

ПРВИ СЛУЧАЈ ИЗОЛАЦИЈЕ *MALASSEZIA GLOBOSA* КОД НАС

Валентина АРСИЋ-АРСЕНИЈЕВИЋ¹, Даница МИЛОБРАТОВИЋ², Александар ЦАМИЋ¹,
Сања МИТРОВИЋ¹, Ивана РАДОЊИЋ¹, Љубица ПЕТКОВИЋ¹, Ивана КРАЊЧИЋ-ЗЕЦ¹

1. Лабораторија за микологију, Институт за микробиологију и имунологију, Медицински факултет, Београд;
2. Клиника за кожне и полне болести, Војномедицинска академија, Београд

КРАТАК САДРЖАЈ: Данас гљиве рода *Malassezia* обухватају седам врста: *M. furfur*, *M. sympodialis*, *M. obtusa*, *M. globosa*, *M. restricta*, *M. slooffiae* и *M. pachydermatis*, али улога појединих врста у патогенези обољења људи још није утврђена. Због тога је изолација и идентификација врста у оквиру овог рода неопходна. У раду је приказан први случај изолације *M. globosa* код нас, код пацијента са клиничком дијагнозом *Pityriasis versicolor*. Идентификација врсте *M. globosa* је извршена на основу макроскопских, микроскопских и биохемијских карактеристика изолованог соја. Изолација је извршена на Лиминг-Нотман (*Leeming-Notman*) агару (ЛНА) и модификованом Диксон (*Dixon*) агару, на температури од 35°C у току седам дана, под аеробним условима. Изоловани сој је показивао следеће биохемијске карактеристике: каталаза (+), липаза (+), док су способности разградње ескулина и асимилације појединачних твинова (*Tween* – 20, 40, 60 и 80) биле негативне. *M. globosa* је липофилна квасница из рода *Malassezia* и код већине људи чини део физиолошке микрофлоре коже. Под утицајем одређених предиспонирајућих фактора *M. globosa* може да утиче на развој неколико дерматоза: *Pityriasis versicolor*, *Malassezia folliculitis*, себороични дерматитис, атопијски дерматитис. Код имунокомпромитованих особа и новорођенчади може да узрокује и фаталне системске инфекције. С обзиром на то да улога појединих врста у оквиру рода *Malassezia* као узрочника обољења коже још није утврђена, предложена је изолација и идентификација ових гљивица као део лабораторијске дијагностичке процедуре кожных обољења.

Кључне речи: *Malassezia globosa*, *Pityriasis versicolor*, лабораторијска дијагноза.

УВОД

Malassezia globosa је липофилна квасница која припада гљивама рода *Malassezia*. Део је нормалне микрофлоре коже и најчешће се може изоловати са главе, груди и леђа здравих особа. Међутим, данас се *M. globosa* све чешће изолује у свету [1], посебно код болесника са себороичним дерматитисом и *Pityriasis versicolor*.

У раду је приказан болесник са *Pityriasis versicolor* код кога је изолована и идентификована *M. globosa*, што је први случај изолације ове гљиве у нашој земљи.

ПРИКАЗ БОЛЕСНИКА

Болеснику, мушкарцу старости 70 година, пре 40 година је, на основу клиничких карактеристика и амнестичких података, постављена клиничка дијагноза *Pityriasis versicolor*. У више наврата пацијент је лечен локално антимикотицима и кортикостероидима, што је довело до привременог повлачења кожных лезија. У терапији су коришћени: *Novofungin*, *Sinoderm*, *Daktanol*, *Cansen* и *Panolon*. Последња терапија је спроведена месец дана пре прегледа, а болесник је дао податак да су у последњих неколико дана лезије на кожи трупа и надлактица постале бројније и веће, са интензивнијим сврабом.

Објективно, при прегледу на кожи груди, рамена, горње половине леђа и надлактица уочене су бројне, ограничене, округле и овалне, мрке макуле од којих су се неке сливале у велике плаже прекривене прашинастим сквамама, а биле су присутне и ређе хипопигментоване макуле (Слика 1).

