

UNIVERZA V LJUBLJANI

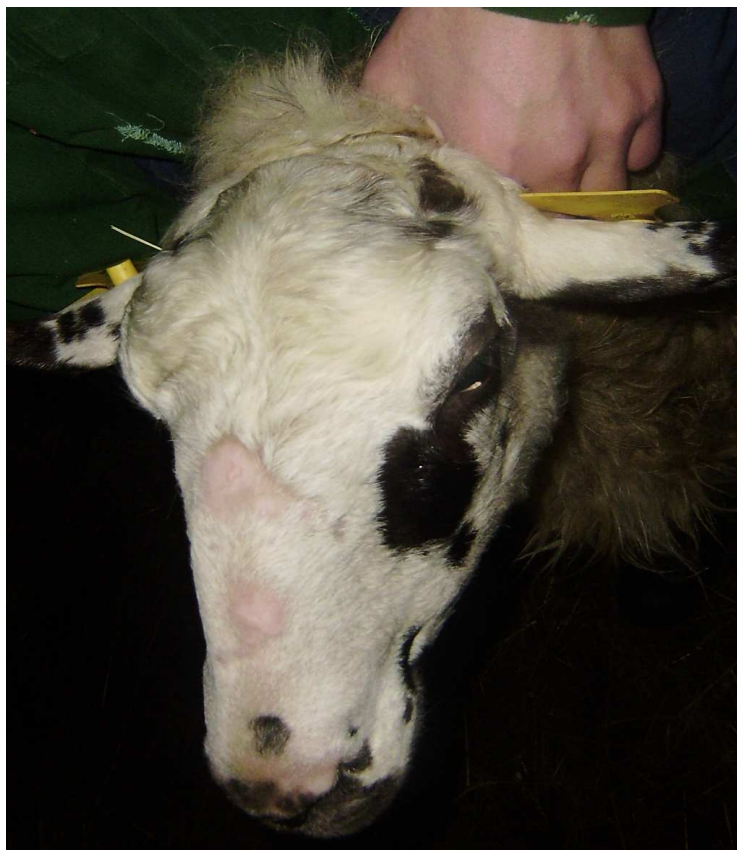
Veterinarska fakulteta

Irena Zdovc

Veterinarska mikologija

Študijski material

2. dopolnjena izdaja



Ljubljana, 2009

UVOD

Kaj so glive?

Glive so evkariontski organizmi, ki so bili sprva razvrščeni v kraljestvo rastlin, vendar se od njih in drugih organizmov razlikujejo v nekaterih bistvenih lastnostih. Zato so jih, podobno kot živali in rastline, razvrstili v samostojno **kraljestvo gliv** (ang. Kingdom Fungi, lat. Regnum Fungorum). Glive nimajo klorofila, v celični steni pa imajo hitin. Glive so (tako kot živali in rastline) evkarionti, zato se razlikujejo od bakterij, ki so prokarionti. Zaradi tega imajo nekoliko drugače organizirano delovanje celice in drugačno sestavo celične stene.

Morfologija

Morfološko delimo glive na dve večji skupini, ki sicer nista taksonomski enoti, vendar ima taka delitev svoj praktični pomen. Prva skupina so plesni (*Hyphomycetes*), ki rastejo kot dolga, vozlasta vlakna celic in oblikujejo makroskopsko vidni micelij (sem spadajo tudi dermatofiti). Druga skupina pa so kvasovke (*Blastomycetes*), ki so enocelični organizmi in oblikujejo podobne kolonije kot bakterije. Nekatere glive lahko rastejo v obliki plesni in kvasovk, odvisno od pogojev rasti. Take so predvsem temperaturno dvočične glive (thermally dimorphic fungi), ki pri nižjih temperaturah rastejo v obliki plesni, pri višjih pa v obliki kvasovk.

Naravno okolje

Glive so mikroorganizmi, ki lahko živijo kot paraziti ali saprofiti. Večina gliv, ki povzročajo sistemske mikoze, živijo kot saprofiti v zemlji, v razpadajočem rastlinju in gnoju. Naravno okolje je primarni vir okužbe v večini primerov mikoz, ki se najpogosteje širijo z vdihavanjem povzročitelja, zaužitjem s hrano in preko poškodovanih tkiv, predvsem kože in sluznic.

Razmere za rast

Optimalne razmere za rast gliv so v toplem in vlažnem okolju pri pH vrednosti okrog 6, vendar lahko tolerirajo tudi nekoliko bolj kisle in bazične pogoje. Glive so striktni aerobi in večinoma dobro rastejo pri temperaturi 20 do 30°C. Patogene glive, ki povzročajo sistemske mikoze, pa lahko rastejo tudi pri 37°C. Na umetnih gojiščih jih večina raste razmeroma počasi. Zigomicete in glive iz rodu *Aspergillus* lahko zrastejo v 2-3 dneh, medtem ko dermatofiti rastejo 1-3 tedne ali celo dlje.

Razdelitev gliv

Morfološke lastnosti gliv na umetnih gojiščih in v naravnem okolju so najpomembnejši temelj za razvrstitev in identifikacijo posameznih vrst gliv.

Glive najpogosteje razvrščamo v štiri klasične razrede, delitev pa temelji na obliki spolnih spor. Glive se razmnožujejo na nespolni ali spolni način, lahko pa tudi na oba načina. Glive, pri katerih je znan samo nespolni način razmnoževanja, imenujemo nepopolne glive (*Fungi imperfecti*) in jih uvrščamo med deuteromicete. Glive, pri katerih je znan tudi spolni način razmnoževanja, imenujemo popolne glive (*Fungi perfecti*) in jih uvrščamo bodisi med askomicete, bazidiomicete ali zigomicete. Večina gliv, ki povzročajo bolezni pri ljudeh in živalih, spada v skupini deuteromicet (*Deuteromycetes*) ali zigomicet (*Zygomycetes*) (glej tabelo 1).

Tabela 1: Razdelitev gliv na podlagi načina razmnoževanja oziroma oblike spolnih in nespolnih spor

	Nepopolne glive Fungi imperfecti	Popolne glive Fungi perfecti		
	<i>Deuteromycetes</i>	<i>Ascomycetes</i>	<i>Basidiomycetes</i>	<i>Zygomycetes</i>
Septirane hife	+	+	+	-
Spolna oblika razmnoževanja	-	+	+	+
Nespolne spore	Konidiji Artrospore Klamidospore Blastospore	Konidiji Artrospore Klamidospore	Konidiji Artrospore	Sporangiospore
Spolne spore	-	Askospore	Bazidiospore	Zigospore

Pri nekaterih nepopolnih glivah je bil kasneje ugotovljen tudi spolni način razmnoževanja, zato so bile naknadno razvrščene med popolne glive, v ustrezno skupino glede na obliko spolnih spor. Večina patogenih gliv, ki so prej spadale med nepopolne glive, je bilo po odkritju spolnega načina razmnoževanja razvrščenih v skupino askomicet (*Ascomycetes*). Glede na to so dobile tudi novo ime in sicer kot anamorf za nespolni način in teleomorf za spolni način razvrščanja.

Tabela 2: Sprememba imena pri anamorfu in teleomorfu

Anamorf (glede na nespolni način)	Teleomorf (glede na spolni način)
<i>Cryptococcus neoformans</i>	<i>Filobasidiella neoformans</i>

Splošne značilnosti glivičnih okužb

Med patogenimi glivami so le redke obligatno patogene (npr. dermatofiti). Ostale pa večinoma živijo v naravi kot saprofiti ali kot komenzali na živalih in ljudeh. Mnoge od njih so oportunistični patogeni in lahko povzročijo bolezen le ob vplivu določenih predispozicijskih faktorjev (npr. sprememba naravne bakterijske flore po dolgotrajnem delovanju antibiotikov, padec splošne odpornosti, druge bolezni, poškodbe kože in sluznic, povečana vlažnost tkiva, izpostavljenost veliki infektivni dozi itd.). Mikoze se navadno pojavljajo sporadično, lahko pa tudi v obliki večjih izbruhov, npr. dermatofitoze. V organizmu praviloma ne izločajo posebnih eksotoksinov ali endotoksinov. Znane so tudi kronične glivične okužbe, ki se kažejo v obliki granulomatoznih sprememb kot posledica obrambne reakcije organizma. Imunski odgovor po okužbi z glivami je predvsem na nivoju celične obrambe in manj na proizvodnji protiteles, ki večinoma ne omogočajo dobre zaščite. Pri nekaterih organizmih lahko pride tudi do preobčutljivostnih reakcij, kar lahko uporabljamo v diagnostične namene (npr. uporaba histoplazmina za diagnostiko histoplazmoze).

Glede na lokacijo sprememb lahko delimo mikoze na globoke (sistemske) in površinske (superficialne), čeprav imajo nekatere od njih lahko lastnosti obeh. Npr. *Candida albicans* in *Aspergillus fumigatus* lahko povzročata površinske in sistemske okužbe.

Glede na način delovanja delimo glive na:

- **Patogene** glive, ki se naseljujejo in razmnožujejo v ali na tkivih gostitelja in povzročajo bolezenske spremembe. Nekatere glive, ki sicer niso patogene, pa lahko s svojimi sporami sprožijo zelo hude alergične reakcije.
- **Toksogene** glive, ki se razmnožujejo v okolju ali krmi in izločajo toksične metabolite, s katerimi se lahko zastrupijo živali in ljudje.
- **Industrijske** glive, ki sodelujejo pri različnih procesih, ki izboljšajo kvaliteto hrane (npr. kvasovke v pekovski ali vinski industriji) ali omogočajo nastanek novih, koristnih snovi (npr. *Penicillium notatum* v farmacevtski industriji).

Mikoze pri živalih povzročajo enaki ali podobni povzročitelji kot pri ljudeh, med njimi pa so nekateri bolj prilagojeni določenim živalskim vrstam. Mnoge bolezni se prenašajo med različnimi živalskimi vrstami in z živali na ljudi, redkeje pa z ljudi na živali.

NAJPOMEMBNEJŠE MIKOZE PRI DOMAČIH ŽIVALIH



MIKOZE PRI PREŽVEKOVALCIH

Tabela 3: Pregled najpomembnejših mikoz pri domačih prežvekovalcih

Mikoza	Povzročitelj	Pojavljanje		Patogenost	
		Govedo	Ovce/koze	govedo	Ovce/koze
Dermatofitoze	<i>T. verrucosum</i>	+++	+	+++	++
	<i>T. mentagrophytes</i>	+	+	+	+
	<i>T. equinum</i>				
	<i>M. canis</i>				
Mikotični mastitis	<i>Candida sp.</i>				
	<i>Trichosporon sp.</i>				
	<i>Cryptococcus neoformans</i>	++	+	+	?
	<i>Geotrichum sp.</i>				
Mikotični abortus	<i>Aspergillus sp.</i>				
	<i>Zygomycetes (Mortierella sp.)</i>	++	+	+	+
	<i>Candida sp.</i>				
Pseudomikoze dermatofiloza aktinomikoza	<i>Dermatophilus congolensis</i>	+	++	++	++
	<i>Actinomyces bovis</i>	++	+	++	?

Najpomembnejša glivična obolenja pri prežvekovalcih so dermatofitoze, ki jih povzročajo glive iz rodu *Trichophyton*, zato govorimo kar o trihofitozah. Pri ovcah se pojavljajo redkeje, pri kozah pa le izjemoma. Pri govedu je število bolnih živali precej večje, verjetno tudi zaradi načina reje, kjer so živali med seboj v zelo tesnem stiku. Izbruh trihofitoze je čredna bolezen in jo moramo tako tudi zdraviti. Goveja trihofitoza je prav tako pomembna zoonoza, pri kateri človek zboli s podobnimi kliničnimi znaki kot pri drugih dermatofitozah.

Mikotični mastitis pri govedu navadno povzročajo kvasovke iz rodov *Candida*, *Trichosporon* in *Cryptococcus*. To so oportunistični mikroorganizmi, ki delujejo patogeno le, kadar je oslABLJENA naravna obramba gostitelja.

Kvasovke so pri govedu sicer del normalne mikroflore vimena, vendar so prisotne v zelo majhnem številu. Okužbe s kvasovkami so pogostejše pri živalih, kjer je slabša hlevska higiena in se nepravilno uporablja veliko antibiotičnih sredstev. Na mikotični mastitis je potrebno posumiti vedno, kadar je zdravljenje z antibiotiki neuspešno. V takem primeru je zelo priporočljivo odvzeti vzorce mleka za mikrobiološko preiskavo.

Mikotični abortusi so opisani predvsem pri govedu in konjih. Povzroča jih lahko vsaj 18 različnih vrst gliv, vendar so pomembne predvsem plesni iz rodu *Aspergillus* in reda

Mucorales ter kvasovke iz rodu *Candida*. Mikotičnega abortusa ni mogoče ugotoviti na podlagi klinične in pato-anatomske slike, čeprav so lahko vidne nekrotične spremembe na kotiledonih. Na plodu so včasih vidne kožne spremembe, na podlagi katerih lahko posumimo, da gre za mikotično obolenje.

Pri prežvekovalcih so znane tudi pseudomikoze, med katerimi sta pomembni aktinomikoza in dermatofiloza. Pri obeh se pojavijo značilni simptomi, vendar je bolezen potrebno laboratorijsko dokazati.

DERMATOFITOZE

TRIHOFITOZA

Dermatofitoze (ang. dermatophytoses, ringworm) pri domačih prežvekovalcih najpogosteje povzroča gliva *Trichophyton verrucosum*, redkeje pa *Trichophyton mentagrophytes* in le izjemoma *Microsporum canis*. Plesni prizadenejo le površinski, oroženeli sloj kože (*stratum corneum*), parklje in dlake.

Pojavljanje

Bolezen se pojavlja večinoma pri govedu, redkeje pa pri ovcah in kozah. Pogostejša je v zimskem času, ko so živali vhlevljene, redkejša pa poleti, ko so na paši. Ugodne razmere za izbruh trihofitoze so predvsem v vlažnih, umazanih in temnih hlevih, kjer je velika gostota živali. Teleta so bolj občutljiva za okužbo kot odrasle živali. Trihofitoza se lahko prenese tudi na druge domače živali (konje, prašiče, pse, mačke) in človeka. Ogroženi so predvsem ljudje, ki prihajajo v tesen stik z bolnimi živalmi (lastniki, molzniki, oskrbovalci živali, veterinarji).

Vir okužbe

Spore dermatofitov se v velikem številu nahajajo na obolelih mestih na koži, poleg tega pa tudi v bivalnem okolju živali (priboru za čiščenje, hlevskih stenah in opremi, stelji), oz. povsod kamor pride hlevski prah. Spore lahko mehansko prenašajo tudi insekti. Bolne živali so najpomembnejši vir okužbe, tudi v fazi, ko ni vidnih kliničnih znakov. Živali se okužujejo z neposrednim stikom ali preko okuženih predmetov. Pomemben način prenosa je tudi z lizanjem sebe in/ali drugih živali.

Spore *T. verrucosum* lahko ostanejo v kožnih ostružkih žive (vitalne) tudi več let. Zaradi dobre sposobnosti preživetja in enostavnega širjenja lahko predstavljajo vir okužbe za več generacij živali, ki so naseljene v istem hlevu. Do okužb pogosto prihaja med transportom in na razstavah živali.

Klinični potek bolezni

Po okužbi glive prodrejo do dlačnih mešičkov in oblikujejo hife, iz katerih se razvijejo artrospore. S posebnimi encimi (keratinazami) razgradijo oroženelo plast kože, ne prodirajo pa v globlja tkiva, kjer ni keratina. Poleg tega pa njihovo delovanje inhibirajo serumski proteini. Po naravni okužbi bolezen navadno prehaja skozi 4 faze: inkubacija, dozorevanje, oblikovanje kraste in regresija.

1. Faza inkubacije (od 7 do 17 dni)

Glive se hitro razmnožujejo v oroženeli plasti kože in površinskih delih dlačnih foliklov. V okolici je povečano število monocitov. Ta faza je za lastnika običajno neopazna, ker se dogaja pod plastjo dlak.

2. Faza dozorevanja (od 14 do 28 dni)

Dlake se postavijo pokonci, koža je rahlo vnetna in otekla. Okužene dlake se lomijo in nastajajo manjša brezdlačna mesta. Iz hif dozorevajo artrospore v velikem številu, predvsem vzdolž dlačnih debel in v dlačnih mešičkih (ektotrihna okužba). Kasneje glive rastejo tudi v sredini rastoče dlake in artrospore dozorevajo v dlačnem deblu (endotrihna okužba). Poškodovane dlake se lomijo in odpadajo v okolico.

3. Faza nastajanja kraste (od 28 do 49 dni)

Ko vnetna reakcija doseže vrhunec, prizadeta mesta postanejo vlažna. Koža postane luskinasta in odebeljena, na površini pa nastane čvrsta krasta azbestne barve, ki jo sestavljajo epitelne celice, vnetni eksudat in hife gliv. Spremembe na drugih mestih telesa (satelitske spremembe) lahko nastajajo še 30 do 40 dni po primarni okužbi.

4. Faza regresije (od 49 do 63 dni)

Kraste potemnijo in začnejo odpadati. Dlačni mešički v sredini spremembe se regenerirajo in dlaka začne ponovno rasti.

Med razvojem bolezni glive izločajo v tkivo razne encime in tako sprožijo vnetni proces. Bolezen je navadno samoozdravljiva, vendar sta potek in trajanje lahko zelo različna. V nekaterih primerih lahko živali ozdravijo že po treh tednih, pri hudih oblikah (posebno še, če se pojavi tudi sekundarna okužba) pa je potek bistveno težji in lahko traja tudi nekaj mesecev. Živali, ki bolezen prebolijo, navadno razvijejo zadovoljivo imunost.

Klinični znaki

Za bolezen so posebej dovzetna teleta do enega leta starosti, vendar lahko zbolijo vse živali, ne glede na starost, spol, pasmo ali kategorijo. Bolj so dovzetne živali v temnih in vlažnih hlevih, posebej še, če so prenaseljeni in živali prihajajo v zelo tesen stik. Trihofitoza je tipična

čredna bolezen in se na nekaterih posestvih lahko pojavlja tudi več let. Spremembe se lahko pojavijo kjerkoli na telesu, vendar pogosteje na določenih področjih:

- na čelu
- okrog oči (značilni izgled, kot da nosijo očala)
- na tilniku in vratu
- na robovih uhljev
- na ledvenem področju in na korenu repa

V prvi fazi bolezni, ko pride do zadebelitve kože in začetka vnetja, navadno ne opazimo nobenih sprememb. Kasneje so vidne okrogle, pogačaste zadebelitve oz. kraste, ki imajo azbestozni izgled. Število sprememb je različno, navadno več kot 10. Velikost variira od 0,5 do 10 cm v premeru, prizadeta površina pa največkrat meri okrog 1-3 cm². Kadar so spremembe številne, prehajajo ena v drugo in oblikujejo obsežna krastava področja. Spremembe običajno niso srbeče. Včasih se bolezen opazi šele, ko se pojavijo brezdlačna mesta. Prizadete dlake se polomijo, vendar zaradi ohranjenega dlačnega mešička kmalu začnejo izraščati nove, običajno najprej iz centra spremembe. Če svežo krasto poskusimo odstraniti, površina kože rahlo zakrvavi, lahko pa je prisoten tudi gnojni izcedek. Koža se po preboleli bolezni popolnoma obnovi in vrne v prvotno stanje.

Ovce. Klinični znaki so podobni kot pri govedu. Spremembe se pojavijo predvsem okrog ust, na licih, okrog oči, na ušesih in na distalnih delih nog. Volna in parklji navadno niso prizadeti. V napredujočem stadiju so znaki bolezni zelo podobni kot pri kožnem ektimu ali garjavosti.

