M, Spanoudis K, Panorias A, Sossidou A. 2021. Prevalence, intensity of infestation, and risk factors for *Otodectes cynotis* in young dogs. *International Journal of Acarology* **47**: 281–283.
- Lévesque CA. 2011. Fifty years of oomycetes—from consolidation to evolutionary and genomic exploration. *Fungal Diversity* **50**: 35–46.
- Lévesque CA, De Cock AWAM. 2004. Molecular phylogeny and taxonomy of the genus *Pythium*. *Mycological Research* **108**: 1363–1383.
- Leyva-López N, Gutiérrez-Grijalva EP, Vazquez-Olivo G, Heredia JB. 2017. Essential oils of oregano: Biological activity beyond their antimicrobial properties. *Molecules* **22**: 989.
- Lifshitz R, Stanghellini ME, Baker R. 1984. A new species of *Pythium* isolated from soil in Colorado. *Mycotaxon* **20**: 373–379.
- Lodha BC, Webster J. 1990. *Pythium acanthophoron*, a mycoparasite, rediscovered in India and Britain. *Mycological Research* **94**: 1006–1008.
- Lorek A, Dennis R, Dijk J, Bannoehr J. 2020. Occult *otitis media* in dogs with chronic *otitis externa* – magnetic resonance imaging and association with otoscopic and cytological findings. *Veterinary Dermatology* **31**: 146.
- Luca I, Ilie MS, Florea T, Olariu-Jurca A, Stancu A, Dărăbuș G. 2022. The use of *Pythium oligandrum* in the biological control of roundworm infection in dogs and cats. *Pathogens* **11**: 367.
- Maes C, Bouquillon S, Fauconnier M-L. 2019. Encapsulation of essential oils for the development of biosourced pesticides with controlled release: A Review. *Molecules* **24**: 2539.
- Marvan F, Hampel A, Hložánková E, Massanyi L, Vernerová E, Jelínek K. 1992. Morfologie hospodářských zvířat. Bráda s.r.o, Praha.
- McGowan J, Fitzpatrick DA. 2017. Genomic, network, and phylogenetic analysis of the oomycete effector arsenal. *mSphere* **2**: e00408-17.
- McKay DL, Blumberg JB. 2006. A Review of the bioactivity and potential health benefits of chamomile tea (*Matricaria recutita* L.). *Phytotherapy Research* **20**: 519–530.
- Miller WH, Griffin CE, Campbell KL. 2012. Muller and Kirk's small animal dermatology. Elsevier Health Sciences, Missouri.
- Mugnaini L, Nardoni S, Pistelli L, Leonardi M, Giuliotti L, Benvenuti MN, Pisseri F, Mancianti F. 2013. A herbal antifungal formulation of *Thymus serpyllum*, *Origanum vulgare* and *Rosmarinus officinalis* for treating ovine dermatophytosis due to *Trichophyton mentagrophytes*. *Mycoses* **56**: 333–337.
- Načeradská M, Fridrichová M, Kellnerová D, Peková S, Lány P. 2017. Antifungal effects of the biological agent *Pythium oligandrum* observed *in vitro*. *Journal of Feline Medicine and Surgery* **19**: 817–823.
- Načeradská M, Fridrichová M, Kolářová MF, Krejčová T. 2021. Novel approach of dermatophytosis eradication in shelters: effect of *Pythium oligandrum* on *Microsporum canis* in FIV or FeLV positive cats. *BMC Veterinary Research* **17**: 290.
- Najbrt R, Červený Č, Kaman J, Mikyska E, Štarha O, Štěrba O. 1973. Veterinární anatomie 1. Státní zemědělské nakladatelství Praha, Praha.

- Nardoni S, Pistelli L, Baronti I, Najar B, Pisseri F, Bandeira Reidel RV, Papini R, Perrucci S, Mancianti F. 2017. Traditional *Mediterranean* plants: characterization and use of an essential oils mixture to treat *Malassezia otitis externa* in atopic dogs. *Natural Product Research* **31**: 1891–1894.
- Nascente P da S, Cleff MB, Meinerz ARM, Xavier MO, Schuch LFD, Meireles MCA, Mello JRB de. 2009a. Comparison of the broth microdilution technique and ETEST to ketoconazole front *malassezia pachydermatis*. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science* **46**: 222–227.
- Nascente P da S, Meinerz ARM, Faria RO de, Schuch LFD, Meireles MCA, Mello JRB de. 2009b. CLSI broth microdilution method for testing susceptibility of *Malassezia pachydermatis* to thiabendazole. *Brazilian Journal of Microbiology* **40**: 222–226.
- Nazzaro F, Fratianni F, Coppola R, Feo V. 2017. Essential oils and antifungal activity. *Pharmaceuticals* **10**: 86.