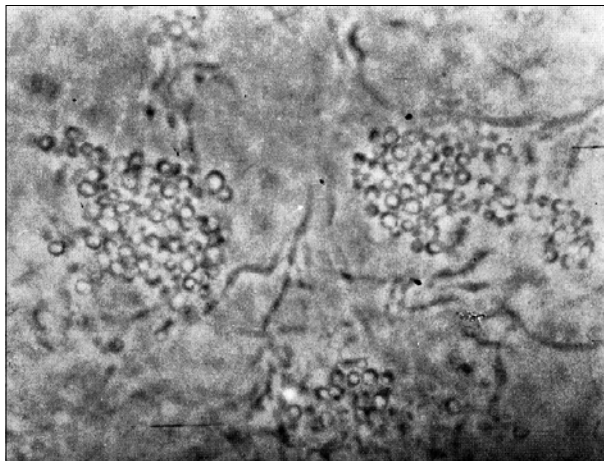
У Лабораторији за микологију, на Институту за микробиологију и имунологију Медицинског факултета у Београду, потврђена је клиничка дијагноза овог обољења изолацијом гљива. Директним микроскопским прегледом струготина са лезија на кожи, у препарату са хлорал-лакто-фенолом, уочене су епителне ћелије са масом бластоспора гљива које су биле груписане у гроздове, са лучно савијеним хифама (Слика 2).

Материјал добијен благим стругањем коже стерилном киретом засејан је паралелно на три хранљиве подлоге: Сабуро (*Sabouraud*) декстрозном агару (СДА) (Торлак, Београд) са хлорамфениколом, Лиминг-Нотман (*Leeming-Notman*) агару (ЛНА) (бактериолошки пептон 10 g, глукоза 5 g, квашчев екстракт 0,1 g, дехидрирана говеђа жуч 4 g, глицерол 1 ml, гли-



СЛИКА 1. Промене на кожи груди код пацијента са *Pityriasis versicolor* код кога је изолована *M. globosa*.

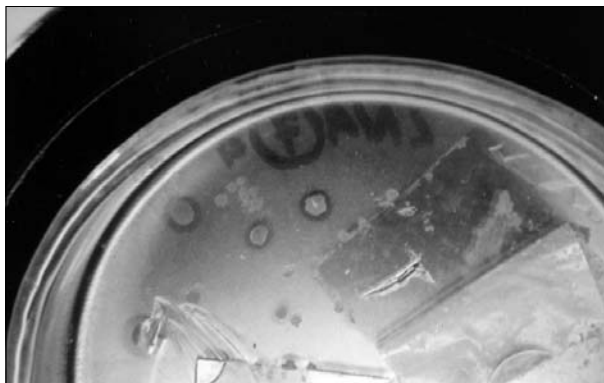
FIGURE 1. Skin lesions in patient with *Pityriasis versicolor* caused by *M. globosa*.



СЛИКА 2. Директни препарат сквама са коже пацијента: уочавају се бластоспоре *M. globosa* у виду гроздова, лучно савијене хифе и епителне ћелије ($\times 100$).

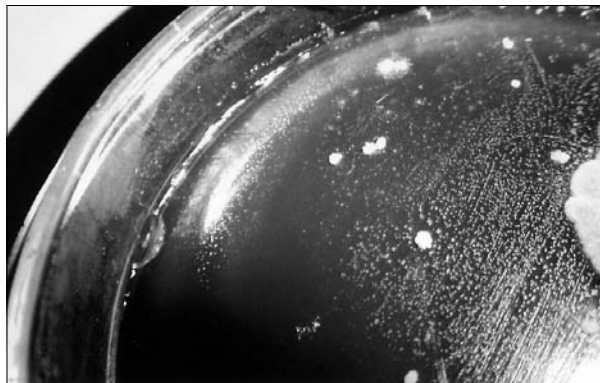
FIGURE 2. Direct wet mount of skin scraping with grape appearance of fungal cells, curved hyphae and epithelial cells ($\times 100$).

церол моностеарат 0,5 g, Tween 60 0,5 ml, млеко 10 ml, агар 12 g, chloramphenicol 50 μ g, cycloheximide 200 μ g) и модификованом Диксон (*mDixon*) агару (миколошки пептон 6 g, малтозни екстракт 36 g, дехидрирана говеђа жуч 20 g, глицерол 2 ml, олеинска киселина 2 ml, Tween 40 10 ml, агар 12 g). Подлоге су припремљене под асептичким условима и разливене у Петријеве шоље промера 90 mm. Подлоге са болесничким материјалом су инкубирани под аеробним условима на температури од 35°C у току седам дана. У току овог инкубационог периода на СДА подлози није дошло до пораста гљива. Након пет дана инкубације на ЛНА подлози су израсле бројне округле беличасте колоније, пречника око 2 mm, равне површине са централним тачкастим испупчењем. Око већих колонија могла је да се уочи зона просветљења (Слика 3). На Диксон агару је дошло до пораста мешане културе. Након пет дана инкубације уочене су колоније гљива сличног изгледа као и колоније гљива на ЛНА, али без зоне просветљења. На овој подлози могле су да се уоче и сит-