Koze. Pri kozah se pojavijo brezdlačna mesta in krastaste spremembe, podobno kot pri teletih, zajamejo pa predvsem uhlje, glavo in vrat.

Diagnostika

Sum na trihofitozo postavimo na podlagi prisotnosti tipičnih okroglih pogačastih krast, vendar je diagnozo nujno potrebno potrditi z mikroskopsko preiskavo kožnih ostružkov oz. dlake. Vzorce je potrebno odvzeti na robu sprememb, po možnosti na več različnih mestih. Zelo priporočljivo je, da pred odvzemom vzorca področje umijemo z milom in vodo in ga osušimo, ker tako zelo zmanjšamo število saprofitnih plesni, ki lahko zelo motijo preiskavo.

Za **mikroskopsko preiskavo** je potrebno predhodno namakanje tkiva v keratinolitičnih pripravkih (KOH, laktofenol), ob rahlem segrevanju. Vzorec najprej pregledamo pri 100 ali 200-kratni povečavi, nato pa lahko tudi pri večji. Na okuženih dlakah so vidne številne hife plesni in značilne artrospore v daljših ali krajših verigah, lahko pa tudi posamezne spore.

Za **gojiščno preiskavo** uporabimo Sabouraudov dekstrozni agar z dodatkom antibiotika in cikloheksimida (aktidiona) in inkubiramo pri 37°C. Kolonije *T. verrucosum* sicer rastejo dokaj počasi, vendar jih pod mikroskopom lahko opazimo že po nekaj dneh. Delček kolonije suspendiramo v laktofenolu in pregledamo pod mikroskopom pri 100-kratni povečavi. Tako lahko opazimo razvejane hife, ki segmentirajo in oblikujejo značilne verige klamidospore, ki imajo obliko ogrlice. Klamidospore so značilne samo za *T. verrucosum*, zato na njihovi podlagi lahko postavimo končno diagnozo.

Diferencialna diagnoza

Klinična slika je dokaj značilna, vendar se s podobnimi znaki lahko kažejo tudi druge dermatoze, npr. bakterijske okužbe, garje, tumorji, alergijske reakcije in dermatofiloza. Zaradi tega je za potrditev diagnoze vedno potrebna mikroskopska in gojiščna preiskava.

MIKOTIČNI MASTITIS

Uvod

Mikotični mastitis navadno povzročajo kvasovke, ki pripadajo rodovom *Candida*, *Cryptococcus* in *Trichosporon* ter drugi mikroorganizmi, ki predstavljajo normalno mikrofloro kože vimena in seskov, oz. saprofitno floro hlevskega okolja. Približno tri četrtine vseh mikotičnih mastitisov povzročajo kvasovke iz rodu *Candida*, predvsem *C. kefyr* (sinonim *C. pseudotropicalis*), *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei* in *C. parapsilosis*.

Večinoma so oportunistične glive in povzročajo bolezen le, ko je oslabljena naravna odpornost gostitelja. Nekatere od njih pa so odporne proti fagocitozi in lahko povzročijo mastitis tudi pri sicer zdravih živalih. Pogostejše zbolijo živali, ki imajo poškodovane seske (npr. zaradi molznega stroja) ali so zdravljene z antibiotiki. Kvasovke povzročajo približno 1-4% vseh mastitisov, na nekaterih rizičnih gospodarstvih pa lahko celo do 25%.

Klinični znaki

Mikotični mastitisi imajo pogosto blag potek in večkrat preminejo sami. Najpogostejše se pojavijo po topikalnem zdravljenju mastitisa (po aplikaciji antibiotikov v seskov kanal). Znaki se običajno pojavijo 5-8 dni po zdravljenju vimena, lahko pa že drugi dan ali izjemoma šele po 10-12 dneh. V akutni fazi se pojavi vročina, izguba apetita in oteklina vimena. Mleko je sivo-belo, bolj viskozno in kosmičasto.

Akutna faza lahko zelo hitro preide v kronično, ki ima navadno subklinični potek. Živali navadno ozdravijo v 2-4 tednih, kvasovke pa se lahko izločajo še več tednov oz. mesecev.

Cryptococcus neoformans povzroča mastitis le redko, vendar gre pogosto za težje oblike z velikimi finančnimi izgubami. Klinični znaki se lahko kažejo z blago oteklino ene ali več

vimenskih četrti, ali pa z obsežno oteklino in prizadetostjo vimenskega tkiva. Živali očitno trpijo, hodijo počasi in stojijo s široko razprtimi zadnjimi nogami. Temperatura zmerno naraste, potek pa je podoben kot pri akutnem bakterijskem mastitisu. Količina mleka močno upade ali se izločanje celo ustavi, zmanjšana je lahko tudi v ostalih četrtih. Mleko je sivo-belo, viskozno ali sluzasto, lahko tudi vodeno s kosmiči.

Diagnoza

Pojav mastitisa po antibiotičnem zdravljenju je pomemben podatek za sum na glivične povzročitelje. Diagnoza je možna le na podlagi mikrobiološke preiskave, ki jo je priporočljivo tudi ponoviti. Direktna mikroskopska preiskava izločka je zelo pomembna, ker so kvasovke zaradi svoje velikosti in oblike navadno zelo dobro in jasno vidne.

MIKOTIČNI ABORTUS IN VAGINITIS

Mikotični abortusi so bili do leta 1950 le redko omenjeni, kasneje pa se je število poročil zelo povečalo. Do abortusa navadno pride zaradi patogenega delovanja gliv na posteljico in posledično tudi na plod. Povzročajo ga različne glive, predvsem iz rodov *Aspergillus* (*A. fumigatus* več kot 60% vseh primerov), *Mucor*, *Rhizomucor*, *Rhizopus*, *Pseudallescheria*, *Candida* ipd.

Pojavljanje in epidemiologija

Mikotični abortusi so znani pri govedu, konjih in prašičih, ki so verjetno bolj dovzetni za okužbo. Pogostejši so v zimskih mesecih, od decembra do maja. Spore so lahko prisotne v velikem številu v naravnem okolju (hrana, stelja, razpadajoče organske snovi, zemlja, zrak), živali pa se okužijo predvsem s hrano in vdihavanjem. Iz prebavil in dihal se spore hematogeno lahko prenesejo do placent. Glive se razvijajo na kotiledonih in povzročijo prekinitev prenosa snovi med posteljico in plodom, kar vodi v abortus. Mikotični abortusi niso nalezljivi in kasneje ne vplivajo bistveno na plodnost živali.

Klinični znaki

Abortus se lahko pojavi med drugim in devetim mesecem brejosti, večinoma pa med sedmim in devetim mesecem. Krava navadno ni splošno prizadeta, ker so spremembe omejene le na posteljico, plodove ovojnice in na plod. Kasneje se lahko prehodno pojavijo kožne spremembe (premera 8-20 mm), ki spominjajo na trihofitozo.

Diagnoza

Zaradi neznačilnega poteka bolezni diagnoza večinoma ostane nepojasnjena. Na mikotični vzrok posumimo, kadar se pojavljajo sporadični abortusi z nekrotičnimi spremembami na

kotiledonih in koži plodu. Pri mikroskopski preiskavi prizadetega tkiva so vidne hife plesni ali celice kvasovk (s hifami ali brez). Za končno diagnozo je nujna gojiščna preiskava na Sabouraudovem dekstroznem agarju z antibiotiki, vendar **brez** aktidiona. Zelo priporočljiva je tudi pato-anatomska preiskava. Odrežemo košček prizadetega kotiledona ali kože plodu, lahko pa tudi stene sirišnika. Mikroskopsko so vidne hife, obdane s polimorfonuklearnimi eozinofilci.

MIKOZE PRI KONJIH

Tabela 4: Pregled najpomembnejših mikoz pri konjih

Mikoza	Povzročitelj	Pojavljanje	Patogenost
Dermatofitoze trihofitoza	<i>T. equinum</i>	+++	+++
	<i>T. verrucosum</i>	+	+
	<i>T. mentagrophytes</i>	++	+++
	<i>T. ajelloi</i>	+++	0
Mikrosporoza	<i>M. canis</i>	+	++
	<i>M. equinum</i>	++	++
	<i>M. gypseum</i>	+	+
Sistemske mikoze	<i>Candida sp.</i>	+	+
	<i>Aspergillus sp.</i>	+	+
	<i>Cryptococcus neoformans</i>	+	++
	<i>Histoplasma farciminosum</i>	+	+++
	<i>Mucor</i>	+	+
	<i>Absidia</i>	+	+
Pseudomikoz dermatofiloza	<i>Dermatophilus congolensis</i>	++	++

Pri konjih se poleg dermatofitoz pojavljajo tudi podkožne in sistemske mikoze, npr. sporotrihoza, mukormikoza, rinosporidioza, kriptokokoza in epizootski limfangitis, vendar so v zahodni Evropi manj pogoste. Nasprotno pa je vedno več primerov psevdomikoz (npr. dermatofiloza), ki se pojavljajo po posameznih področjih Evrope bolj pogosto.

DERMATOFITOZE

Podobno kot pri prežvekovalcih, so tudi pri konjih najpogostejše glivične bolezni dermatofitoze, ki jih povzročajo glive iz rodov *Trichophyton* in *Microsporum*. Povzročajo

podobne klinične spremembe z okroglimi brezdlačnimi mesti. Na podlagi klinične slike ni mogoče predvideti povzročitelja, ker lahko različne glive povzročajo enake spremembe in enake glive lahko povzročajo različne spremembe.

TRIOFITOZA



Med patogenimi glivami v rodu *Trichophyton* je najpomembnejši *T. equinum*, ki povzroča vlažne spremembe in je najpogostejši konjski dermatofit. Okužba se redko prenaša na ljudi. *T. mentagrophytes* povzroča bolj gnojno obliko obolenja z majhnimi eksudativnimi spremembami. *T. verrucosum* povzroča spremembe s krastami, ki med seboj konfluirajo.

Pojavljanje

T. equinum se pojavlja pri konjih, oslih, mulah in le izjemoma pri psih. Pojavlja se po vsem svetu, predvsem pa po Evropi, ZDA, Južni Ameriki in Afriki. Okužijo se predvsem konji, ki živijo v čredah in prihajajo med seboj v tesen stik. Različne pasme so različno občutljive za okužbo. Pogostejše zbolijo žrebeta in mlajše živali, več primerov pa je predvsem jeseni in pozimi.

Vir okužbe

Do okužbe s *T. equinum* pride, ko se na kožo živali naseli zadostno število infektivnih spor. Najpogostejši način okužbe je z neposrednim stikom z bolno živaljo, z okuženo dlako in krastami. Poškodovana koža je mnogo bolj dovzetna za okužbo. Konji se pogosto okužijo tudi s priborom za čiščenje, sedli in odejami, pri valjanju po tleh ali drgnjenju ob različne predmete. Med znojenjem se sprošča večje število spor, kar omogoča lažje širjenje.

Do okužbe s *T. verrucosum* pride, kadar so konji v stiku z okuženim govedom, npr. ko bivajo v istem hlevu ali so na skupnem pašniku.

Predispozicijski faktorji

Zdrava koža konja normalno ni dovzetna za okužbo z dermatofiti. Do okužbe pride, kadar je prisoten vsaj eden ali več predispozicijskih faktorjev. Bolezen se pogosteje pojavi v vlažnem in toplem vremenu, ob slabem higienskem stanju živali in hleva, kadar so že prisotne druge kožne bolezni ali je žival dlje časa zdravljena z antibiotiki. Predilekcijska mesta so pod sedlom, nato se spremembe širijo na boke, prsi trup, vrat in glavo.

Klinična slika

T. equinum prodre skozi dlačni folikel in se razširi po povrhnji plasti kože. V prvi fazi koža rahlo zadebeli, vendar sprememba ostane komaj vidna. Prvi znak je lomljenje in izpadanje dlake in nastanek drobnih brezdlačnih mest, ki so lahko pokrita s krastami. Prizadete dlake se zlahka izpulijo. Spremembe lahko variirajo od drobnih vzbrsti (podobnih urtikariji), površinskih sprememb do globokih ulcerativnih vozličev. Ko se spremembe pozdravijo oz. kraste odpadejo, so vidne rožnate do sive zaplate. Kadar so živali preobčutljive na glivične toksine lahko pride do oteklina, gnojenja in nekroz. Dermatofitozno obolenje lahko traja 4-8 tednov, nastanek pridobljene imunosti pa prepreči nadaljnje širjenje sprememb.

Okužba s *T. mentagrophytes* je pri konjih redka, navadno pa se pojavlja v dveh oblikah.

Miliarna oblika. Pojavijo se drobne eksudativne spremembe (3-4 mm v premeru) in so razširjene po vsem telesu. Koža je pokrita z drobnimi krastami in luskinami in se rahlo svetlika. Kraste so rjavo-sive barve in po 8-10 dneh odpadejo. Zdravljenje s ponovno rastjo dlake traja 5-7 tednov.

Gnojni kerion. Taka oblika je zelo redka, povzroča jo *T. verrucosum*, zbolijo pa konji, ki se pasejo skupaj z govedom. Prizadeta so predvsem področja, ki pridejo v stik s sedlom in komatom oz. drugo opremo. Na koži so vidne goline, ki med seboj konfluirajo, prekrite pa so z oblogami nepravilnih oblik oz. sivimi mehкими krastami.

MIKROSPOROZA

Najpomembnejši dermatofiti iz rodu *Microsporum* so *M. equinum*, *M. canis* in *M. gypseum*, ki povzročajo suhe, običajno negnojne oblike dermatofitoz. *M. gypseum* je geofilni dermatofit, kar pomeni, da živi in se razmnožuje v zemlji, odkoder se okužujejo živali in ljudje. Spore lahko prodrejo v kožo preko drobnih razpok in ranic, zaradi pikov insektov. Prizadeta mesta merijo 2-3 cm v premeru, dlake najprej stojijo pokonci, nato se polomijo in odpadejo. Žrebički lahko spontano ozdravijo po 5-6 tednih.

Diagnoza

Klinična slika dermatofitoz je sicer značilna, vendar ne zadošča za zanesljivo ločevanje od ostalih kožnih bolezni. Preiskava z Woodovo svetilko je omejeno uporabna, ker fluorescirajo le nekateri sevi *M. canis* in *M. equinum*.

Mikroskopska preiskava je zelo uporabna za ugotavljanje artrospor v dlakah in kožnih ostružkih. Vzorec je predhodno potrebno namakati v keratinolitičnih pripravkih (laktofenol,

KOH), da se razmehča in spore očistijo. Artrospore in hife, ki so vidne v in okrog dlačnega debla zadoščajo za končno diagnozo.

Gojiščna preiskava. Kadar želimo natančno ugotoviti vrsto povzročitelja je vedno potrebna gojiščna preiskava. Prizadeto mesto je potrebno pred odvzemom vzorca očistiti (oprati) in osušiti, da odstranimo čimveč kontaminantov.

PODKOŽNE MIKOZE

Pri konjih se pojavljajo tudi podkožne mikoze, med katerimi so pomembne predvsem rinosporidioza, pitioza, zigomikoze in sporotrihoza. Ker se v Evropi pojavljajo le izjemoma, jih na tem mestu ne bomo posebej obravnavali.

SISTEMSKE MIKOZE

KANDIDOZA

Kandidoza (kandidiaza) je pri konjih razmeroma redka in se pojavi največkrat po dolgotrajnem antibiotičnem zdravljenju. Opisani so primeri okužbe materničnega vratu in maternice pri kobilah ter sekundarne okužbe ran. Znani so tudi primeri pneumomikoz, ki jih povzročajo *Candida albicans*, *C. tropicalis* in *C. kefyr*. Žrebeta so mnogo bolj dovzetna za okužbo kot odrasle živali. Kandidioza se lahko pojavi tudi pri tuberkuloznih živalih.

ASPERGILOZA

Pri konjih aspergilozo povzročajo različne glive iz rodu *Aspergillus*, najpogostejši pa je *A. fumigatus*. Gliva je odporna proti povišanim temperaturam in spore dobro preživijo v kompostu, vlažnem senu in stelji, zato so to pomembni viri okužbe za živali.

V umazanih hlevih je v zraku ogromno spor različnih drugih plesni (*Alternaria*, *Penicillium*, *Scopulariopsis*), ki so lahko patogene ali alergene. Pri pokladanju plesnivega sena lahko konji pri vsakem vdihu inhalirajo več milijonov spor. Pri konjih so znane 4 oblike aspergiloze: pljučna aspergiloza, aspergiloza zračnega mehurja, mikotični abortus in mikotični keratitis.

Pljučna aspergiloza se pri konjih kaže z netipičnimi znaki, kot so kašljanje, oteženo dihanje, rahlo povišana temperatura in zmanjšan apetit. Na podlagi teh znakov ni mogoče posumiti na aspergilozo, oz. jo ločiti od drugih respiratornih obolenj.

Mikoza zračnega mehurja. Pri konjih je Evstahijeva cev povezana z nazofaringealno votlino in srednjim ušesom. Zračni mehur leži na dorzalni strani faringealne votline in predstavlja izboklino Evstahijeve cevi. Kadar živali jedo in požirajo je ta povezava odprta, zato včasih pride do okužbe z *A. fumigatus* in *A. nidulans*. Če je okuženo področje blizu cervikalne arterije, lahko pride do poškodbe njene stene in živali krvavijo iz nosu. Poškodovani so lahko tudi živci in pride do faringealne paralize.

Mikotični abortus, ki ga povzročajo glive iz rodu *Aspergillus* ima podobne značilnosti kot pri govedu, vendar je pri konjih bistveno manj pogost.

Mikotični keratitis pri konju povzročajo glive iz rodov *Aspergillus*, *Fusarium*, *Allescheria* in *Candida*. Pojavlja se predvsem po dolgotrajnem lokalnem zdravljenju s kortikosteroidi.

KRIPTOKOKOZA

Pri konjih je znana respiratorna oblika kriptokokoze, ki jo povzroča kvasovka *Cryptococcus neoformans*. Prizadene predvsem nosne sinuse, kjer pride do močne otekline in celo do obstrukcije. Okužba je razmeroma redka, vendar nevarna, ker se lahko razširi tudi na pljuča, kosti in meninge. Pljučna oblika se večkrat pojavi pri živalih s tuberkulozo. Klinični znaki so nespecifični, opazen je le rahel bronhitis, povišana temperatura in kašelj.

EPIZOOTSKI LIMFANGITIS

Epizootski limfangitis je kronična kužna bolezen limfnih žil, ki jo povzroča gliva *Histoplasma farciminosum* in se pojavlja predvsem pri ekvidih. Pogostejša je bila v mediteranskih državah in Vzhodni Evropi, vendar je s sistematičnim zatiranjem in izločanjem okuženih živali po drugi svetovni vojni postala skoraj nepomembna. Pri prenosu bolezni so pomembni tudi insekti. Inkubacijska doba traja približno 3 mesece, zato se pogosteje pojavlja jeseni.

Orientacijsko diagnozo postavimo na podlagi kožnih vozličev (limfadenitis, limfangitis). Diagnozo potrdimo na podlagi mikroskopske in gojiščne preiskave za dokaz prisotnosti *H. farciminosum*.

MIKOZE PRI PRAŠIČIH

Pri prašičih ugotavljamo glivične bolezni bistveno redkeje kot pri ostalih vrstah domačih živali.