- Neves RCSM, Ferraz RHS, Mendonça AJ, Lima SR, Cruz FACS da, Rosa JG, Mateus LA de F, Ferraz V, Barros LA. 2013. Teste *in vitro* do efeito acaricida do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* sobre *Otodectes cynotis*. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária* **20**: 9–12.
- Neves RCSM, Makino H, Cruz TPPS, Silveira MM, Sousa VRF, Dutra V, Lima MEKM, Belli CB. 2018. *In vitro* and *in vivo* efficacy of tea tree essential oil for bacterial and yeast ear infections in dogs. *Pesquisa Veterinária Brasileira* **38**: 1597–1607.
- Ngo J, Taminiu B, Fall PA, Daube G, Fontaine J. 2018. Ear canal microbiota - a comparison between healthy dogs and atopic dogs without clinical signs of *otitis externa*. *Veterinary Dermatology* **29**: 425-e140.
- Paterson S. 2017. *Otitis media* with effusion in the boxer: a report of seven cases: *Otitis media* with effusion in the boxer dog. *Journal of Small Animal Practice* **59**: 646–650.
- Paterson S. 2020. Ear cytology for the veterinary nurse. *The Veterinary Nurse* **11**: 66–68.
- Peano A, Beccati M, Chiavassa E, Pasquetti M. 2012. Evaluation of the antifungal susceptibility of *Malassezia pachydermatis* to clotrimazole, miconazole and thiabendazole using a modified CLSI M27-A3 microdilution method. *Veterinary Dermatology* **23**: 131–135.
- Peano A, Johnson E, Chiavassa E, Tizzani P, Guillot J, Pasquetti M. 2020. Antifungal resistance regarding *Malassezia pachydermatis*: Where are we now? *Journal of Fungi* **6**: 93.
- Pereira AM, Clemente A. 2021. Dogs microbiome from tip to toe. *Topics in Companion Animal Medicine* **45**: 100584.
- Perry LR, MacLennan B, Korven R, Rawlings TA. 2017. Epidemiological study of dogs with *otitis externa* in Cape Breton, Nova Scotia. *The Canadian Veterinary Journal* **58**: 168–174.
- Petrov V, Mihaylov G, Tsachev I, Zhelev G, Marutsov P, Koev K. 2013. *Otitis externa* in dogs: microbiology and antimicrobial susceptibility. *Revue Méd. Vét.* **164**: 18–22.
- Pezzotti G et al. 2022. Raman spectroscopy of oral *Candida* species: Molecular-Scale analyses, chemometrics, and barcode identification. *International Journal of Molecular Sciences* **23**: 5359.
- Pfaller MA. 2012. Antifungal drug resistance: Mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. *The American Journal of Medicine* **125**: 3–13.
- Pinchbeck LR, Hillier A, Kowalski JJ, Kwochka KW. 2002. Comparison of pulse administration versus once daily administration of itraconazole for the treatment of *Malassezia pachydermatis* dermatitis and *otitis* in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* **220**: 1807–1812.

- Popovic N. 2005. Pathogenesis of *otitis externa* and *otitis media* in dogs and cats. *Veterinarski glasnik* **59**: 117–128.
- Puig L, Castellá G, Cabañes FJ. 2019. Quantification of *Malassezia pachydermatis* by real-time PCR in swabs from the external ear canal of dogs. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* **31**: 440–447.
- Puigdemont A, D'Andreano S, Ramió-Lluch L, Cuscó A, Francino O, Brazis P. 2021. Effect of an anti-inflammatory pomegranate otic treatment on the clinical evolution and microbiota profile of dogs with *otitis externa*. *Veterinary Dermatology* **32**: 158.
- Pye C. 2018. *Pseudomonas otitis externa* in dogs. *The Canadian Veterinary Journal* **59**: 1231–1234.
- Radünz M, Helbig E, Borges CD, Gandra TKV, Gandra. 2018. A Mini-Review on encapsulation of essential oils. *Journal of Analytical & Pharmaceutical Research* **7**:11–12.
- Reece WO. 2011. Fyziologie a funkční anatomie domácích zvířat. Grada Publishing a. s., Praha.
- Reichling J, Schnitzler P, Suschke U, Saller R. 2009. Essential oils of aromatic plants with antibacterial, antifungal, antiviral, and cytotoxic properties--an overview. *Forschende Komplementarmedizin (2006)* **16**: 79–90.
- Rey P, Le Floch G, Benhamou N, Salerno M-I, Thuillier E, Tirilly Y. 2005. Interactions between the mycoparasite *Pythium oligandrum* and two types of sclerotia of plant-pathogenic fungi. *Mycological Research* **109**: 779–788.