Tabela Najpomembnejši povzročitelji mikoz pri prašičih

Mikoza	Povzročitelj	Pojavljanje	Patogenost
Dermatofitoze mikrosporoza	<i>M. nanum</i>	+	+
	<i>M. canis</i>	+	++
trihofitoza	<i>T. mentagrophytes</i>	+	+
Okužbe s kvasovkami	<i>Candida albicans</i>	++	+++
	<i>Candida slooffii</i>	+++	++
Pseudomikoze aktinomikoza	<i>Actinomyces sp.</i>	++	++

DERMATOFITOZE

Dovzetni so za okužbo z nekaterimi vrstami dermatofitov, predvsem z geofilnima vrstama *M. nanum* in redko z *M. gypseum*. Zelo izjemoma pride do okužbe z drugimi dermatofiti, npr. *M. canis* in *T. mentagrophytes*, predvsem kadar so v stiku z okuženimi glodalci ali domačimi mesojedi in tudi človekom.

Klinični znaki

Na koži se najprej pojavijo majhne okrogle rdeče lise, ki se koncentrično povečujejo in dosežejo velikost 2-10 cm v premeru. Na površini se naredi tanka rjava krastica, ki se kmalu odlušči in odpade. Pri mlajših živalih je običajen akutni, pri starejših pa kronični potek bolezni. Spremembe se lahko pojavijo po celem telesu, pogosteje pa po trupu, hrbtu in uhljih. Podatki glede srbenja so zelo nasprotujoči, saj nekateri avtorji poročajo o hudem srbenju s praskanjem, drugi pa menijo, da so spremembe popolnoma nesrbeče.

Diagnoza

Klinične spremembe pri prašičih so manj izrazite kot pri ostalih živalih, zato so za potrditev diagnoze vedno potrebni laboratorijski testi (mikroskopska in gojiščna preiskava vzorca kože oziroma dlake).

KANDIDOZA

Kandidoza pri prašičih je omejena predvsem na prebavni in redkeje dihalni sistem, običajno pa jo povzročata *C. albicans* in *C. slooffii*. Značilne so belo-rumene obloge v ustih in na tonzilah ter močno povečano število kvasovk v prebavnem traktu.

C. slooffii je najpogosteje izolirana kvasovka pri prašičih, vendar pa okužbe in klinične spremembe večkrat povzroča bolj patogen *C. albicans*. Bolj dovzetni so predvsem mlajši pujski. Kandidate lahko izoliramo iz blata pujskov že kmalu po rojstvu (2 tedna). Do okužbe pride zaradi različnih predispozicijskih faktorjev, najpogosteje pa zaradi dolgotrajnega antibiotičnega zdravljenja ali visoke vsebnosti glukoze in maltoze v krmi.

Klinična slika

Pujski so izčrpani in zaspani, zaradi slabe ješčnosti se zmanjša prirast. Dlaka je nasršena, koža pa ima umazano rjav videz. Pri mnogih se pojavi svetlo rumena, vodena driska. Tonzile so prekrite s filmom, svetle krem barve, predvsem na vrhu in ob straneh. Če film poskusimo odstraniti, lahko povzročimo rahlo krvavenje.

Diagnoza

Na bolezen posumimo na podlagi tipičnih sprememb v ustih in na tonzilah ter mikroskopske preiskave oblog. Razmaz vzorca obarvamo z metilenskim modrilom in gledamo pod mikroskopom pri srednji povečavi. V pozitivnem vzorcu vidimo kratke hife, kvasovke z brsti in nekrotizirane celice.

MIKOZE PRI PSIH IN MAČKAH

Med vsemi domačimi živalmi najpogosteje ugotavljamo mikotična obolenja pri mesojedih, predvsem psih in mačkah.

Tabela 5: Najpogostejši povzročitelji mikoz pri psih in mačkah

Mikoza	Povzročitelj	Pojavljanje		Patogenost	
		psi	mačke	psi	mačke
Dermatofitoze	<i>M. canis</i>	+++	+	+++	++
	<i>M. gypseum</i>	++	++	++	++
	<i>T. mentagrophytes</i>	++	++	+++	+++
	<i>Trichophyton sp.</i>	+	+	++	++
Okužbe s kvasovkami					
Kandidoza	<i>Candida sp.</i>	++	++	+	+
Malasezioza	<i>Malassezia pachydermatis</i>	+++	+++	+	+
Kriptokokoza	<i>Cryptococcus neoformans</i>	+	+	+++	+++
Okužbe z dimorfnimi glivami					
Sporotrihoza	<i>Sporothrix schenckii</i>	+	+	++	++
Histoplazmoza	<i>Histoplasma capsulatum</i>	+	+	+++	+++
Pseudomikoze					
nokardioza	<i>Nocardia asteroides</i>	+	+	++	++
aktinomikoza	<i>Actinomyces viscosus</i>	+	+	++	++

Najpomembnejše so dermatofitoze, ker se pojavljajo najpogosteje in ker domači mesojedi predstavljajo pomemben vir okužbe za ljudi. Narašča tudi število okužb s kvasovkami, kar je verjetno posledica povečane porabe antibiotičnih zdravil, imunosupresivnih sredstev, citostatikov in drugih zdravil, ki so v mali praksi postala nepogrešljiva. Občasno se pojavljajo tudi sistemske mikoze, kot so histoplazmoza, kriptokokoza in sporotrihoza ter pseudomikoze.

DERMATIFITOZE

MIKROSPOROZA

Mikrosporoza, ki jo povzroča *M. canis*, je najpogostejša oblika dermatofitoze pri psih in mačkah ter pri ljudeh. Zbolijo lahko tudi številne druge vrste domačih živali in živali v živalskih vrtovih (opice, jaguarji, tigri itd.) ter kunci in glodalci.

Bolezen se pojavlja enzootično v rejah mačk. Zbolijo predvsem mlade muce, predvsem dolgodlakih pasem. Mnoge okužene živali ne kažejo znakov bolezni in znano je, da ima spore

na kožuhi približno 10-20% klinično zdravih mačk in 5% psov. Bolezen je zelo nalezljiva in se v populaciji hitro širi, kar posredno povečuje tudi nevarnost za ljudi.

Klinični znaki

Bolezen pri psih prepoznamo po značilnih brezdlčnih mestih, ki sprva izgledajo kot postrizena. Koža je lahko rahlo zadebeljena ali pokrita s tanko krasto. Kasneje na prizadetem mestu navadno odpadejo vse dlake, spore pa se lahko razširijo po vsej površini telesa.

Pri mačkah mikrosporozo povzroča *M. canis*, le v približno 1% *M. gypseum*. Spremembe se pojavijo večinoma na glavi, ušesih, repu, tačkah in včasih po celem telesu. Prizadeta mesta večinoma niso srbeča, kljub temu pa jih mačke včasih ližejo ali praskajo. Spremembe se lahko kažejo zelo različno in ločimo predvsem naslednje oblike:

- Živali nimajo kliničnih znakov, vendar dlaka fluorescira pod Woodovo svetilko, oz. dokažemo povzročitelja z gojiščno preiskavo
- Pigmentirana področja z lokalnimi alopecijami oz. polomljenimi dlakami
- Spremembe s sivimi krastami, polomljeno dlako in vlažno, pordelo kožo
- Številne kraste po vsem telesu, brez izrazitega izpadanja dlake
- Onihomikoza (mikoza nohtov in okolnega tkiva)

Pri psih se približno 10-15 dni po okužbi pojavijo okrogla brezdlčna mesta, velikosti približno 1-4 cm v premeru. Dlake so polomljene oz. izpadle. V sredini spremembe so vidne drobne luskinice kože, robovi pa so rahlo zažarjeni. Posamezne spremembe se lahko dotikajo ali prehajajo ena v drugo, vendar robovi krožnih sprememb ostanejo vidni. Živali lahko spontano ozdravijo, vendar jih je zaradi preprečevanja širjenja bolezni v vsakem primeru priporočljivo zdraviti.

Diagnoza

Klinična preiskava, vključno z Woodovo svetilko in mikroskopska preiskava so dobre orientacijske metode, vendar so premalo zanesljive za dokončno diagnozo, posebno še, če so rezultati teh preiskav negativni. Zato je v vsakem primeru zelo priporočljiva gojiščna preiskava, s katero izoliramo povzročitelja in ga determiniramo do vrste.

TRIOFITOZA

V večini primerov trihofitoz je povzročitelj *T. mentagrophytes*, ki je lahko patogen za vse vrste domačih živali in človeka. *T. mentagrophytes* ima med vsemi dermatofiti najširši spekter možnih gostiteljev, vir okužbe pa večinoma predstavljajo glodalci. V Sloveniji je v

zadnjih nekaj letih število trihofitoz pri mesojedih izredno naraslo, kar pripisujemo povečani populaciji glodalcev in kuncev v številnih gospodinjstvih, kjer živijo v tesnem sožitju z drugimi živalmi in ljudmi.

Klinična slika

Trihofitoza se pri psih pojavlja v obliki krastastih in luskinastih sprememb. Prizadeto je predvsem področje glave, vratu in okončin, odkoder se povzročitelj lahko razširi po vsem telesu. V prvi fazi bolezni se pojavijo vezikule in pustule. Vneta mesta so okrogla in pordela, z rahlo oteklimi robovi in pokrita s krasto. Pri generalizirani obliki so vidne številne luskinaste spremembe. Izjemoma se pojavi okužba krempljev.

Pri mačkah je okužba večinoma omejena na glavo, vrat in sprednji del prsi, spremembe pa so lahko podobne kot pri garjavosti.

Diagnoza

Zaradi nespecifičnih kliničnih znakov je vedno potrebna gojiščna preiskava, s katero izoliramo morebitnega povzročitelja in ga determiniramo do vrste.

OKUŽBE S KVASOVKAMI

KANDIDOZA

Kandidoza (kandidiaza) je pri mesojedih navadno lokalizirano obolenje (predvsem kože in sluznic), ki ga povzročajo kvasovke iz rodu *Candida*, najpogostejši povzročitelj pa je *Candida albicans*. *C. albicans* lahko najdemo v manjšem številu pri zdravih živalih na sluznicah nosu in žrela, prebavnega trakta in sluznicah zunanjih delov spolnih organov. Do močnejše okužbe in obolenja pride navadno zaradi padca splošne odpornosti gostitelja (druge bolezni ali aplikacija imunosupresivnih zdravil), aplikacije antibiotikov ali pa zaradi lokalnih poškodb sluznice (npr. kateter).

Pri mačkah je kandidoza manj pogosta, lahko pa se pojavi na ustni sluznici in zgornjih dihalih, opisani pa so primeri pitoraksa (gnojnega vnetja prsne votline), okužbe očesnih veznic in urinarne trakta. Pri psih lahko povzroča okužbe ran na koži in sluznicah, sodeluje pri vnetju zunanjega sluhovoda oz. kože.

Klinični znaki

Znaki so različni in nespecifični, običajno pa so zabrisani z znaki primarnega vzroka bolezni. Bolezen se pri živalih in človeku lahko pojavlja v številnih različnih oblikah, v splošnem pa se kandidate lahko naselijo na vsak organ. Najpogosteje prizadane sluznice in vlažne oz. mehke

dele kože. Na okuženih sluznicah se pojavijo tanke bele obloge, mlečnega oz. sirastega videza. Tkivo je vneto, sluznica pordela in poškodovana, kar omogoča kvasovkam prodiranje v globlja tkiva.

Spremembe v ustih so podobne, pojavljajo pa se predvsem na robu ustnic, notranji steni lic in na jeziku. Slina vsebuje sivo, smrdljivo sluz. Kožna oblika kandidoze se kaže kot folikulitis. Spremembe so vlažne in rdeče, ponekod so vidne razjede. Pojavljajo se tudi vezikule in papule, prekrte z belimi ali svetlo rjavimi krastami. Kožne spremembe so navadno posledica ustne, analne ali vaginalne oblike. Pri vaginalni obliki je sluznica prekrita z belimi oblogami, živali pa imajo bel ali kremast smrdljiv izloček. Kandidate lahko povzročajo tudi vnetje zunanjega sluhovoda in obnohtnih tkiv (perionihomikoze).

Diagnoza

Kvasovke so v manjšem številu lahko prisotne na sluznicah in v prebavnem traktu ljudi in živali, zato izolacija posameznih kolonij še ne pomeni okužbe. O klinični okužbi govorimo, kadar z mikroskopsko preiskavo ugotovimo številne hife in kvasovke, z gojiščno preiskavo pa izoliramo številne značilne kolonije.

Mikroskopska preiskava

Ostružek ali bris prizadetega tkiva lahko gledamo direktno ali pa ga predhodno obdelamo s KOH. V pozitivnem vzorcu so vidne številne majhne, okrogle ali ovalne celice (kvasovke z brsti), različnih velikosti (premera 2-5 μm) in kratke hife. Če razmaz pobarvamo po Gramu, se kvasovke obarvajo temno vijolično.

Gojiščna preiskava

Za izolacijo in dokončno determinacijo kvasovke je potrebna gojiščna preiskava. *C. albicans* raste na Sabouraudovem dekstroznem agarju v obliki belih mazavih in svetlečih kolonij, neprijetnega vonja.

MALASEZIOZA

Uvod

Kvasovke iz rodu *Malassezia* so že več kot stoletje znane kot del kožne mikroflore pri ljudeh in različnih vrstah živali. Od odkritja do danes so jim pripisovali različne vloge in jih poimenovali z različnimi sinonimi. Prve raziskave na živalih je opravil Wiedman leta 1925, ko je opisal ovalno, lipofilno kvasovko in jo poimenoval *Pityrosporum pachydermatis* oz. *P. canis*, v zadnjem času pa se uporablja ime *Malassezia pachydermatis*.

Kvasovke iz rodu *Malassezia* so prilagojene na kožo toplokrvnih živali, zato jih najdemo pri ljudeh, toplokrvnih živalih in pticah. V rodu je trenutno 8 vrst (število se neprestano

povečuje), vendar je za mesojede pomembna le vrsta *M. pachydermatis*, za mačke pa tudi *M. sympodialis*.

Odnos med gostiteljem in kvasovko

M. pachydermatis lahko v omejenem številu naseljuje kožo in sluznice zdravih živali. Kadar so prisotne, jih lahko izoliramo iz dlačnih mešičkov in okolnih kožnih luskinic. Pogosto jih najdemo v analnem področju, zunanjem sluhovodu, ustničnih gubah, pazduhah, dimljah in med prsti. Redkeje pa jih najdemo na koži trupa, kjer so le manjšem številu. Na koži imajo verjetno podoben status kot bakterija *Staphylococcus intermedius*, s katero živijo v simbiozi. *S. intermedius* namreč izloča snovi, ki spadajo v skupino vitaminov B kompleksa (tiamin), ki ga kvasovke potrebujejo za rast. Oboji pa izločajo lipaze, kar jim omogoča dobro izkoriščanje kožnih maščobnih snovi, hkrati pa onemogoča rast drugih mikroorganizmov, predvsem drugih gliv. Tudi na umetnih gojiščih je rast kvasovk boljša, če so prisotni stafilokoki. Ni pa znane simbioze med vrsto *M. pachydermatis* in zajedalci iz rodu *Demodex*.

Dejavniki, ki povzročajo virulenco kvasovk še niso dobro raziskani. Izločajo lipaze in lipoksigenaze, kar jim omogoča izkoriščanje maščobnih snovi, pri tem pa pride do spremenjenega razmerja med posameznimi maščobnimi kislinami. V celični steni kvasovk je toksin cimogen, ki v organizmu gostitelja aktivira komplement, pri tem pa pride do vnetja in srbenja kože. Toksinu pripisujejo odgovornost za preobčutljivostne reakcije.

M. pachydermatis živi na koži kot komenzal, v primeru padca odpornosti gostitelja pa razvijejo svoje infektivne sposobnosti in povzročijo nastanek bolezni. V takem primeru se na obolenem mestu močno namnožijo, stanje pa se po antimikotični terapiji izboljša.

Za obolenje je pomembna pasemska predispozicija živali, ki je zelo izrazita pri belih višavskih terierjih (prirojena epidermalna displazija), kodrih, basetih, španjelih in po nekaterih podatkih tudi pri nemških ovčarjih. Bolezen je pogostejša v poletnih mesecih, ko sta temperatura in vlažnost zraka povečana.

Klinični znaki

V zgodnji fazi bolezni je najprej opazen srbež različnih stopenj in bolj ali manj izrazite rdečine na koži. Sledi luščenje kože, izpadanje in lomljenje dlake, hiperpigmentacija in lišajavost. Psi **z generalizirano** obliko malasezioze imajo značilen neprijeten vonj po kvasu in vnetih razkrojkah. Lahko pride tudi do folikulitisa in naknadne bakterijske okužbe. Kvasovke se pogosteje namnožijo tudi na tistih delih telesa, kjer je površina bolj vlažna in mastna. Na koži med prsti lahko povzročajo srbeče vnetje, znane pa so tudi interdigitalne ciste, iz katerih se ob predrtju sprostijo kvasovke v velikem številu.

Vnetje zunanjega sluhovoda je verjetno najpogostejša oblika obolenja, pri katerem sodeluje *M. pachydermatis*. Sluhovod je sprva lahko samo zažarjen in srbeč, po dolgotrajnem vnetju pa je sluznica obložena z vnetnim materialom, voskaste ali mazave konsistence in značilnega vonja. Zaradi srbenja in silovitega stresanja z glavo pa so pogosti tudi hematomi uhljev.

Pogosto je tudi **vnetje ustničnih gub**, kože in sluznice nosu. Kadar je prizadeta **koža analnega področja**, se vnetje lahko razširi tudi na ventralno stran repa, ki ga psi drgnejo, grizejo in ga pri tem nemalokrat tudi poškodujejo. Malasezijski **konjunktivitis** je redek, običajno se pojavi, kadar gre za generalizirano obliko bolezni.

Klinična in laboratorijska diagnostika

Diagnostika malasezioze se začne s splošnim kliničnim pregledom živali, kjer smo pozorni predvsem na obliko in lokacijo sprememb, pri generalizirani obliki pa tudi na vonj živali. Preiskavo dopolnimo s kvalitativnimi in kvantitativnimi tehnikami za dokazovanje povzročitelja. Nekatero od njih so zelo enostavne in jih je možno opraviti tudi v ambulantnih pogojih, druge pa se opravljajo v mikrobioloških laboratorijih.

Direktne diagnostične tehnike

1. *Tehnika s prozornim lepilnim trakom* je zelo primerna, kadar pregledujemo kožo trupa, kjer so ravne površine in koža ni preveč zamaščena. Potrebujemo košček lepilnega traku, ki ga dobro pritismo na obolelo mesto (priporočljivo je, da je dlaka postrižena, koža pa vsaj mehansko očiščena). Nato lepilni trak dvignemo in ga namočimo v barvilo (npr. v metilensko modrilo ali komercialni sistem Diff-Quik). Trak splaknemo v čisti vodi in ga na nasprotni strani osušimo, na pravi strani pa lahko pustimo prijeto barvilo. Trak pritismo na predmetnico in gledamo pod mikroskopom.

2. *Direktni odtis na predmetnici* je ravno tako primeren le na ravnih površinah kože, kadar je le-ta mastna ali vlažna. Potrebujemo predmetno stekelce, ki ga večkrat pritismo na spremenjeno mesto, odtis fiksiramo, obarvamo in gledamo pod mikroskopom.

3. *Odvzem brisa z vatirano paličko* je primeren na tistih delih telesa, ki so zaradi anatomske posebnosti težje dostopna, npr. koža med prsti, sluznica zunanjega sluhovoda ipd. Z vatirano paličko posnamemo material s prizadetega mesta, vsebino pa nato tanko razmažemo po predmetnem stekelcu in gledamo pod mikroskopom. Tako odvzet bris lahko uporabimo tudi za gojiščno preiskavo, tako da vsebino razmažemo po primernem trdnem gojišču in inkubiramo pri 37°C. Kadar želimo isti bris uporabiti za gojiščno in mikroskopsko preiskavo, vedno najprej začnemo z nasajanjem za gojiščno preiskavo in šele nato naredimo razmaz na predmetnici. V nasprotnem primeru bi bris med pripravo razmaza lahko kontaminiral in rezultati gojiščne preiskave nebi bili realni.

Gojiščna preiskava

Osnovno gojišče je Sabouraudov dekstrozni agar, izolacija pa je enostavnejša, če so gojišču dodani antibiotiki, ki zavirajo rast bakterijskih kontaminantov. Priporočljivo gojišče je Dixonov agar, na katerem *M. pachydermatis* dobro raste, lažje pa izoliramo tudi tiste seve, ki so bolj ali pa popolnoma odvisni od vira maščobnih kislin. Na njem lahko izoliramo tudi vrsto *M. sympodialis*. Kulturo inkubiramo pri 37°C vsaj 3 dni. Determinacija je večinoma mogoča že na podlagi makroskopskih in mikroskopskih značilnosti kulture.

Gojiščna preiskava s kontaktno tehniko (agar plate technique) je zelo enostavna, vendar je spet primerna le za ravne površine kože. Potrebujemo majhno petrijevko, ki jo do vrha napolnimo z agarjem, nato pa celotno površino gojišča pritisnemo na kožo. Gojišče postavimo v večjo petrijevko, pokrijemo in inkubiramo pri 37°C najmanj 3 dni. Prednost takega načina je, da se izognemo posrednemu jemanju z vatirano paličko in ni nevarnosti, da bi se vzorec izsušil ali kako drugače izgubil vrednost. Inkubacija se lahko prične že takoj po odvzemu materiala (v začetku lahko tudi pri sobni temperaturi) in se kasneje nadaljuje v termostatu v laboratoriju. Poleg tega kasneje lažje ovrednotimo število kvasovk na določeni površini kože in metodo lahko štejemo za kvantitativno.

Tehnika spiranja z detergentom je manj primerna v rutinski diagnostiki, uporablja pa se v znanstveno raziskovalne namene, ker je kvantitativna. Pregledujemo točno določeno površino kože (npr. 10 cm²), ki jo speremo z detergentom, izpirek pa nasadimo na trdno gojišče. Po predpisanem času inkubacije preštujemo porasle kolonije in rezultat izrazimo v CFU (colony forming unit).

Histopatološka preiskava

Biopsija kože ni najbolj priporočljiva tehnika za diagnostiko *M. pachydermatis*, ker so kvasovke predvsem na površini kože in jih med samim postopkom lahko precej izgubimo. Če pa se odločimo za to preiskavo je najprimernejše mesto zadebeljena povrhnjica okrog folikularnega ustja. Ob okužbi se koža lahko odzove na različne načine. Najpogostejše vidimo hiperplazijo kože, ki je lahko povezana z močnim srbenjem. Pojavi se lahko še parakeratoza, ki lahko zajame tudi globlje plasti povrhnjice. Redkeje se pojavi folikulitis in cistične spremembe žlez lojnic. Kadar le-te počijo, lahko pride do gnojne granulomatozne reakcije. Take spremembe so pogostejše na koži brade in med prsti, drugje na telesu pa redkeje. Pri mačkah pa se okužba navadno kaže v obliki lišajastih sprememb na koži.

Med diagnostične tehnike lahko štejemo tudi poskusno zdravljenje. Sumljivo žival zdravimo z antimikotiki (najpogostejše ketokonazol) in če pride do izboljšanja predvidevamo, da je šlo za glivično obolenje. Ko se odločamo ali gre za malaseziozo, je pomemben podatek v kakšnem

številu jo najdemo na koži. Pri težjih obolenjih so navadno v velikem številu, redki pa so primeri, ko kljub manjšemu številu povzročajo resne spremembe. V teh primerih gre običajno za preobčutljivostne reakcije na alergene kvasovk.

SISTEMSKE MIKOZE

KRIPTOKOKOZA

Kriptokokza je subakutna in redkeje kronična mikoza, ki jo povzroča kvasovka *Cryptococcus neoformans*. Za okužbo so dovzetni ljudje in številne domače živali, predvsem psi, mačke, govedo in konji. Bolezen se pojavlja povsod po svetu, pogostejša pa v tropskih področjih.

C. neoformans je saprofitna gliva, ki se posebej dobro razvija v izločkih ptic, predvsem golobov, vendar pri njih običajno ne povzroči bolezni. Kriptokoki naseljujejo golšo ptic, odkoder pridejo v feces, kjer se naprej razmnožujejo. S prahom se dvigajo v zrak, z inhalacijo pa pride do okužb drugih živali in ljudi. Povzročijo lahko lokalne reakcije, pri manj odpornih živalih pa celo sistemske infekcije. Kriptokoki lahko prodrejo v telo tudi preko poškodovane kože.

Klinični znaki

Klinična slika ni specifična, diagnoza pa je lahko otežena zaradi prisotnosti znakov drugih bolezni, predvsem pri generalizirani obliki kriptokokoze.

Pri psih kriptokoki prizadanejo centralni živčni sistem (predvsem možgane in meninge) in obnosne sinuse. Zaradi tega imajo živali slabo sposobnost koordinacije, vrtijo se v krogu, obračajo glavo, so paralizirane, pojavi pa se lahko nosni izcedek. Prizadet je lahko skelet in pri nekaterih živalih se pojavi artritis. Pri avtopsiji je vidno gnojno vnetje obnosnih sinusov in nosne votline, na možganih in meningah pa drobna gnojna zrnca. Podkožni granulomi so pogosti v področju okrog ušes, na obrazu in na nogah.

Pri mačkah se kriptokokza pojavlja pogostejša kot pri psih, prizadete pa so predvsem mačke, ki so predhodno zbolele za levkemijo. Na bolezen posumimo predvsem pri starejših mačkah, ki imajo kronični izcedek iz nosu in oči, so slepe, imajo slabo koordinacijo, oteklino nosne in žrelne votline in kašljajo. Živali se navadno okužijo z vdihavanjem povzročitelja, zato je pogosta respiratorna oblika. Pri kožni obliki se pojavijo granulomatozne oteklino, napolnjene z želatinoznim eksudatom.

Diagnoza

Na kriptokokozo posumimo pri živalih, ki imajo živčne znake in granulomatozne gnojne spremembe na koži. Za laboratorijske preiskave vzamemo vzorce eksudata oz. spremenjenega tkiva in cerebrospinalno tekočino. **Vzorcu dodamo barvilo indijsko črnilo (India ink) in gledamo pod mikroskopom. *C. neoformans* je okrogla ali rahlo ovalna kvasovka z brsti, obdana pa je z značilno debelo mukopolisaharidno kapsulo (5-20 µm v premeru).** Kapsulo vidimo kot širok, neobarvan prostor okrog kvasovke.

Za gojiščno preiskavo je primeren Sabouraudov dekstrozni agar z antibiotiki in brez aktidiona. Kulturo inkubiramo pri 25 ali 37°C 3-4 dni.

MIKOZE PRI PERUTNINI

Pri perutnini so dermatofitoze bistveno manj pomembne kot pri drugih domačih živalih. Edini dermatofit, ki je znan kot povzročitelj bolezni, je *Trichophyton gallinae*, okužbe pa se pojavljajo sporadično in predvsem pri pticah in piščancih v zunanjih rejah.

Bistveno bolj pomembno glivično obolenje pa je **aspergiloza**, ki lahko povzroča velike gospodarske izgube. Prizadene predvsem zračne vrečke pri piščancih in puranih, dovzetne so tudi papige in pingvini. Aspergiloza predstavlja največji problem v valilnicah in pri baterijskem načinu reje piščancev.

Kvasovke iz rodu *Candida* so lahko oportunistični saprofiti, lahko pa povzročajo površinske in kožno-sluznične okužbe pri živalih in ljudeh. Pri perutnini najpogosteje izoliramo *C. albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis* in *C. pseudotropicalis*. Povzročajo lahko mikozo golše pri piščancih in puranih.

Kvasovke iz rodu *Cryptococcus* lahko najdemo v posušenih iztrebkih golbov in drugih ptica. Za ptice praviloma ni patogen, lahko pa so vir okužbe za ljudi in druge živali (npr. domače mesojede).

DERMATOFITOZE

FAVUS

To je glivično obolenje kože glave, ki ga povzroča dermatofit *Microsporum gallinae* (sinonim *Trichophyton gallinae*). Dovzetni so predvsem piščanci in purani, pri katerih se na neoperjeni koži glave, predvsem roži in podbradkih, pojavijo sivo-bele obloge. Prizadeti so lahko tudi operjeni deli kože in noge.

Pojavljanje

V zahodni Evropi se pojavlja le sporadično pri piščancih, puranih in okrasnih pticah. Bolj pogost je v ekstenzivni reji in le redko se pojavi pri farmskih živalih. Do okužbe navadno pride z neposrednim stikom.

Klinični znaki

Bolezen se najprej pojavi na roži in koži okrog kljuna, oči in na podbradkih. Sprva so na neoperjeni koži vidne bele pike, ki se zelo hitro večajo in se razširijo po vsej površini kože kot bela prašnata obloga. Pri napredovani bolezni na teh mestih nastane vlažna krasta, ki lahko mestoma potemni. Spremembe se zelo redko razširijo na operjeno površino kože glave, vratu in hrbta, koža pa postane zadebeljena in luskava. Micelijska masa okrog korenin peres pa je videti kot zelen obroč, če je prizadeto tudi peresno deblo, se le-to odlomi oz. izpade. Če izpade več peres dobi površina kože videz satovja, zato bolezen imenujemo tudi 'honeycomb ringworm'. Če pride do generalizirane oblike, žival močno oslabi in navadno pogine.

Diagnoza

Zaradi tipičnega poteka bolezni navadno diagnozo lahko postavimo že na podlagi kliničnih znakov. Bolezen potrdimo z mikroskopskim pregledom kužnine in z izolacijo povzročitelja, kar je pomembno zaradi ločevanja od lažnega favusa (pseudofavus), pri katerem povzročitelj ni znan. *Microsporum gallinae* dobro raste na Sabouraudovem agarju.

ASPERGILOZA

Aspergiloza je ena pomembnejših glivičnih okužb pri perutnini. Povzročajo jo glive iz rodu *Aspergillus*, predvsem *A. fumigatus* in tudi *A. flavus*. Povzročajo predvsem obolenja dihal.

Aspergili so v naravi prisotni kot saprofiti, ki v določenih okoliščinah lahko postanejo patogeni za perutnino, različne živali in ljudi. Pri mladih živalih je lahko akuten potek bolezni z veliko smrtnostjo, predvsem v prvih dneh življenja. Pri odraslih je pogostejša kronična

oblika z granulomatoznimi vnetnimi spremembami v pljučih in zračnih vrečkah. V valilnicah so lahko prizadeta že jajca, predvsem umazana in poškodovana, kar privede do večje embrionalne smrtnosti. Izoliramo ga lahko tudi pri okrasnih pticah, divjih pticah v ujetništvu, nojih.

Pojavljanje in epidemiologija

Aspergili so v naravi prisotni vsepovsod, predvsem pa v zemlji, razpadajočih organskih snoveh, različnih krmilih (na poškodovanem ali vlažnem zrnju ipd...). Zaradi mešanja zraka se spore, ki so zelo lahke, lahko dvignejo s površin in so v velikih koncentracijah lahko prisotne kjerkoli v zraku. Posebno veliko jih je v zelo vlažnem in toplem okolju, npr. v pregretem senu in slami, gnoju in podobnem materialu. Z zakisanjem materiala (npr. dodatkom propionske kisline) lahko zelo zmanjšamo rast aspergilov in drugih gliv.

Aspegiloza valilnih jajc

Moderna tehnologija valjenja jajc (visoka temperatura in vlaga v inkubatorju) omogoča intenzivno razmnoževanje plesni, predvsem iz rodu *Aspergillus*. Okužba jajc je odvisna predvsem od kvalitete lupine (mehanske poškodbe, umazanost). Pore v lupini omogočajo prehod spor do jajčne membrane in naprej v notranjost jajca, kjer povzroči smrt zarodka. Inkubacijska doba je navadno 8-12 dni.

Pri piščancih je največ primerov okužb skozi poškodovano jajčno lupino, največ primerov odmrtja pa je približno 16 dni od začetka inkubacije.

Akutna aspergiloza pri piščancih

Iz poškodovanih kontaminiranih jajc se sproščajo številne spore, ki jih novo izvaljeni piščanci vdihavajo takoj po rojstvu. Nevarnost okužbe je povečana, kadar živali vdihnejo veliko število spor, ob visoki vlažnosti v okolju, prisotnosti virulentnih sevov, aplikaciji antibiotikov in kortikosteroidov. S starostjo živali se verjetnost okužbe precej zmanjša.

Znaki akutne okužbe so zevanje in čivkanje, zaspanost, našopirjeno perje, povečana žeja, izguba apetita, hitro dihanje. Pogine lahko 10-15% živali, redkeje do 30%.

Kronična aspergiloza pri piščancih

Odrasle živali redko kažejo znake akutne aspergiloze in prizadetost je manj izražena. Okužba se kaže še z anemijo, živali imajo rumeno blato, glasno hropejo, imajo nagubane rože in cianotične podbradke. Pogosto zaostanejo v rasti.

Diagnostika

Vzorci za gojiščno preiskavo vzamemo z različnih površin valilnice, vključno z vzorci zraka, puha, perja in jajc.

Klinični vzorci so različni, glede na mesto in obsežnost sprememb. Pri akutni aspegilozni navadno bolezni ne prepoznamo pravočasno. Za diagnostiko je pomemben pregled notranjih organov živali po raztelesbi.

Za direktno mikroskopsko preiskavo je najboljši material bris površine zračnih vrečk, lahko pa tudi sputum, bronhialni sekret ali vsebina zračnih mešičkov. V primeru okužbe vidimo številne septirane hife, premera 4-6 μ m. Če je gliva razvila značilne aspergilozne glavice, vidimo tudi spore v sputumu in trahealnem izpirku. Preparat lahko obdelamo tudi s KOH ali laktofenolom in bombažnim modrilom.

Gojiščna preiskava (izolacija povzročitelja)

Vsi aspergili dobro rastejo na Sabouraudovem agarju, ki mu dodamo antibiotik za zaviranje rasti kontaminantov. Nikoli pa ne dodajamo cikloheksimida, ker zavira njihovo rast. Kulture inkubiramo pri sobni temperaturi, *A. fumigatus* pa raste bolje pri 37°C, oz. celo pri 42-45°C. Bris ali koščke prizadetega tkiva položimo na površino gojišča in kolonije se pojavijo že po 24 ali najkasneje po 48 urah inkubacije. Po 3-4 dneh kolonije že razvijejo velikost, obliko in barvo, ki je navadno zelo značilna za posamezno vrsto. Diagnozo potrdimo z mikroskopskim pregledom kulture, na podlagi značilne oblike glavic.

Diferencialna diagnostika

Klinično pridejo v poštev različne respiratorne bolezni, pri gojiščni preiskavi pa rast aspergilov tako značilna, da je zamenjava z drugimi glivami skoraj nemogoča.

Serološka diagnostika

Za ugotavljanje protiteles proti *A. fumigatus* je uporaben Ouchterlonyjev imunodifuzijski test in indirektna hemaglutinacija. Razvit je tudi test ELISA.

OKUŽBE S KVASOVKAMI

KANDIDOZA

Kandidoza perutnine (ang. sour crop – oralna kandidoza) se pojavlja sporadično, prizadet pa je lahko prebavni trakt od golše do konca prebavne cevi. Običajno se pojavi kot sekundarni povzročitelj, predispozicijski dejavniki so predvsem pretirana uporaba antibiotikov, avitaminoze, bakterijske in virusne okužbe in slabi pogoji reje.

Pojavljanje

Kandide so lahko v naravi kot saprofiti oz. so prisotne v prebavnem sistemu zdravih in/ali bolnih ptic. Najpogosteje so prisotne *C. albicans*, *C. krusei* in *C. tropicalis*, okužba pa je večinoma pri puranih, pegatkah, jerebicah, fazanih, golobih, papigah.

Klinična slika

Znaki obolenja so zelo različni in niso specifični. Odvisni so od vzroka, ki je pogojeval obolenje. Okužene živali slabše priraščajo in so apatične, perje je navadno nasršeno, oči pa udrte. Bolj dovzetne so mlade živali.

Prizadete so sluznice zgornjih prebavil, vidne so zlasti pseudomembranozne spremembe na jeziku, grlu in žrelu ter krastice okrog kljuna in po glavi. Sluznica golše je zadebeljena, posuta s krvavitvami, podobne spremembe pa so lahko tudi na žlezem delu želodca.

Diagnostika

Ker je *C. albicans* lahko normalno prisotna kot saprofit, izolacija še nima velike diagnostične vrednosti. Pomembna je tudi prisotnost kliničnih sprememb in dokaz velikega števila kvasovk, okužba pa je nedvomno dokazana z najdbo nitastih tvorb.

KRIPTOKOKOZA

Cryptococcus neoformans ni patogen za perutnino, pogosto pa je prisoten kot saprofit v golši. Nikoli ne postane invaziven, ker mu ne ustreza visoka temperatura, ki je značilna za perutnino. Po drugi strani pa je perutnina, predvsem golobi, odličen rezervoar za okužbo drugih živali in človeka, ker kriptokoki lahko zelo dolgo preživijo v iztrebkih.

MIKOZE PRI GLODALCIH IN DIVJIH ŽIVALIH

Mikoze so pri glodalcih in divjih živalih razmeroma redke, predvsem kadar jih gojimo individualno kot ljubiteljske živali. Vendar pa se je v zadnjem času zelo močno povečalo število dermatofitoz pri laboratorijskih živalih (podgane, miške, budre, kunci) in pri živalih za krzno (lisice, činčile, minki ipd.). Najpogostejši povzročitelj je *T. mentagrophytes*, lahko pa tudi *M. canis*, verjetno zaradi skupnega bivanja z domačimi mesojedi.

DERMATOFITOZE

Kunci

Najpogostejši povzročitelj je *T. mentagrophytes*, redkeje *M. canis* in le izjemoma drugi dermatofiti, kot so *T. quinckeanum*, *T. gypseum* ali *T. verrucosum*.

Pojavljanje in epidemiologija

T. mentagrophytes in *M. canis* sta razširjena povsod po svetu, tako pri živalih kot tudi pri ljudeh. Glavni vir okužbe so kunci, ki prenašajo povzročitelja z okuženo dlako neposredno ali posredno preko predmetov.

Klinični znaki

Spremembe so najbolj opazne in značilne pri mladih živalih, pojavijo pa se približno tri tedne po rojstvu. Pojavijo se lahko na različnih delih telesa, najpogosteje pa okrog nosa in oči ter po uhljih, lahko tudi po sprednjih tačkah in vratu. Brezdlačna mesta so lahko okrogla ali nepravilnih oblik, koža pa je navadno pordela, zadebeljena in pokrita z luskinicami ali celo krastami. Živali se praskajo, predvsem po nogah, zaradi srbenja so pogosto nemirne. Če je okužba generalizirana, tudi slabše priraščajo in so bolj dovzetne za sekundarne okužbe.

Diagnostika

Na bolezen posumimo na podlagi kliničnih znakov. Uporabimo lahko tudi Woodovo svetilko, pri kateri je uporaba omejena, če je povzročitelj *T. mentagrophytes* ali sev *M. canis*, ki ne fluorescira. Zato je v primeru odsotnosti fluorescence, preiskavo potrebno dopolniti z drugimi metodami. Dlake in kraste za mikroskopsko in gojiščno preiskavo pobereмо z roba sprememb in jih pošljemo v laboratorij v primerni embalaži. Odrasle živali pogosto ne kažejo znakov, vendar posumimo na okužbo, kadar zbolijo mladiči ali druge živali in ljudje. V takem primeru vzamemo naključni vzorec z **McKenziejevo krtačno tehniko**. Za odvzem potrebujemo primerno veliko krtačo (zobno krtačko za manjše živali, krtačko za roke za večje živali) in

prečesmo kožuh od glave proti zadnjemu delu telesa. Ogibamo se trebuhu in spodnjemu delu tačk, ker je na teh mestih navadno veliko kontaminantov, ki motijo preiskavo.