- Ribeiro WRC, Butler EE. 1992. Isolation of mycoparasitic species of *Pythium* with spiny oogonia from soil in California. *Mycological Research* **96**: 857–862.
- Rusenova N, Parvanov P. 2009. Antimicrobial actives of twelve essential oils against microorganisms of veterinary importance. *Trakia Journal of Sciences* **7**: 37–43.
- Sakkas H, Papadopoulou C. 2017. Antimicrobial activity of basil, oregano, and thyme essential oils. *Journal of Microbiology and Biotechnology* **27**: 429–438.
- Samuel S, Sivan A, Mathew K. 2000. Effect of temperature on growth and sporulation of *Paecilomyces lilacinus* and *Paecilomyces oligandrum*. *Journal of Phytopathology* **148**: 73-78.
- Sankaranarayanan A, Amaresan N. 2020. Chapter 40 - *Pythium*. Pages 777–792 in Amaresan N, Senthil Kumar M, Annapurna K, Kumar K, Sankaranarayanan A, editors. *Beneficial Microbes in Agro-Ecology*. Academic Press.
- Schlemmer KB, Jesus FPK, Tondolo JSM, Weiblen C, Azevedo MI, Machado VS, Botton SA, Alves SH, Santurio JM. 2019. *In vitro* activity of carvacrol, cinnamaldehyde and thymol combined with antifungals against *Malassezia pachydermatis*. *Journal de mycologie médicale* **29**: 375-377.
- Schlieck TMM, Petrolli TG, Bissacotti BF, Copetti PM, Bottari NB, Morsch VM, da Silva AS. 2021. Addition of a blend of essential oils (cloves, rosemary and oregano) and vitamin E to replace conventional chemical antioxidants in dog feed: effects on food quality and health of beagles. *Archives of Animal Nutrition* **75**: 389–403.
- Sharifi-Rad J et al. 2017. Biological activities of essential oils: From plant chemoeology to traditional healing systems. *Molecules (Basel, Switzerland)* **22**: 70.
- Shokri H, Khosravi AR. 2016. An epidemiological study of animals dermatomycoses in Iran. *Journal de Mycologie Médicale* **26**: 170–177.
- Sihelská Z, Čonková E, Vácz P, Harčárová M. 2019. Antifungal susceptibility of isolates from dogs. *Folia Veterinaria* **63**: 15–20.
- Sihelská Z, Pangráčová Piterová M, Čonková E, Harčárová M, Böhmová E. 2017. *Malassezia* versus *Candida* in healthy dogs. *Folia Veterinaria* **61**: 54–59.

- Silva JT, Ferreira LC, Fernandes MM, Sousa LN, Feitosa TF, Braga FR, Brasil AW de L, Vilela VLR. 2020. Prevalence and clinical aspects of *Otodectes cynotis* infestation in dogs and cats in the Semi-arid region of Paraíba, Brazil. *Acta Scientiae Veterinariae* **48**: 1725.
- Silva SRS, Demuner AJ, Barbosa LC de A, Casali VWD, Nascimento EA, Pinheiro AL. 2002. Efeito do estresse hídrico sobre características de crescimento e a produção de óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Cheel. *Acta Scientiarum. Agronomy* **24**: 1363–1368.
- Sim JXF, Khazandi M, Chan WY, Trott DJ, Deo P. 2019. Antimicrobial activity of thyme oil, oregano oil, thymol and carvacrol against sensitive and resistant microbial isolates from dogs with *otitis externa*. *Veterinary Dermatology* **30**: 524–e159.
- Simões RP, Groppo FC, Sartorato A, Del F, Mattos Filho TR, Ramacciato JC, Fernando S, Rodrigues MVN. 2002. Efeito do óleo de *Melaleuca alternifolia* sobre a infecção estafilocócica. *Lecta-USF* **20**: 143–152.
- Simonetti G, Tocci N, Valletta A, Brasili E, D’Auria FD, Idoux A, Pasqua G. 2016. *In vitro* antifungal activity of extracts obtained from *Hypericum perforatum* adventitious roots cultured in a mist bioreactor against planktonic cells and biofilm of *Malassezia furfur*. *Natural Product Research* **30**: 544–550.
- Siniscalchi M, D’Ingeo S, Minunno M, Quaranta A. 2018. Communication in dogs. *Animals* **8**: 131.
- Souto EPF de, Frades MTS, Borges IL, Torres LM, Kommers GD, Galiza GJN de, Riet-Correa F, Dantas AFM. 2018. Cerebral *Candida albicans* infection in two dogs. *Acta Scientiae Veterinariae* **46**: 6–8.