Budre

Budre so zelo dovzetene za okužbo z dermatofiti, najpogostejši povzročitelj pa je *T. mentagrophytes* in redkeje *M. canis* ali *T. quinckeanum*. Kadar budre živijo v skupini, se lahko razvije tudi latentna oblika okužbe in lahko je okuženih tudi 20-30% živali. Ta prevalenca je precej nižja.

Miši

Glavni povzročitelj je tudi *T. mentagrophytes*, vendar pa pri prosto živečih miših lahko izoliramo še mnoge druge plesni iz rodov *Aspergillus*, *Trichophyton*, *Penicillium*, *Rhizopus* in različne *Mucoraceae*. Pri miši je znana tudi specifična oblika dermatofitoze, favus, ki jo povzroča *T. quinckeanum*. Zelo redko pa je povzročitelj *M. gypseum*.

Klinični znaki, favus

S poskusi so dokazali, da v primerih, ko med mlade živali brez razvitega imunskega statusa dodamo okuženo žival, pride do okužbe približno 25% živali, 10% jih razvije značilne klinične znake, navadno imajo debele sive ali sivo-rumene kraste in večina od njih pogine. Ostale živali imajo manj tipični potek s polomljeno dlako, kraste so manjše, rjavkaste in poginejo le redke živali.

Prvi znaki se pojavijo po 10-12 dneh od okužbe.

OKUŽBE S KVASOVKAMI

Znanih je zelo malo podatkov o okužbi s kvasovkami pri divjih živalih. Znani pa so primeri eksperimentalnih okužb, kjer so ugotovili, da kvasovke v določenih okoliščinah lahko postanejo zanje patogene. Primer je okužba s kvasovko *Saccharomyces guttulata* (*Cynilomyces guttulatus*), ki je pogosta pri kuncih in lahko povzroča diarejo. Iz prebavnega trakta lahko izoliramo še kvasovke iz rodov *Candida* in *Torulopsis*.

Redkeje pa lahko izoliramo tudi kvasovko *Malassezia pachydermatis*, ki ima običajno le vlogo saprofita, lahko pa povzroča tudi bolezenske spremembe.

ASPERGILOZA

Okužbe z *Aspergillus fumigatus* so znane pri budrah in kuncih, vendar so opisane le redko. Do okužbe pride zaradi bivanja v vlažnem okolju (senu, slami), kjer se plesni intenzivneje

razvijajo. Prizadeti so dihalni organi zaradi inhalacije spor, redkeje pa se razvijejo vozličaste tvorbe na vranici in povečanje mezenterialnih bezgavk.

ZIGOMICETOZE

Znani so samo primeri eksperimentalnih okužb glodalcev z različnimi zigomicetami. Pri budrah pa lahko povzročita okužbo *Absidia corymbifera* in *Rhizopus oryzae*. Pojavi se driska, vnetje črevesja in povečajo s mezenterialne bezgavke s pseudotuberkulotičnimi spremembami. Absidije in druge zigomicete so sicer prisotne na površini kože kot saprofiti in ne povzročajo nobenih sprememb. Okužbe so navadno omejene in ponehajo, ko živali dosežejo starost 6 tednov starosti.

MIKOZE PRI RIBAH

Mikotična obolenja pri ribah ugotavljamo le redko in diagnostika je precej problematična. Vzrok je v izjemno velikem številu različnih vrst rib, ki živijo v zelo specifičnih okoljih (temperatura, slanost, kontaminacija). Stanje lahko otežijo še različne sekundarne okužbe in pa nejasna klasifikacija. Okužbe lahko povzročajo različne plasen, ki so normalno prisotne v vodi, najpogostejši povzročitelji pa so iz reda Saprolegniales.

SAPROLEGNIOZA

Glivične okužbe luskin pri ribah so precej pogoste in jih imenujemo s skupnim imenom saprolegnioza, čeprav jih povzročajo plesni iz rodu *Saprolegnia* in *Achlya*.

Pojavljanje

Saprolegnia je ubikvitarna bakterija, ki živi v vodi in njenih usedlinah. *Saprolegnia ferax* je bolj pogosta v razpadajočem materialu, *Saprolegnia parasitica* pa večinoma živi na vodnih insektih. Obe vrsti lahko povzročata bolezen pri ribah, predvsem v ribogojnicah in akvarijski vzreji. Bolezen se močneje izrazi v vodah slabše kvalitete (močna organska in mikrobiološka

onesnaženost) in na živalih, ki imajo zaradi različnih vzrokov poškodovano površino kože (rane zaradi parazitov, udarcev, bojev med drstenjem..). Dobro tolerirajo slano okolje do 28% soli, rast je boljša pri nižjih temperaturah in pH vrednosti 4-6.

Klinična slika

Bolezen je najprej opazna pri ribah, ki so v slabši telesni kondiciji, v stresu ali so poškodovane. Prvi znaki so na predilekcijskih mestih, predvsem na glavi in hrbtu. Pri generalizirani obliki je lahko celo telo pokrito z belim ali sivim micelijem, kar živali lahko izčrpa do pogina. Micelij se lahko razraste tudi v globlja tkiva in lahko doseže krvne žile, kjer povzroča tromboze. Izjemoma lahko prizadene tudi notranje organe, predvsem srce in jetra. Znani so tudi primeri okužbe oči, pri katerem navadno pride do popolnega uničenja očesnih delov, rast plesni pa se lahko nadaljuje tudi do možganov in sledi smrt živali.

Mikoza ribjih jajčec je posebna oblika saprolegnioze. Dokler je plesen le na površini jajčec, lahko še ukrepamo, kadar pa hife prodrejo globlje sledi smrt zarodka.

Diagnoza

S površine prizadete kože postrgamo glivično maso in pregledamo pod mikroskopom, kjer vidimo številne septirane hife, različnih debelin, nespolne spore in gibljive zoospore.

Za končno identifikacijo glive je potrebna izolacija na umetnih gojiščih, ki se običajno uporabljajo v mikologiji. Saprolegnia dobro raste na številnih gojiščih, vendar kolonije niso karakteristične.

Diferencialno diagnostično pridejo v poštev še druge plesni, ki jih lahko ločimo na podlagi oblike zoosporangijev in načina izločanja zoospor.

**LASTNOSTI IN LABORATORIJSKA DIAGNOSTIKA
NAJPOMEMBNEJŠIH POVZROČITELJEV
ŽIVALSKIH MIKOV**

OSNOVNE ZNAČILNOSTI DERMATOFITOV

Dermatofiti so skupina sorodnih gliv, ki za svojo rast izkoriščajo keratin. Naseljujejo oroženele plasti kože, nohte, kremplje, dlake in druga oroženela tkiva. Klasične spremembe so omejene okrogle oblike (ang. ringworm). Vse dermatofite uvrščamo v tri rodove in sicer *Microsporum*, *Trichophyton* in *Epidermophyton*.

Običajno jih uvrščamo med nepopolne glive (*Fungi imperfecti*), vendar je pri mnogih znan tudi spolni način razmnoževanja, zato jih na podlagi te lastnosti uvrščamo v razred *Ascomycetes*. Npr. *Nannizzia* sp. je teleomorf za *Microsporum* sp. in *Arthroderma* sp. za *Trichosporum* sp. Zaradi splošnega razumevanja se v strokovni literaturi še vedno uporabljajo stara imena. Znanih je vsaj 38 vrst dermatofitov, za veterinarsko medicino pa so pomembne predvsem vrste iz rodov *Trichophyton* in *Microsporum*.

Naravno nahajališče

Glede na naravno nahajališče dermatofite razdelimo v tri večje skupine: geofilne, zoofilne in antropofilne.

Tabela 6: Razdelitev dermatofitov glede na naravno nahajališče

Antropofilni	Zoofilni	Geofilni
<i>Epidermophyton floccosum</i>	<i>Microsporum canis</i>	<i>Microsporum gypseum</i>
<i>Microsporum audouinii</i>	<i>Microsporum equinum</i>	<i>Microsporum nanum*</i>
<i>Microsporum ferrugineum</i>	<i>Microsporum nanum*</i>	<i>Trichophyton ajelloi</i>
<i>Trichophyton concentricum</i>	<i>Microsporum persicoclor</i>	<i>Trichophyton terrestere</i>
<i>Trichophyton kanei</i>	<i>Trichophyton equinum</i>	
<i>Trichophyton megninii</i>	<i>Trichophyton simii</i>	
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> (cottony and velvety)	<i>Trichophyton mentagrophytes</i> (granular)	
<i>Trichophyton raubitschekii</i>	<i>Trichophyton verrucosum</i>	
<i>Trichophyton rubrum</i>		
<i>Trichophyton schoenleinii</i>		
<i>Trichophyton soudanese</i>		
<i>Trichophyton tonsurans</i>		
<i>Trichophyton violaceum</i>		
<i>Trichophyton yaoundei</i>		

**Microsporum nanum* je lahko uvrščen med zoofilne ali geofilne dermatofite

Geofilni (soil-loving) dermatofiti se nahajajo v zemlji in živijo kot saprofiti. Najbolj znana sta *Microsporum gypseum* in *M. nanum*, ki lahko povzročata mikrosporozo pri živalih in ljudeh, ki se navadno okužujejo neposredno iz zemlje. Izjemoma se bolezen širi med živalmi in ljudmi.

Antropofilni dermatofiti povzročajo blage kronične spremembe pri ljudeh, zelo izjemoma pa povzročajo dermatofitoze pri živalih.

Zoofilni dermatofiti primarno parazitirajo na živalih, lahko pa so tudi povzročitelji zoonoz pri ljudeh. Le-ti se navadno okužijo od mačk, psov, govedi, konjev in glodalcev. Najbolj pogosta iz te skupine sta *Microsporum canis* in *Trichophyton mentagrophytes*.

Nekateri dermatofiti so še posebej prilagojeni na posamezne živalske vrste. Taki so npr.:

- *Microsporum canis*: mačke
- *Misrosporum persicolor*: voluhar
- *Trichophyton erinacei*: jež
- *Trichophyton mentagrophytes*: glodalci
- *Trichophyton verrucosum*: govedo

Dermatofiti lahko povzročajo subklinične ali inaparentne infekcije, lahko pa povzročajo izrazite klinične spremembe, ki se kažejo z izpadanjem dlake in različno izraženimi spremembami na površini kože.

Dermatofiti pri živalih so večinoma ektotrihni, ker imajo septirane hife, ki invadirajo kožo in dele dlake. Morfološko se dermatofiti razlikujejo glede na to ali živijo kot paraziti (na živalih) ali kot saprofiti (na umetnih gojiščih). V obeh primerih iz spor poženejo hife. Pri parazitskem razvoju se hife členijo in nastanejo artrospore (artrokonidiji), ki obdajajo in poškodujejo okuženo dlako. Iz njih po razpadu nastanejo proste artrospore, s katerimi se okužijo druge živali. Če take dlake s sporami nasadimo na umetno gojišče (gojiščna preiskava), rastejo v obliki plesni, ki so prepoznavne po značilnih kolonijah z žarkastimi robovi in značilno barvo reverza (saprofitski razvoj). Kolonije mnogih dermatofitov so navadno pigmentirane, kar je pomembno tudi za determinacijo. Mikroskopsko jih determiniramo na podlagi prisotnosti značilnih mikrokonidijev in makrokonidijev, kar je zelo pomembno pri določanju vrste.

Patogeneza

Najpomembnejši faktor patogenosti je sposobnost dermatofitov, da hidrolizirajo keratin in tako povzročajo manjše ali večje poškodbe na dlakah, koži ali drugih keratiniziranih tkivih.

Spremembe na koži nastanejo tudi zaradi vnetne reakcije organizma na presnovke gliv. Imunski odgovor in vnetna reakcija sta škodljiva za glive, zato se širijo v okolna zdravo tkivo. Posledice so vidne v obliki okroglih poškodb in brezdlačnih mest s tendenco širjenja na periferijo, lahko pa se vzpostavi ravnovesje med gostiteljem in dermatofitom.

Gostitelji se lahko na okužbo odzovejo na različne načine:

- Subklinična ali inaparentna okužba
- Klasične okrogle omejene spremembe
- Generalizirane spremembe, ki se lahko komplicirajo s parazitarno invazijo ali sekundarno bakterijsko okužbo (pogosto *S. aureus* in *S. intermedius*)
- Vozličaste ali tumorozne spremembe, imenovane kerion (navadno pri psih)

Epidemiologija

Vir okužbe za pomembnejše živalske dermatofitoze so okužene živali različnih vrst. Rezervoar so lahko tudi glodalci (*T. mentagrophytes*), ježi (*T. erinacei*), zemlja (*M. gypseum*). Posredno pa se okužba lahko prenaša z različnimi pripomočki za nego živali, ki so kontaminirani z dlako z aktivnimi artrospori. Artrospore preživijo v dlaki in kožnih ostružkih nekaj mesecev, v ugodnih razmerah pa celo nekaj let.

Splošna načela pri diagnostiki mikoz

Za uspešno diagnostiko mikoz je nujno potrebno dobro poznavanje anamnestičnih podatkov, kliničnih znakov, patoloških posebnosti in po možnosti tudi kožnih testov. Zelo zaželjena (ali v mnogih primerih celo nujno potrebna) je laboratorijska diagnostika, ki vključuje mikroskopski pregled kužnine ter izolacijo in identifikacijo povzročitelja. Identifikacija temelji na makroskopskih in mikroskopskih značilnostih kulture, prisotnosti in obliki razplodnih organov (npr. konidijev), izjemoma pa lahko tudi na podlagi biokemijskih lastnosti (npr. pri kvasovkah in nekaterih dermatofitih).

PREISKAVA NA DERMATOFITE

Namen preiskave je ugotoviti prisotnost elementov dermatofitov v kužnini, oziroma izolacija in determinacija povzročitelja.

Postopek je sestavljen iz mikroskopske in gojiščne preiskave dlake, kožnega brisa ali ostružka, oziroma drugega oroženelega tkiva. Sam potek preiskave je odvisen od vrste oziroma oblike vzorca, od vrste živali in vrste pričakovanega povzročitelja. V preiskavo so lahko vključene vse omenjene metode ali pa samo nekatere od njih.



Preiskava z Woodovo svetilko
(fluorescenca dlak, okuženih z *M. canis*)

Mikroskopska preiskava dlake
(prisotnost značilnih artrospor)

Optični mikroskop
(obdelava z laktofenolom)

Fluorescentni mikroskop
(obdelava s kalkofluorom)



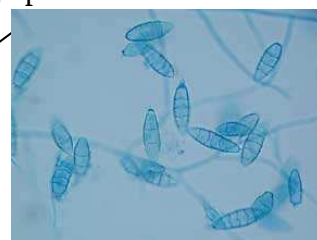
KUŽNINA (dlaka, ostružki)

gojiščna preiskava dlake (1-3 tedne)

SDA
inkubacija pri 37°C

SCA
inkubacija pri 26°C

mikroskopska preiskava kulture
(nativno ali barvano z LPCB, značilni konidiji)



VZORČENJE

Vzorke običajno odvzamejo klinični veterinarji ali pa lastniki sami. Izjemoma pa vzorčijo tudi delavci laboratorija.

Kadar ima žival izražene klinične spremembe, dlake na robu sprememb populimo (**ne postrizemo**) s sterilno pinceto. Odvzamemo predvsem tiste dlake, ki so videti zadebeljene, polomljene ali drugače poškodovane. Kadar je spremenjena tudi površina kože odvzamemo bris ali ostružek, ki ga postrgamo s skalpelom, robom predmetnega stekelca ali drugim ostrim predmetom.

Pri živalih, ki nimajo kliničnih znakov (predvsem mačke in kunci), uporabljamo **MacKenziejevo krtačno tehniko**. Z mikološko čisto krtačo (zobno ali kirurško) sumljivo žival počešemo toliko grobo, da na krtači ostane vsaj nekaj dlak. Na ščetinah krtače ostanejo tudi posamezne spore z dlak, ki jih sicer ne izpulimo. Kadar pričakujemo močno kontaminacijo vzorca z bakterijami ali saprofitskimi plesnimi, izbrano področje razkužimo s 70% etanolom, ga osušimo in šele nato vzamemo vzorec.

Ker je večina dermatofitov povzročiteljev zoonoz, moramo pri vzorčenju še posebej paziti, da ne pride do okužbe delavcev, zato je obvezna uporaba zaščitnih rokavic.

Material shranimo v epruvetah ali petrijevkah pri sobni temperaturi. Ker ostanejo spore dermatofitov na odpadli ali izpuljeni dlaki še dolgo žive (več mesecev, ob primerni vlagi, temperaturi in veliki količini vzorca pa celo več let), material lahko preiskujemo tudi kasneje.

Potek preiskave

Vzorke dlake v laboratoriju ponovno pregledamo z Woodovo svetilko in za nadaljnjo preiskavo odberemo tiste, ki fluorescirajo. Tako povečamo možnost, da najdemo povzročitelja.

Woodovo svetilko uporabljamo v čim bolj temnem prostoru, ker je tako morebitna fluorescenca bolj izrazita. Svetilko prižgemo že nekaj minut pred preiskavo, da se dobro ogreje. Najbolj primerno je, da so preiskovane dlake enakomerno razporejene v prozorni petrijevki, kjer jih lahko natančno presvetimo. Če opazimo dlake z značilno modro fluorescenco, jih pobremo s pinceto in uporabimo za mikroskopsko in/ali gojiščno preiskavo. Če je fluorescirajočih dlak malo, jih uporabimo samo za gojiščno preiskavo, ker je le-ta bolj zanesljiva. Ker pa fluorescirajočih dlak v večini primerov ni (fluorescira le okrog 40-50% sevov vrste *M. canis*), dlake za nadaljnje preiskave izberemo naključno. Če je vzorec zadosti velik, izbiramo dlake, ki so zadebeljene, polomljene ali na koncih razcefrane.

MIKROSKOPSKA PREISKAVA DLAKE

Mikroskopska preiskava je orientacijska metoda in jo uporabljamo le kot dopolnilo gojiščni preiskavi. **Pri vzorcih dlake konj in govedi pa je mikroskopska preiskava nujna.** Uporabljamo dve mikroskopski metodi, ki se razlikujeta po predhodni obdelavi materiala (z laktofenolom in z belilom kalkofluor) in po načinu mikroskopskega pregleda (z navadnim optičnim mikroskopom in s fluorescentnim mikroskopom).

a. Mikroskopska preiskava dlake, odelane z belilom kalkofluor

Kalkofluor je dinatrijeva sol 4,4'-bis (4 anilino-bis-dietilamino-5-triazin-2-ylamino)-2-2'-stilben-disulfonske kisline. To je brezbarvno fluorescentno barvilo, ki se veže na B1-3 in B1-4 polisaharide v celulozi in hitinu. Ko obarvan preparat izpostavimo ultravijoličnim žarkom, se zaradi fluorescence pokaže obris glivičnih elementov (spor in hif).