- Štrbac F, Petrović K, Stojanović D, Ratajac R. 2021. Possibilities and limitations of the use of essential oils in dogs and cats. *Veterinary Journal of Republic of Srpska* **2**: 238–251.
- Svoboda M, Senior DF, Doubek J, Klimeš J. 2000. Nemoci psa a kočky 1.díl. Česká asociace veterinárních lékařů malých zvířat (ČAVLMZ), Brno.
- Svobodová V, Svoboda M, Vernerová E. 2013. Klinická parazitologie psa a kočky, druhé vydání. Miroslav Svoboda - B-V-M, Brno.
- Taenzler J, de Vos C, Roepke RKA, Frénais R, Heckerroth AR. 2017. Efficacy of fluralaner against *Otodectes cynotis* infestations in dogs and cats. *Parasites & Vectors* **10**: 30.
- Tan Y, Peng L, Yuan L, Wang S. 2015. Toxicity of *Pythium oligandrum* broth to animal and its control effect on rot diseases caused by *Penicillium italicum* and *Penicillium digitatum* in orange fruit storage. *Wei Sheng Wu Xue Bao = Acta Microbiologica Sinica* **55**: 1418–1426.
- Tang S, Prem A, Tjokrosurjo J, Sary M, Van Bel MA, Rodrigues-Hoffmann A, Kavanagh M, Wu G, Van Eden ME, Krumbeck JA. 2020. The canine skin and ear microbiome: A comprehensive survey of pathogens implicated in canine skin and ear infections using a novel next-generation-sequencing-based assay. *Veterinary Microbiology* **247**: e103764
- Tielemans E, Prullage J, Tomoko O, Liebenberg J, Capári B, Sotiraki S, Kostopoulou D, Ligda P, Ulrich M, Knaus M. 2021. Efficacy of a novel topical combination of esafoxolaner, eprinomectin and praziquantel against ear mite (*Otodectes cynotis*) infestations in cats. *Parasite* **28**: 26.
- Tocci N, Simonetti G, D’Auria FD, Panella S, Palamara AT, Valletta A, Pasqua G. 2011. Root cultures of *Hypericum perforatum* subsp. *angustifolium* elicited with chitosan and production of xanthone-rich extracts with antifungal activity. *Applied Microbiology and Biotechnology* **91**: 977–987.
- Tragiannidis A, Bisping G, Koehler G, Groll AH. 2010. Minireview: *Malassezia* infections in immunocompromised patients. *Mycoses* **53**: 187–195.

- Triana S, González A, Ohm RA, Wösten HAB, Cock H, Restrepo S, Celis A. 2015. Draft genome sequence of the animal and human pathogen *Malassezia pachydermatis* strain CBS 1879. *Genome Announcements* **3**: e01197-15.
- Váci P, Čonková E, Marcinčáková D, Sihelská Z. 2018. Antifungal effect of selected essential oils on *Malassezia pachydermatis* growth. *Folia Veterinaria* **62**: 67–72.
- Vercelli C, Pasquetti M, Giovannetti G, Visionsi S, Re G, Giorgi M, Gambino G, Peano A. 2021. *In vitro* and *in vivo* evaluation of a new phytotherapeutic blend to treat acute *externa otitis* in dogs. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* **44**: 910–918.
- Waller SB, Ripoll MK, Silva AL, Serra EF, Dias TP, Neves VBD, Pereira de Melo, Lindemann P, Martins OA, Gomes ADR, Faria RO, Meireles MCA, Mello JRB, Cleff MB. 2022. Activities and mechanisms of oregano, marjoram and rosemary essential oils against *Malassezia pachydermatitis* isolates from canine and feline otitis. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences* **46**: 549-558.
- Wagner R, Schadler S. 2000. Qualitative study of *Malassezia* species colonisation in young puppies. *Veterinary Record* **147**: 192-194.
- Wu G et al. 2015. Genus-Wide comparative genomics of *Malassezia delineaes* it's phylogeny, physiology, and Niche Adaptation on Human Skin. *PLOS Genetics* **11**: e1005614.
- Yang C, Huang H-P. 2016. Evidence-based veterinary dermatology: a review of published studies of treatments for *Otodectes cynotis* (ear mite) infestation in cats. *Veterinary Dermatology* **27**: 221-e56.
- Yen H-F, Hsieh C-T, Hsieh T-J, Chang F-R, Wang C-K. 2015. *In vitro* anti-diabetic effect and chemical component analysis of 29 essential oils products. *Journal of Food and Drug Analysis* **23**: 124–129.
- ZhiYuan Z, Huan Z, YanFeng H, WanHao C, ZongQi L. 2017. Diversity of keratin-degrading fungi from body surfaces of different pet dogs. *Mycosystema* **36**: 663-572