Potek preiskave

Material (dlake, ostružke) položimo na predmetnico, dodamo 2 kapljici 10% raztopine KOH in rahlo pognetemo. Raztopina KOH deluje keratinolitično. Nato dodamo enako količino kalkofluora, pomešamo in pokrijemo s pokrovnico. Preparat preiščemo s fluorescentnim mikroskopom (filter 440 nm), kjer glivični elementi fluorescirajo zeleno.

b. Mikroskopska preiskava dlake, obdelane z laktofenolom

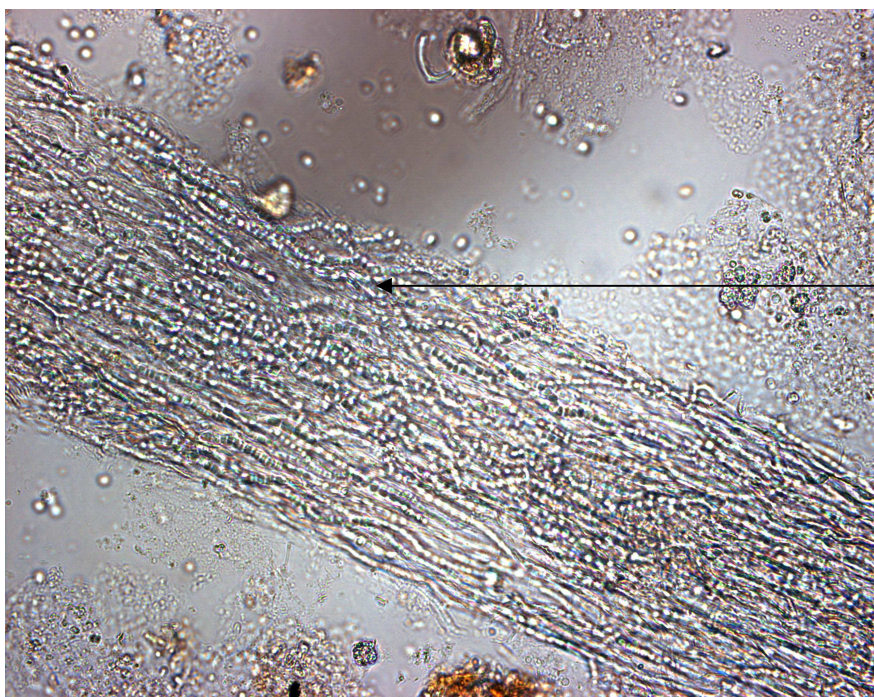
Tabela 7: Sestava laktofenola

karbolna kislina	20,0 g
mlečna kislina	20,0 g
glicerol	30,0 g
destilirana voda	20,0 g

Na predmetnico kanemo 2-3 kapljice laktofenola in nanje položimo sumljive dlake. Pri tem moramo paziti, da nam dlake ne padajo po mizi oz. v okolico. Če posamezni deli dlak segajo čez predmetnico, jih požgemo nad plamenom. Kadar je material čist (samo dlake) preiskavo lahko opravimo takoj, v primeru onesnaženja z vnetnimi ali drugimi snovmi pa počakamo, da se material razpusti in so vidne posamezne dlake. V tem primeru je bolje, da preiskovani vzorec namakamo v petrijevki ali v manjši epruvetki, ker maceracija lahko traja več dni, dodati pa je treba večjo količino laktofenola. Po razmehčanju dlake s pinceto rahlo

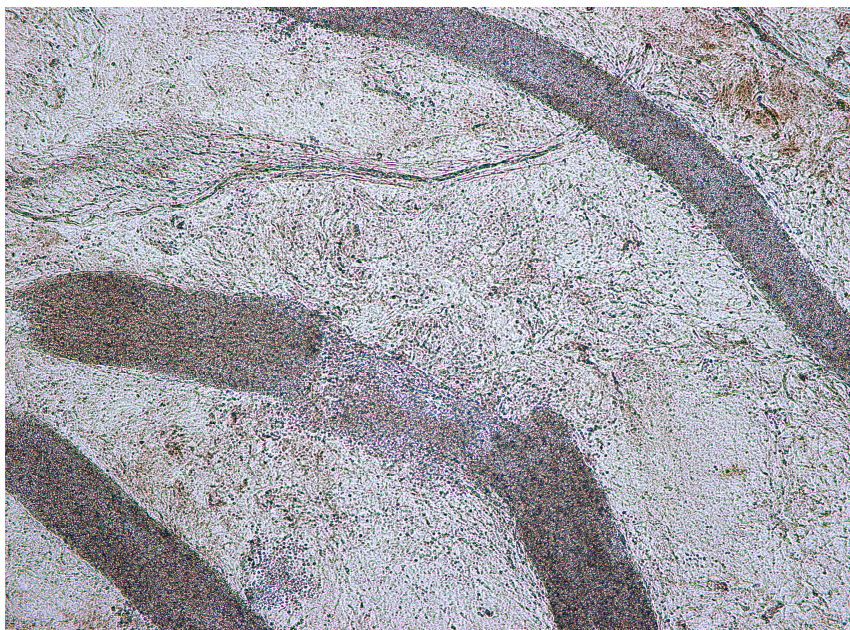
pognetemo, jih prenesemo na predmetnico in pokrijemo s pokrovnico. S kazalcem pokrovnico rahlo pritisnemo navzdol, da je plast preiskovanega materiala čim tanjša.

Preparat preiščemo s svetlobnim mikroskopom. **Kondenzor mora biti spuščen, svetloba pa rahlo zastrta.** Pri manjši povečavi (100x) navadno vidimo samo amorfnno maso okrog dlake, pri večji povečavi (1000x) pa tudi posamezne artrospore. Artrospore so lahko različno velike, okoli dlake pa so lahko razporejene v verigah ali gručah. Na podlagi tega lahko le sumimo na vrsto povzročitelja, ne moremo pa postaviti končne diagnoze.



Okužena dlaka

- prepletena s številnimi vzdolžnimi hifami
- hife se s členjenjem spremenijo v **artrospore**
- artrospore lahko ostanejo v obliki verižic ali pa razpadejo na posamezne spore



Zlomljena okužena dlaka

- dermatofiti izločajo različne **keratinaze** s katerimi razkrajajo keratin, ki ga uporabljajo za svojo rast
- poškodovana dlaka se pogosto prelomi

GOJIŠČNA PREISKAVA

Gojiščna preiskava je najbolj zanesljiva, vendar je sorazmerno dolgotrajna, predvsem kadar gre za negativni rezultat, ko preiskavo zaključimo šele po treh tednih.

Vsak vzorec preiščemo vzporedno na dveh gojiščih, ki se razlikujeta po sestavi in ju inkubiramo na različnih temperaturah.

Preiskava na gojišču Sabouraud dekstrozni agar (SDA) s kloramfenikolom

Na tem gojišču raste večina gliv, dodani antibiotiki pa preprečujejo rast bakterijskih kontaminantov. Kot osnovno gojišče je primeren Sabouraudov agar.

Nasajanje materiala

Preiskovane dlake s pinceto pričvrstimo na površino gojišča, predvsem korene dlak, kjer je največja verjetnost, da se nahajajo artrospore. Ravno tako nasajamo tudi kožne ostružke, brise pa razmažemo po površini gojišča. Kadar je vzorec odvzet s krtačno tehniko po MacKenzieju, krtačo rahlo pritisnemo na površino gojišča.

Inkubiranje

Inkubiramo najmanj 7 dni, v primeru negativnega rezultata pa do 3 tednov. Pri pozitivnih vzorcih se prve kolonije navadno pojavijo že prej kot v enem tednu. Diagnozo postavimo na podlagi tipičnega izgleda kolonij in mikroskopske preiskave kulture (glej poglavje Interpretacija rezultatov).

Mikroskopska preiskava kulture z laktofenolnim bombaževim modrilom (LPCB)

LPCB uporabljamo predvsem za barvanje čistih kultur dermatofitov, izjemoma pa za direktno preiskavo materiala. Pripravek je sestavljen iz laktofenola, ki mu je dodano barvilo.

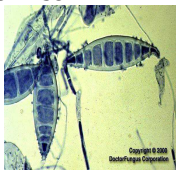
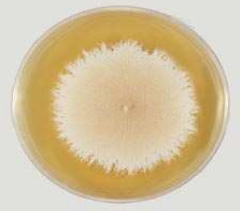
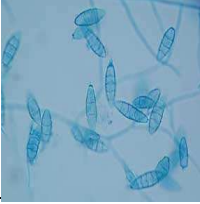
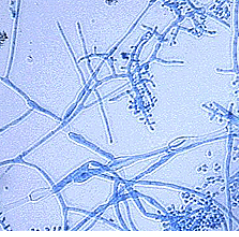
Mlečna kislina očisti in zaščiti glivične dele, fenol jih ubije (deluje kot močan citoplazemski strup, precipitira celične beljakovine in inaktivira encimske sisteme gliv), glicerol prepreči izsušitev, bombaževo modrilo pa obarva hitin in celulozo.

Na sredino predmetnice kanemo kapljico LPCB, s sterilno bakteriološko zanko dodamo nekaj kulture in čim manj gnetemo. Nato previdno pokrijemo s pokrovnico in pazimo, da ostane struktura čimbolj ohranjena. Preparat preiščemo pod manjšo (100x) in večjo (1000x) povečavo z imerzijo in opazujemo značilnosti micelija in konidijev.

Mikroskopska preiskava kulture s prozornim lepilnim trakom

Približno 3 cm dolg košček prozornega lepilnega traku z lepljivo stranjo nežno pritisnemo na kulturo. Vrhna plast micelija in eventualno tudi konidiji, se prilepijo na trak, ne da bi se pri tem porušila struktura in razmerje med posameznimi glivičnimi elementi. Na predmetnico kanemo kapljico LPCB in lepilni trak s kulturo pritisnemo nanjo. Glivični elementi se modro obarvajo in se lepo ločijo od ostalega vidnega polja. LPCB je manj primeren za preiskavo dlake in ostružkov, ker obarva tudi nekatere nepomembne strukture v vzorcu in tako zmanjša preglednost.

Tabela 8: Morfološke značilnosti najpogostejših dermatofitov

Vrsta	Mikroskopska slika okužene dlake	Makroskopska slika kulture	Mikroskopska slika kulture
<i>Microsporum canis</i>	Artrospore so majhne in gručasto razporejene okrog dlake	Rumene ali oranžne kolonije s puhasto površino. <u>Reverz</u> : rumen, izjemoma oranžen ali brez reverza 	<u>Makrokonidiji</u> so debelosteni in septirani, navadno redki, izjemoma številni. <u>Mikrokonidiji</u> je malo in so razporejeni vzdolž hife 
<i>Microsporum gypseum</i>	Artrospore so večje in navadno razporejene vzdolž dlake	Sivo rjave kolonije s prašnato ali zrnato površino. <u>Reverz</u> : sivo riav 	<u>Makrokonidiji</u> so številni, po obliki elipsasti ali vretenasti, in tankosteni. <u>Mikrokonidiji</u> so redki, brez peclja ali na kratkem pedicelu. 
<i>Microsporum persicolor</i>		Rožnato rjave kolonije s prašnato površino. <u>Reverz</u> : rumen do rumeno rjav	<u>Makrokonidiji</u> so podolgovati in tankosteni, septirani. <u>Mikrokonidiji</u> so lahko številni. Hife so rahlo zavite.
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	Artrospore so razporejene vzdolž dlake v obliki verižic.	Rjavo opečnate kolonije s prašnato ali zrnato površino. <u>Reverz</u> : rdeče rjav 	<u>Makrokonidiji</u> so redki, cigaraste oblike, tankosteni. <u>Mikrokonidiji</u> so številni. Hife so v obliki vitic. 

INTERPRETACIJA REZULTATOV

Rezultate mikroskopskih preiskav odčitamo na podlagi prisotnosti in izgleda glivičnih elementov. Rezultate gojiščne preiskave odčitamo na podlagi tipičnega izgleda kolonij, prisotnosti in barve reverza, mikroskopske strukture kulture (prisotnost in oblika mikrokonidijev in makrokonidijev in oblika hif). Značilnosti so prikazane v tabeli 8.

PREISKAVA NA ASPERGILE (*ASPERGILLUS SPECIES*)

Aspergiloza je pomembna bolezen dihal predvsem pri perutnini, lahko pa tudi pri drugih živalih in ljudeh. Povzročitelji so predvsem *A. fumigatus* in *A. flavus*, redkeje pa *A. niger*, *A. nidulans*, *A. versicolor* in *A. terreus*. Te glive normalno najdemo v zemlji, v razpadajočih organskih snoveh, v vlažni oz. pokvarjeni krmi, ki vsebuje veliko poškodovanih zrn. Okužba se širi predvsem po zraku s sporami gliv. Aspergili so oportunistični saprofiti, ki v določenih razmerah lahko povzročajo bolezni pri živalih in ljudeh.

Direktna mikroskopska preiskava

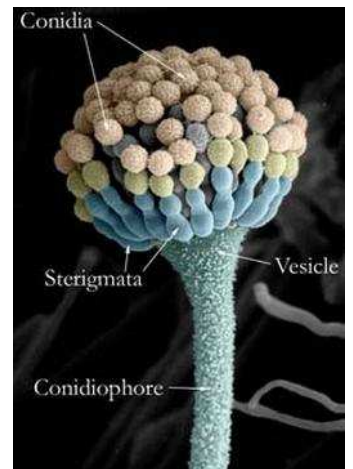
Pri aspergilozi perutnine je najbolj primeren vzorec bris ali ostružek zračnih vrečk, lahko pa tudi sputum, bronhialni izpirek ali drugi deli dihal. Pod mikroskopom lahko opazimo dele micelija oz. septirane hife, premera 4-6 μm .

Delce vzorca oz. tkiva lahko gledamo kot nativni preparat ali pa obarvane po Gramu. Če so v vzorcu zrele oblike glive, lahko vidimo tudi spore. Kadar želimo preparat očistiti različnih organskih snovi, ga obdelamo s KOH. Tako se večina snovi raztopi, glive, ki v celični steni vsebujejo keratin pa ostanejo nepoškodovane in jih lahko opazujemo pod mikroskopom. Preparat lahko tudi obarvamo z različnimi barvili, najpogosteje z bombažnim modrilom.

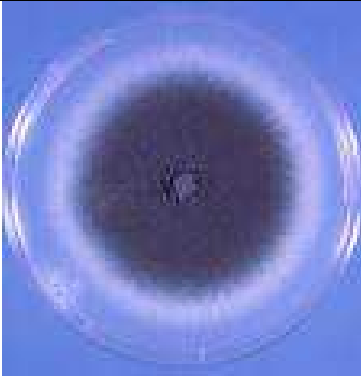
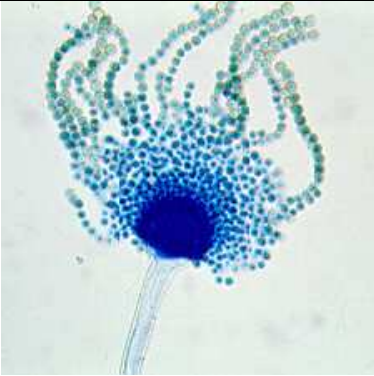
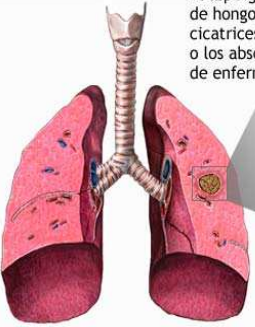
Gojiščna preiskava

Vse glive iz rodu *Aspergillus* dobro rastejo na Sabouraudovem dekstroznem agarju (SDA). Za primarno izolacijo uporabljamo gojišče z dodatkom antibiotikov, da preprečimo rast bakterij, ki so v kliničnih vzorcih pogosto prisotne in lahko motijo preiskavo. Ne smemo pa uporabljati gojišč z dodatkom cikloheksimida (aktidiona), ki zavira rast saprofitnih plesni, tudi aspergilov. **Aspergili dobro rastejo pri sobni temperaturi, še bolje pa pri 37°C, *A. fumigatus* pa celo pri 42-45°C.** Delce preiskovanega materiala naneseemo na gojišče in razmažemo po površini. Inkubiramo pri 37°C najmanj 24-48 ur. Zaradi hitre rasti lahko v tem času kolonije toliko dozori, da opazujemo značilne aspegilozne glavice. Mikroskopska slika je zelo značilna in lahko vidimo septirane hife s konidioforami, na koncu katerih so vezikule s sterigmami in konidiji (sporami). Glede na obliko aspergiloznih glavic lahko ločujemo posamezne vrste aspergilov.

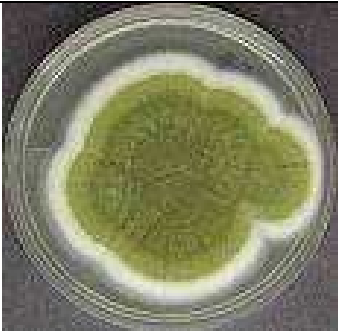
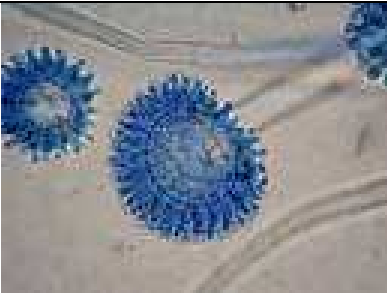
Makroskopski izgled nekaj dni starih kolonij je zelo značilen in najpomembnejše vrste lahko zanesljivo ločimo med seboj.



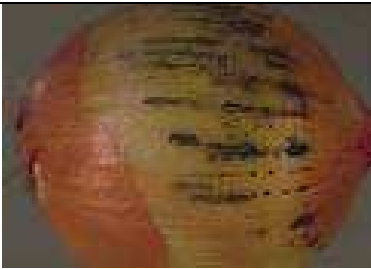
Aspergillus fumigatus

Makroskopska slika kolonije	Mikroskopska slika - glavica	Aspergilom
		 El aspergiloma es un cúmulo de hongos que coloniza las cicatrices pulmonares sanas o los abscesos que resultan de enfermedades pasadas Aspergiloma ADAM.

Aspergillus flavus

Makroskopska slika kolonije	Mikroskopska slika - glavica	Plesen na poškodovani koruzi
		

Aspergillus niger

Makroskopska slika kolonije	Mikroskopska slika - glavica	Plesen na čebuli
		

PREISKAVA NA KVASOVKE

VZORČENJE

Vzorci s kože in sluznic mesojedov odvzamejo klinični veterinarji, navadno v obliki brisov, izpirkov ali ostružkov. Prezemnik vzorca mora preveriti ali pošiljatelj sumi na specifičnega povzročitelja, kar mora biti označeno na spremnem dopisu. Na ta način je povečana možnost pravilnega poteka preiskave, hkrati pa pripomore k varnosti delavcev v laboratoriju. Če ni posebnih navodil, se opravi splošna mikološka preiskava (po shemi). Kandidoza je najbolj pogosta pri pticah, kjer je prizadeta sluznica ustne votline, požiralnika in golše. Površinske poškodbe sluznice prebavnega trakta so opisane pri prašičih in žrebetih. Sistemske okužbe so znane pri govedu, teletih, ovcah in žrebičkih, kar je navadno posledica dolgotrajnega antibiotičnega zdravljenja ali aplikacije kortikosteroidov. Izjemoma lahko povzroča tudi artritis pri konjih in mastitis ter abortus pri kravah.

Postopek z vzorci

Kožni vzorci

Koža: Pred odvzemom vzorca prizadeto področje očistimo s 70% alkoholom. Aktivni rob ali rano podrgnemo s skalpelom ali robom predmetnega stekelca, ostružke pa shranimo v sterilni petrijevki.

Nohti: Noht obrišemo z v alkoholu namočeno krpo, nato pa z vatenko temeljito podrgnemo po področju, kjer je infekcija najbolj sveža.

Koža in dlaka: Okužene dlake **populimo** (ne postrizemo) s področja aktivnega roba.

Eksudat, gnoj

Vzorec moramo najprej mikroskopsko pregledati na prisotnost granul. Če jih najdemo, jih temeljito speremo z destilirano vodo, stremo s sterilno stekleno paličko in sadimo na ustrezno gojišče. Če jih ni, pregledamo vzorec na prisotnost hif in drugih glivnih elementov ter po potrebi sadimo na ustrezno gojišče.

Oči

Glivna kultura iz oči je najbolj uspešna, kadar material nanese na gojišče že oftalmolog.

Blato

Zaradi številnih kontaminantov blato redko pregledujemo na prisotnost gliv. Kadar pa se kljub temu odločimo za preiskavo, je le-ta usmerjena le na glive iz rodu *Candida*. Množična rast gliv v čisti kulturi ima lahko diagnostični pomen.

Tkiva

Tkivo mora biti seseklano s skalpelom ali zdrobljeno v tarilnici. Če je potrebno, dodamo manjšo količino sterilne fiziološke raztopine. Pri infekciji z zigomicetami mora biti material sesekljan in ne zmlet, da ne poškodujemo vitalnih delov gliv. Direktna mikroskopska preiskava je najbolj uspešna, če pripravimo tanko parafinsko rezino in baravamo z eno izmed metod za histološko barvanje gliv. Najpogosteje se uporablja srebrenje po Grocottu (Grocott methenamin silver oz. GMS). Podkožno tkivo mora biti dobro preiskano na granule; če so granule prisotne, morajo biti obdelane tako, kot je opisano v poglavju za eksudat in gnoj.

Urin

Urin moramo zbrati v sterilni posodi, najbolje je vzorec odvzeti s cistocentezo ali kateterizacijo, lahko pa tudi srednji curek prvega jutranjega urina. V laboratoriju ga centrifugiramo 15 minut pri 2 000 obr./min., supernatant odlijemo in približno 0,1 ml sedimenta sadimo na gojišče. Kapljico sedimenta damo na predmetno stekelce, pokrijemo s pokrovnim stekelcem in preiščemo mikroskopsko.

Mleko

Kadar gre za mastitis, je vzorec izloček (mleko) obolele vimske četrti.

Drugi vzorci

Kvasovke ugotavljamo tudi v brisih z delovnih površin v živilskih obratih in v krmi za živali.

Hranjenje vzorcev

Vzorci pred preiskavo hranimo v hladilniku (do +6°C). Preiskavo začnemo še isti dan, ko so vzorci prispeli v laboratorij.

GOJIŠČNA PREISKAVA ZA KANDIDE

Potek preiskave je odvisen od anamneze oz. vrste pričakovanega povzročitelja, oblike vzorca in posebnih zahtev naročnika preiskave. Potek preiskave odreja specialist - mikolog.

Klinični material nasadimo na trdna gojišča (krvni agar, Sabouraud dekstrozni agar s penicilinom in streptomycinom, po potrebi tudi na SDA brez antibiotikov ali SCA) in inkubiramo 3-5 dni pri 37°C. Način nasajanja je enak kot pri bakteriološki preiskavi.

Kadar med preiskavo slučajno opazimo kolonije, značilne za dermatofite, ploščo s kulturo prestavimo v termostat s temperaturo 26°C in preiskavo nadaljujemo na način, ki je opisan v navodilu za preiskavo na dermatofite.

Preostali material uporabimo za direktno mikroskopsko preiskavo kužnine tako, da ga na tanko razmažemo po predmetnem stekelcu, ga osušimo in fiksiramo nad plamenom. Barvamo po Gramu in/ali Löfflerju in ugotavljamo prisotnost in morfološke lastnosti mikroorganizmov.

Večina kvasovk iz rodu *Candida* zraste že po enem dnevu inkubacije, kvasovke iz rodu *Malassezia* (in nekatere druge vrste) pa zrastejo po 3-5 dneh. Značilne kolonije presadimo na sveže gojišče (SDA), da dobimo čisto kulturo za nadaljnje preiskave.

Opišemo makroskopske in mikroskopske morfološke lastnosti kvasovke in se na podlagi tega odločimo za način nadaljnje identifikacije. Kvasovke iz rodu *Candida* so okrogle, ovalne, izjemoma tudi podolgovate oblike in jih determiniramo z enim od komercialnih biokemijskih setov, npr. API 20 C ali API Candida.

Rast kvasovk na Chrom agarju

Chrom agar je komercialno pripravljeno diferencialno gojišče (BBL CHROMagar Candida) za determinacijo kvasovk. Primerno je predvsem za determinacijo sevov iz rodu *Candida*, v katerem so tudi vrste, ki so pomembne v veterinarski mikrobiologiji. Gojišče je pripravljeno v gotovi obliki in tako primerno za inokulacijo.

Gojišče z vodoodpornim pisalom razdelimo na več kvadrantov (navadno 4) in z bakteriološko zanko precepimo preiskovane kolonije. Inkubiramo 24-48 ur oz. toliko časa, kolikor kvasovka običajno potrebuje za rast. Temperatura inkubacije je 37°C, razen če ni določeno drugače. Kvasovke determiniramo glede na strukturo, obliko in barvo kolonij:

- *Candida albicans*: zelene gladke kolonije
- *Candida tropicalis*: modre gladke kolonije
- *Candida krusei*: roza hrapave kolonije
- *Candida glabrata*: roza gladke kolonije



Kromogeno gojišče za determinacijo kvasovk

Kolonije imajo specifično

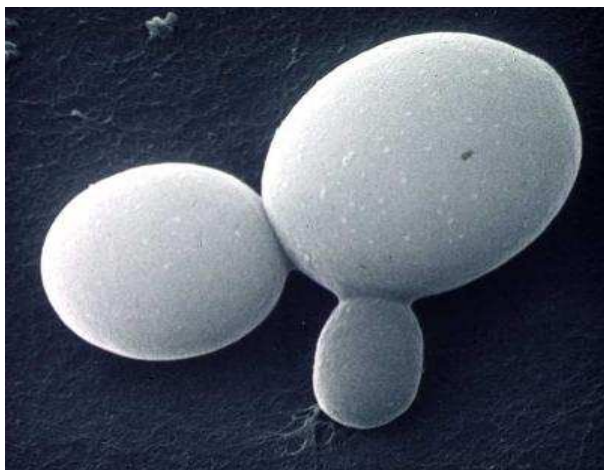
- barvo
- obliko
- velikost

Primer uporabe komercialno pripravljenega kompleta za biokemijsko detrmnacijo kvasovk

POKRITA KAPLJICA

Ker so kvasovke relativno velike celice z jasno izraženo obliko, jih pogosto pregledujemo v pokriti kapljici.

- Na predmetno stekelce kanemo kapljico fiziološke raztopine ali laktofenola.
- S sterilno bakteriološko zanko se dotaknemo preiskovane kolonije in material suspendiramo v kapljici tako, da dobimo zelo redko suspenzijo (0,5-1 Mc Farland).
- Suspenzijo pokrijemo s pokrovnim stekelcem in s filtrirnim papirjem popivnamo morebitno odvečno tekočino.
- Preparat preiščemo najprej pri manjši (400-kratni) in nato pri večji (1000-kratni) povečavi s svetlobnim mikroskopom. Pri mikroskopiranju spustimo kondenzor, ker je tako oblika celic bolj izrazita.
- Po presoji strokovnjaka, preparat preiščemo tudi v faznem kontrastu ali temnem polju.



Kvasovka *Candida albicans*

Celica z brstom, ki je še pripet na materinsko celico (elektronski mikroskop)



Kvasovka *Candida albicans*

Pseudohife in klamidospore

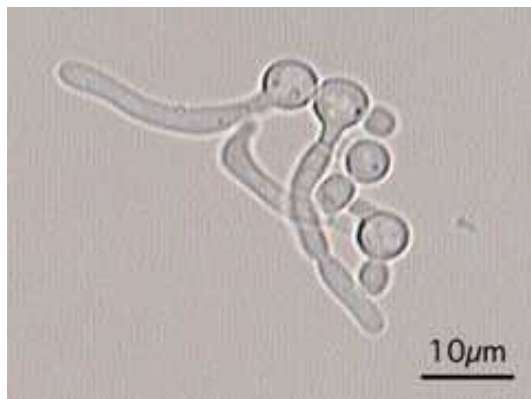
TEST KALJENJA SPOR (GERMINACIJE)

Test germinacije uporabljamo za dokazovanje vrste *Canida albicans*.

- Del preiskovane kolonije posnamemo s sterilno bakteriološko zanko in jo suspendiramo v 0,5 ml seruma. Optimalno število je 10^5 - 10^6 celic na mililiter. Večja koncentracija inokuluma povzroči signifikanten padec deleža kalečih spor. Humani serum je prav tako uporaben kot živalski serumi ali različna gojišča s serumom.
- Suspenzijo inkubiramo pri 35-37°C do 3 ure.
- Po inkubaciji s sterilno pipeto kanemo kapljico suspenzije na predmetno stekelce in pokrijemo s pokrovnim stekelcem. Morebitno odvečno tekočino popivnemo s filtrirnim papirjem.
- Preparat pregledamo s faznim kontrastom pod svetlobnim mikroskopom.
- Posamezne celice kvasovk imajo kalčke (izrastke v obliki cevčic), kar je značilno za *C. albicans*. Nekateri sevi *C. tropicalis* lahko oblikujejo lažne kalčke, vendar za to potrebujejo 3 ure inkubacije ali celo več.

Opozorilo: Vsako serijo seruma najprej preizkusimo z znanim sevom *Candida albicans*.

Klice so videti kot filamenti, ki so ob ostanku spore, iz katere so skalili, nekoliko zadebeljeni, na koncih pa zoženi.



Test kaljenja spor

TEST NASTANKA KLAMIDOSPOR

Test uporabljamo za dokazovanje sposobnosti nekaterih kvasovk, da oblikujejo klamidospore.

- Na gojišče za klamidospore inokuliramo preiskovano kulturo tako, da potegnemo z bakteriološko zanko 3 vzporedne reze približno 1 cm narazen. Rez naredimo pod kotom približno 45° glede na površino gojišča (za nastanek klamidospor je bolj ugodna atmosfera z manj kisika).
- Inkubiramo 2-4 dni pri temperaturi 30°C.
- Kulturo prekrijemo s pokrovnim stekelcem in preparat preiščemo najprej pri manjši (400-kratni) in nato pri večji (1000-kratni) povečavi s svetlobnim mikroskopom.

Klamidospore vidimo kot okrogle debelostene tvorbe na vrhu pseudohif. Poleg so lahko tudi grozdi manjših blastospor.

DETERMINACIJA KVASOVK

Determinacija kvasovk s sistemom Api 20 C

Priprava stripa

Pripravimo škatlo za inkubiranje, ki je sestavljena iz spodnjega dela in pokrova. V spodnji del s satastim dnom nalijemo 5 ml vode in jo enakomerno razporedimo po posameznih jamicah. Nanj položimo strip, ki ga vzamemo iz zavitka tik pred začetkom preiskave. Na levi strani spodnjega dela škatle je prostor, kamor vpišemo protokolno številko preiskovanega vzorca oziroma oznako kulture in datum.

Priprava inokuluma

Odpremo ampulo za pripravo suspenzije (Suspension medium št. 70 600 ali NaCl 0,85 2006 ali 2 ml sterilne fiziološke raztopine). Posnamemo 1 kolonijo in naredimo suspenzijo z gostoto 2 po McFarlandu (ATB 1550 densitometer).

Za določitev morfoloških lastnosti prenesemo 1 kapljico suspenzije na gojišče RAT in 2 kapljici v serum za test germinacije.

Približno 3 kapljice (ali 100 µl) suspenzije pa prenesemo v ampulo C medium in s pipeto dobro premešamo.

Pazimo, da ne nastajajo mehurčki.

Inokulacija stripa

S Pasteurjevo pipeto inokuliramo vsako jamico tako, da se s konico dotaknemo stranske stene in spustimo vanjo toliko suspenzije, da je napolnjen le spodnji, zaprti del.

Prvih 8 tubic (od GLU do MEL) napolnimo le do vrha tubice (ne odprte kupole) in nato prelijemo z mineralnim oljem.

Teste od O do ACT napolnimo cele (tubice in kupole). Pazimo, da je površina olja ravna (ne konveksna in ne konkavna), sicer lahko pride do napak pri odčitavanju rezultatov.

Inkubiramo pri 30-37°C.

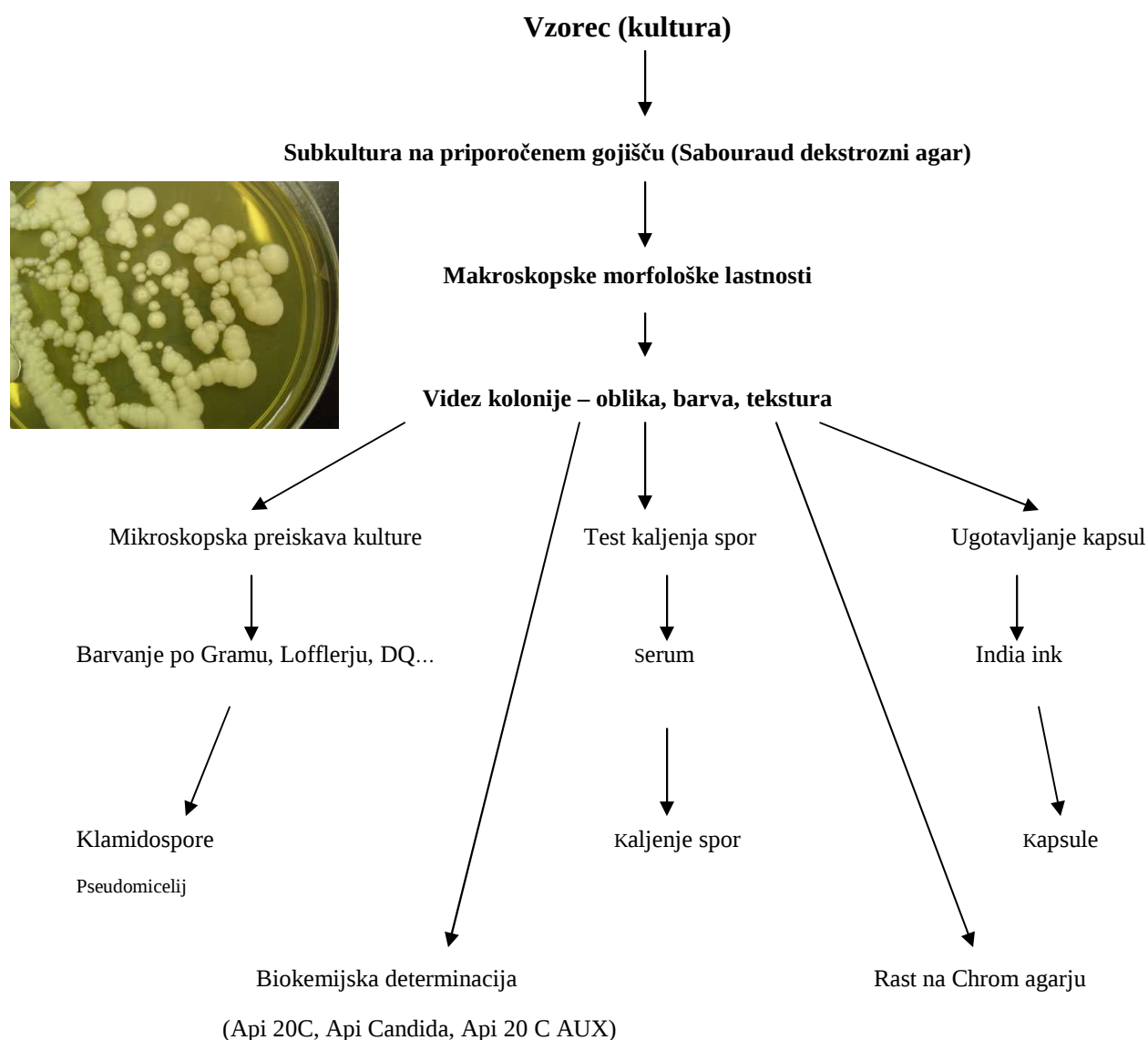
Odčitavanje rezultatov

Po 24 urah inkubacije opravimo prvo odčitavanje s pomočjo posebne tabele, ki je priložena. Rezultati za aktidion morajo biti odčitani po 24 urah. Če suspenzija v testnih tubicah ni dobro zgoščena (predvsem glukoza), inkubiramo še 24 ur, nato pa opravimo končno odčitavanje in vrednotenje rezultatov.

Tabela 9: Tabela za odčitavanje rezultatov biokemijskih reakcij (Api 20 C)

	TEST	POZITIVNO	NEGATIVNO
GLU GAL MAL SAC LAC RAF TRE MEL	GLUKOZA GALAKTOZA MALTOZA SAHAROZA LAKTOZA RAFINOZA TREHALOZA MELIBIOZA	RUMENA mehurčki v tubici pomenijo proizvodnjo plina	ŠKRLATNA
O	KONTROLA	MOTNO	PROSOJNO
INO GLU GAL MAL SAC LAC RAF TRE MEL CEL	INOZITOL GLUKOZA GALAKTOZA MALTOZA SAHAROZA LAKTOZA RAFINOZA TREHALOZA MELIBIOZA CELOBIOZA	rjave črte so nevidne ali slabo vidne (potrebna je primerjava s kontrolno tubico)	rjave črte so vidne tako kot v kontrolni tubici Kadar je suspenzija pregosta vidimo rahlo motnost v vseh tubicah, kar lahko moti interpretacijo rezultatov
ACT	Odpornost proti aktidionu (cikloheksimidu)		

Splošna shema za determinacijo kvasovk



Kadar sumimo na prisotnost specifičnih povzročiteljev, je preiskava nekoliko modificirana in prilagojena lastnostim pričakovanega povzročitelja. Postopki posebnih preiskav so opisani v prejšnjih poglavjih pri posameznih povzročiteljih bolezni (npr. okužba s kvasovko *Cryptococcus neoformans* v poglavju o kriptokokozi).

PREISKAVA NA KVASOVKO *MALASSEZIA PACHYDERMATIS*

Malassezia pachydermatis (sinonim *Pityrosporum pachydermatis*, *Pityrosporum canis*) je lipofilna kvasovka, ki jo najdemo predvsem pri psih in mačkah, najpogosteje v zunanjem

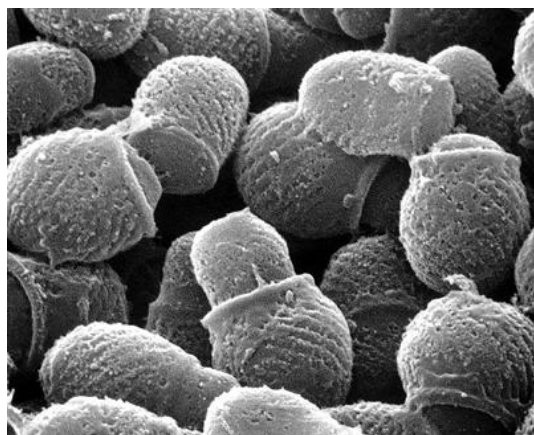
sluhovodu ali na koži, kjer je večja koncentracija maščobnih snovi. Povzroča blaga do zmerna vnetja, pogosto tudi skupaj z različnimi bakterijskimi povzročitelji ali drugimi glivami.

Način odvzema vzorca je odvisen od mesta obolenja, najpogosteje pa je bris zunanjega sluhovoda (cerumen, vnetni eksudat), bris kože ali sluznic. Lahko vzamemo tudi odtis s predmetnico za kasnejšo mikroskopsko preiskavo ali odtis z gojiščem za izolacijo povzročitelja (kadar anatomske posebnosti to dopuščajo, npr. na ravni površini kože).

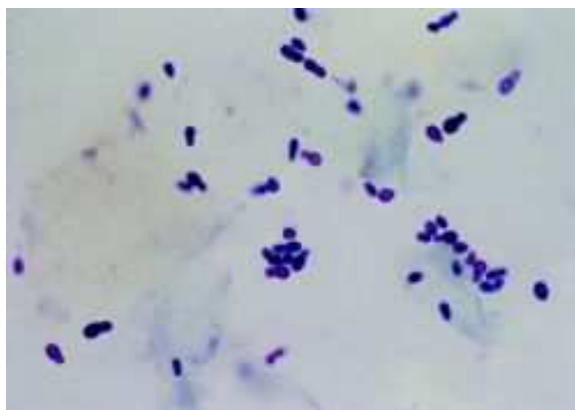
Direktna preiskava

Material enakomerno (ne predebelo) nanese na predmetnico in posušimo na zraku. Preparat lahko rahlo fiksiramo nad ognjem ali z metanolom, ni pa nujno. Lahko ga obarvamo na različne načine, npr. enostavno barvanje z metilenskim modrilom, barvanje po Gramu, Diff Quik, ali katerokoli drugo enostavno barvanje.

Pri kvasovkah iz rodu *Malassezia* postavimo diagnozo na osnovi značilnih kolonij (zrastejo po 2-3 dneh, sprva so drobne bele, nato pa večje, mazave, nežno krem barve in z značilnim vonjem po kvasu). Diagnozo potrdimo na podlagi mikroskopskih morfoloških lastnosti celic (podolgovate celice z monopolarnim brstenjem, velikosti 3-5 μm). Običajno pripravimo samo pokrito kapljico (tako kot pri kandidah), lahko pa jih tudi obarvamo. Nadaljnje biokemijske determinacije navadno ne opravljamo, možna pa je s sistemom Api 20 C, vendar vrsta ni zajeta v analitičnem indeksu.



Malassezia sp. (elektronski mikroskop)
Značilni ovratnik med materinsko in hčerinsko celico



Malassezia sp. (optični mikroskop)
Ovalne kvasovke z značilnimi brsti

PREISKAVA NA KVASOVKO *CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS*

Kvasovka povzroča kriptokokozo pri različnih vrstah domačih živali in človeku. Večinoma se pojavlja podkožna in generalizirana oblika, potek pa je pogosto kroničen. Prizadeti so lahko različni organi, največkrat možgani, meninge, pljuča in koža, do okužbe pa najpogosteje pride z vdihavanjem oz. preko poškodovane kože. Za okužbo so bistveno bolj dovzetni osebki z zmanjšano imunsko sposobnostjo.

Barvanje z barvilom India Ink

Barvanje je uporabno, kadar že po anamnezi in klinični sliki sumimo, da gre za kvasovko *Cryptococcus neoformans*. Vzorec odvajamo na mestu, kjer je izražen patološki proces, običajno eksudat, bris ali del tkiva. Kadar preiskujemo cerebrospinalno tekočino, jo je pred preiskavo priporočljivo centrifugirati in nato pregledati sediment.

Za barvanje uporabljamo komercialno pripravljeno barvilo India Ink.

- Na predmetno stekelce kanemo kapljico barvila
- S sterilno bakteriološko zanko posnamemo del preiskovanega materiala (ali kolonije) in ga suspendiramo v barvilu.
- Suspenzijo pokrijemo s pokrovnim stekelcem in s filtrirnim papirjem popivnamo morebitno odvečno tekočino.
- Preparat preiščemo najprej pri manjši (400-kratni) in nato pri večji (1000-kratni) povečavi s svetlobnim mikroskopom.

Tipične celice *C. neoformans* so okrogle, navadno z brsti, obdane s široko kapsulo.



Cryptococcus neoformans

- okrogle kvasovke z brsti in debelo kapsulo
- obarvano z barvilom india ink, ki zapolni prostor med kvasovkami (temno obarvanje), kapsula pa ostane neobarvana (svetlo polje okrog kvasovke)

Izolacija povzročitelja

Za izolacijo uporabljamo Sabouraudov dekstrozni agar brez dodatka cikloheksimida. Kulturo inkubiramo pri 25°C ali 37°C, vendar bolje raste pri višji temperaturi. Kolonije so vidne že po 48 urah inkubacije, vendar kultura praviloma dozori po 1 tednu.

Kolonije so sprva bele do rahlo krem barve, kasneje pa svetlo rumene do svetlo rjave barve.

Glede na sposobnost stvarjanja kapsule ločimo dva tipa: kapsularni in akapsularni tip. Pri kapsularnem tipu so kolonije sočne, izbočene in vlažne, pri akapsularnem tipu pa bolj suhe in ploščate.

Mikroskopski pregled kulture opravimo na enak način kot pri pregledu kužnine. Celice so okrogle ali rahlo ovalne oblike, velikosti 4-8 µm in pogosto z vidnim brstom. Prisotnost kvasovk z močno izraženo kapsulo je zelo karakteristična, vendar je diagnozo potrebno potrditi tudi z biokemijsko preiskavo kulture.

PREISKAVA NA KVASOVKE IZ RODU *HISTOPLASMA*

Glive izrodu *Histoplasma* spadajo med dimorfne glive in povzročajo sistemske mikoze pri živalih in ljudeh. Opisana je samo vrsta *H. capsulatum* ima 3 variacije in sicer *H. capsulatum* var. *capsulatum*, ki povzroča klasično histoplazmozo, *H. capsulatum* var. *farciminosum* konjsko smrkavost in *H. capsulatum* var. *duboisii*, ki povzroča afriško smrkavost oz. afriško histoplazmozo. Najpomembnejša lastnost teh gliv je, da obstajajo v parazitski fazi v obliki kvasovk in saprofitski fazi v obliki plesni.

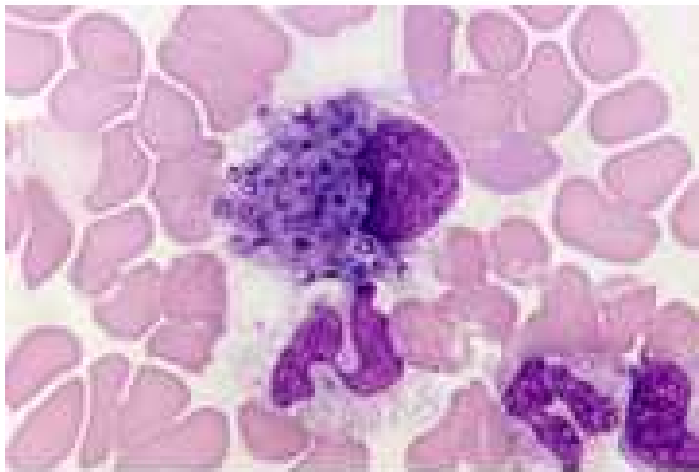
H. capsulatum* var. *capsulatum

Gliva lahko predstavlja del normalne mikroflore tal, predvsem na področjih, kjer je visoka vlaga in so tla kontaminirana s ptičjimi iztrebki, bogatimi z dušikom.

V naravi in na umetnih gojiščih (inkubiranih pri 25-30°C) raste v obliki micelija s septiranimi hifami in sporami v obliki mikrokonidijev in makrokonidijev. Mikrokonidiji so drobni (2-4 µm), jajčaste ali hruškaste oblike. Makrokonidiji pa so večji (8-14 µm), ovalne oblike z debelo steno, na kateri so izboklinice in spominjajo na cvetove sončnic. V tkivu pa so v obliki ovalnih kvasovk, ki so večinoma fagocitirane v makrofagih.

Direktna mikroskopska preiskava

Mikroskopske razmaze pripravimo iz eksudata ali sputuma in jih obarvamo po Giemsi ali Diff-Quiku. Glive so videti kot kvasovke, velikosti 2-3 µm- krat 3-4 µm.

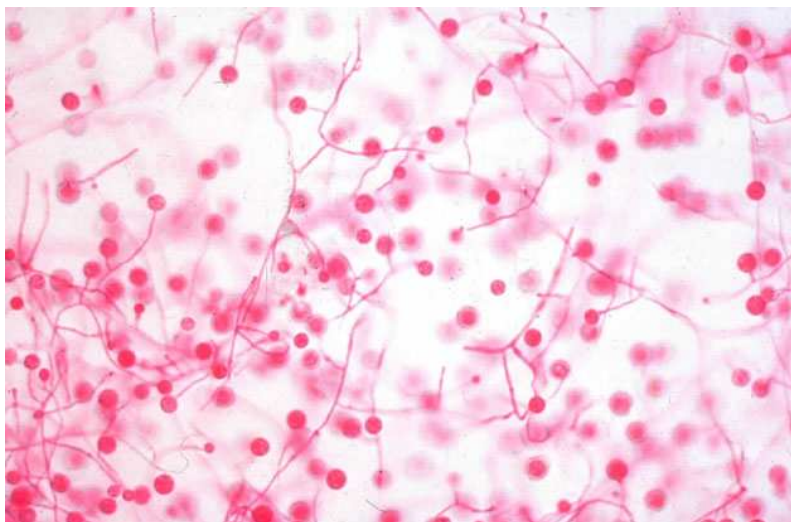


Krvni razmaz

Številne celice *H. capsulatum*
v makrofagu

Izolacija povzročitelja

Za izolacijo je potrebno bogato hranilno gojišče, npr. BHIA (brain heart infusion agar) ali gojišče za glive, npr. Sabouraudov agar. Če kvasovke inkubiramo pod parazitskimi pogoji (37°C) na posebnem gojišču, bogatem s proteini, gliva zraste v obliki kvasovk nepravilnih oblik. Če pa material inkubiramo pod saprofitskimi pogoji (npr. 25-30°C), gliva zraste v obliki plesni in vidimo hife s številnimi konidiji.



Mikrokonidiji *H. capsulatum*

Splošni varnostni ukrepi pri delu v mikološkem laboratoriju

- Delo z glivami opravljamo na posebnem mestu (v mikološkem laboratoriju), kjer je najmanjša možnost kontaminacije prostora (zraka in opreme) in delavcev. Posebno pozorni moramo biti, kadar delamo s kulturami plesni, ki so navadno zelo prhke. Kadar pa izoliramo tudi ali samo kvasovke se držimo enakih navodil kot za delo z bakterijami
- Za kultiviranje so bolj primerne epruvete ali stekleničke, kjer je manjša možnost raznosa materiala kot pri delu s petrijevki. Petrijevke nikdar ne uporabljamo za hranjenje in razpošiljanje materiala.
- Ves kontaminiran material je obvezno treba avtoklavirati.
- Po delu z glivičnim materialom je obvezno treba temeljito oprati roke in jih razkužiti v antimikotičnem pripravku (npr. Zoniton, ki vsebuje enilkonazol).
- Vse delovne površine morajo biti ustrezno razkužene z antimikotikom vsaj enkrat dnevno oziroma po vsakem nasajanju materiala.
- Prepovedano je pipetiranje z usti. **Glivne kulture nikdar ne smemo ovohavati oziroma jo držati v neposredni bližini obraza.** Kulturo v petrijevki odpiramo samo, kadar je nujno potrebno. Če je mogoče, jo pregledamo skozi steklo pokrova, oziroma steklo dna, kadar opazujemo barvo reverza. Kadar kulturo presajamo, dvignemo pokrov petrijevke le toliko, da lahko posnamemo izbrano kolonijo oz. del kolonije. Tako preprečimo raznos posameznih glivičnih elementov po prostoru.
- V prostoru ne smemo kaditi, piti, se ličiti, vstavljati kontaktnih leč oziroma opravljati drugih del, ki bi povečale možnost okužbe.

MIKOLOŠKI SLOVAR	
Aerialni micelij	Zračni micelij, ki raste nad površino gojišča. Sestavljen je iz spleta hif, ki lahko nosijo tudi razplodne tvorbe (fruiting bodies). Nasprotno je vegetativni micelij, ki vrašča v gojišče.
Aflatoksini	Mikotoksini, ki jih izločajo glive iz rodu <i>Aspergillus</i> (predvsem <i>A. flavus</i>). Aflatoksini so zelo toksični, opisani pa so tudi kancerogeni učinki.
Aleuriospore	Nespolne spore dermatofitov
Antropofilni dermatofiti	Parazitske glive, ki jih najdemo predvsem pri ljudeh, oz. je glavni gostitelj človek.
Artrospore	Spore, ki nastanejo s členjenjem (segmentiranjem) septirane hife
Askospore	Haploidne spore, ki nastanejo pri spolnem razmnoževanju askomicet
Ask	Vrečasta tvorba, v kateri nastajao askospore (večinoma 8 v vsakem asku)
Aspergil	Gliva iz rodu <i>Aspergillus</i>
Blastospora, blastokonidij	Spore, ki nastanejo med brstenjem, npr. pri kvasovkah.
Cikloheksimid (=aktidion)	Antimikotična snov, ki jo dodajamo gojiščem, da povečamo selektivnost (npr. inhibiramo rast nekaterih saprofitnih plesni in dopustimo rast dermatofitov).
Dimorfna gliva	Gliva, ki raste bodisi kot kvasovka, bodisi kot plesen (filamentozno). Kot kvasovka raste v parazitski fazi, t.j. v telesu in v kulturi pri 37°C. V micelijski obliki, ki ustreza saprofitni fazi, pa raste v kulturi pri 22°C in v tleh. Dimorfne glive so <i>Histoplasma capsulatum</i> , <i>Sporothrix schenckii</i> , <i>Blastomyces dermatitidis</i> , <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> in <i>Coccidioides immitis</i> .
Dermatofiti	Skupina sorodnih gliv, ki povzročajo dermatofitoze pri človeku in živalih (epidermatofitoza, mikrosporoza, trihofitoza). Dermatofite klasificiramo v tri rodove: <i>Epidermophyton</i> , <i>Microsporum</i> , <i>Trichophyton</i>
Dimorfizem	Pojavljanje v dveh oblikah, dvolikost
Ektotrihni tip	Način glivične okužbe dlake, pri katerem se spore razvijajo na površini dlake
Endotrihni tip	Način glivične okužbe dlake, pri katerem se spore razvijajo v dlačnem deblu
Evkarionti	Organizmi, pri katerih imajo celice jedro in celične organele obdane s posebno membrano. Evkariontski tip celic imajo protozoji, rastline, živali in glive, medtem, ko imajo bakterije prokariontski tip celice.
Favus	Posebna oblika dermatofitoze na glavi, ki jo pri ljudeh najpogosteje povzroča <i>T. schoenleinii</i> . Pri živalih je znan favus perutnine (fowl favus) in miši (murine favus)
Geofilni dermatofiti	Parazitske glive, ki jih najdemo predvsem v zemlji, kjer se tudi razmnožujejo in predstavljajo vir okužbe za ljudi in živali.
Klamidospora	Nespolna spora z odebeljeno celično steno v hifi ali na koncu hife

Konidij	Nespolen tros pri nekaterih glivah, zlasti pri askomicetah. Konidiji se oblikujejo na vrhu konidiofore.
Konidiofora	Specializirana nerazvejana ali razvejana hifa, ki raste iz micelija in nosi konidije.
Makrokonidiji	Velike nespolne spore (aleurispore), včasih z dvema ali več prekati
Micelij	Skupek hif, na katerih se lahko razvijejo razplodna telesca (npr. konidiji)
Micetom	Skupno ime za različne glivične tvorbe v koži in podkožju
Mikrokonidiji	Male spolne spore, enocelične, krajše od 5 μm.
Nepopolne glive	Glive, pri katerih je znan samo nespolni način razmnoževanja (fungi imperfecti).
Oospore	Spore, ki nastajajo pri spolnem načinu razmnoževanja pri oomicetah
Pleomorfizem	Fenomen, pri katerem se fertilni micelij preoblikuje v nefetrtilnega. Pleomorfne kolonije imajo večinoma nežno puhasti izgled.
Polimorfizem	Obstoj dveh ali več oblik znotraj ene skupine
Popolne glive	Glive, pri katerih je znan tudi spolni način razmnoževanja (fungi perfecti)
Pseudomicelij	Lažni micelij, ki ga tvorijo nekatere kvasovke. Od pravega micelija, ki ga oblikujejo plesni, se razlikujejo, ker nimajo sept in nastanejo s podaljševanjem celice kvasovke.
Septum	Prečna stena v hifi
Spolna spora	Spora, ki nastane s fuzijo dveh jeder, čemur sledi mejoza. Poznamo 4 tipe spolnih spor: oospore, zgospore, askospore in bazidiospore
Spora	Razmnoževalna celica, ki nastane pri nespolnem ali spolnem razmnoževalnem procesu
Talus	Vegetativna oblika organizma, ki ni diferencirana za posamezne funkcije
Talospora	Spora, ki nastane s preoblikovanjem ali oddelitvijo od hife, npr. artrospora, blastospora, klamidospora.
Zoofilni dermatofiti	Parazitske glive, ki jih najdemo predvsem pri živalih, oz. za katere so glavni gostitelji živali (npr. <i>M. canis</i> pri mačkah)
Zoospora	Gibljava spora s flagelami

KAZALO	
UVOD	2
NAJPOMEMBNEJŠE MIKOZE PRI DOMAČIH ŽIVALIH	5
MIKOZE PRI PREŽVEKOVALCIH	6
• Dermatofitoze	7
• Trihofitoza	7
• Mikotični mastitis	10
• Mikotični abortus in vaginitis	11
MIKOZE PRI KONJIH	12
• Dermatofitoze	12
• Trihofitoza	13
• Mikrosporoza	14
• Podkožne mikoze	15
• Sistemske mikoze	15
• Kandidoza	15
• Aspergiloza	15
• Kriptokokoza	16
• Epizootski limfangitis	16
MIKOZE PRI PRAŠIČIH	17
• Dermatofitoze	17
• Kandidoza	18
MIKOZE PRI PSIH IN MAČKAH	19
• Dermatofitoze	19
• Mikrosporoza	19
• Trihofitoza	20
• Okužbe s kvasovkami	21
• Kandidoza	21
• Malasezioza	22
• Sistemske mikoze	26
• Kriptokokoza	26
MIKOZE PRI PERUTNINI	27
• Dermatofitoze	28
• Favus	28
• Aspergiloza	28
• Okužbe s kvasovkami	30
• Kandidoza	30
• Kriptokokoza	31

MIKOZE PRI GLODALCIH IN DIVJIH ŽIVALIH	32
• Dermatofitoze	32
• Okužbe s kvasovkami	33
• Aspergiloza	33
• Zigomicetoze	34
MIKOZE PRI RIBAH	34
• Saprolegnioza	34
LASTNOSTI IN LABORATORIJSKA DIAGNOSTIKA NAJPOMEMBNEJŠIH POVZROČITELJI ŽIVALSKIH MIKOV	36
• Osnovne značilnosti dermatofitov	37
• Preiskava na dermatofite	40
• Vzorčenje	41
• Mikroskopska preiskava dlake	42
• Gojiščna preiskava	44
• Interpretacija rezultatov	46
• Preiskava na aspergile	46
• Preiskava na kvasovke	49
• Vzorčenje	49
• Gojiščna preiskava za kandidate	50
• Pokrita kapljica	52
• Test kaljenja spor	53
• Test nastanka klamidospor	54
• Determinacija kvasovk	54
• Preiskava na kvasovko <i>Malassezia pachydermatis</i>	56
• Preiskava na kvasovko <i>Cryptococcus neoformans</i>	58
• Preiskava na kvasovke iz rodu <i>Histoplasma</i>	59
SPLOŠNI VARNOSTNI UKREPI V MIKOLOŠKEM LABORATORIJU	61
MIKOLOŠKI SLOVAR	62
KAZALO	64