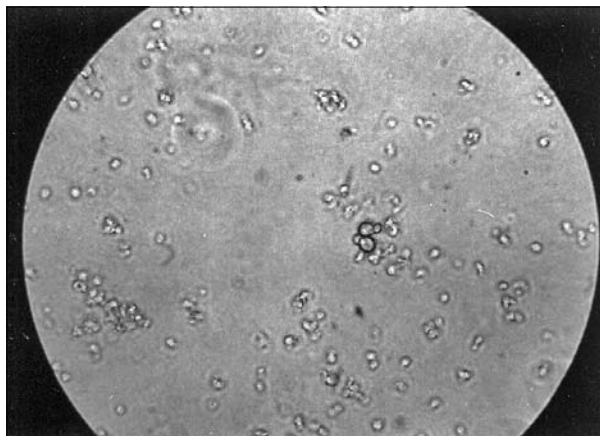
СЛИКА 3. Култура *M. globosa* на Лиминг-Нотман агару. Болеснички материјал је култивисан на температури од 35°C у току седам дана у аеробним условима.

FIGURE 3. Culture of *M. globosa* on LNA medium after incubation on 35°C during seven days in aerobic conditions.



СЛИКА 4. Култура *M. globosa* на модификованом Диксон агару. Болеснички материјал је култивисан на температури од 35°C у току седам дана у аеробним условима.

FIGURE 4. Culture of *M. globosa* on modified Dixon medium after incubation on 35°C during seven days in aerobic conditions.



СЛИКА 5. Директни микроскопски препарат културе са ЛНА подлоге: уочавају се округле ћелије гљива, бластоспоре, пречника око 4 μ m, са пупљењем на уској бази ($\times 100$).

FIGURE 5. Wet mount from the culture on LNA medium with round fungal cells, diameter 4 μ m. Some budding cells on narrow base are seen, characteristic for *M. globosa* ($\times 100$).

није колоније које су идентификоване као бактерије рода *Staphylococcus* (Слика 4).

Микроскопским прегледом културе виделе су се округле ћелије, бластоспоре промера око 4 μ m, од којих су неке показивале пупљење на уској бази (Слика 5). Биохемијским испитивањем изолованог соја утврђена је следећа биохемијска активност гљива: каталаза (+), липаза (+), реакција разлагања ескулина (-) и немогућности асимилације гвинова 20, 40, 60 и 80 као јединих извора липида (-). На основу ових културелних, микроскопских и биохемијских карактеристика, изоловане кваснице су идентификоване као врста *Malassezia globosa*.

ДИСКУСИЈА

Род *Malassezia* обухвата седам врста квасница, од којих је већина липофилна, а микроскопски их карактеришу округле, елипсоидне или цилиндричне ћелије које пупе на једном полу. Донедавно су биле познате само две врсте ових гљива: *M. furfur* (као синоними

коришћени су називи *Pityrosporum ovale* и *P. orbiculare*) и *M. pachidermatis* [2]. Применом техника молекуларне биологије, 1995. године је омогућено разликовање седам врста гљива рода *Malassezia*: *M. furfur*, *M. sympodialis*, *M. obtusa*, *M. globosa*, *M. restricta*, *M. slooffiae* и *M. pachydermatis* [3]. Првих шест врста су липофилне гљиве и за свој раст захтевају специјалне хранљиве подлоге као што су већ поменути модификовани Диксон агар и Лиминг-Нотман агар. Врста *M. pachidermatis* није липофилна и једина може да расте на стандардној миколошкој подлози, на примеру Сабуро агару.

Malassezia globosa је врста са карактеристичном морфологијом колонија и микроскопским изгледом бластоспора. На Лиминг-Нотман агару након 3-6 дана инкубације формирају се беличасте, трошне колоније, пречника 1-1,5 mm, равне површине са централно постављеним тачкастим испупчењем. Микроскопским прегледом виде се округле, „глобозне“ ћелије квасница (ширине 2,5-8 μm), од којих поједине формирају издужене пупољке са уском базом на једном полу. Од биохемијских карактеристика *M. globosa* испољава позитивне реакције каталазе и липазе (C14), а не разлаже ескулин. Према ранијој подели, серолошки одговара сероврсти Б рода *Malassezia* [4]. Према морфологији колонија и бластоспора и биохемијским карактеристикама, сврстана је у биотип 1 рода *Malassezia* [5].

Pityriasis versicolor је хронично обољење које обично захвата горњи део тупа. Карактерише се појавом хипопигментованих и/или хиперпигментованих лезија, са финим перутањем, односно прашинастим сквамама и благим осећајем свраба. Најчешће оболевају адолесценти и особе средњих година, а предиспонирајући фактори су малнутриција, имунодефицијенција, кортикостероидна и контрацептивна терапија, повећана влажност и спољна температура [6]. Испитивањем заступљености појединих врста гљива рода *Malassezia*, код особа са петиријазом, *M. globosa* је изолована код 25-97% пацијената, што указује на то да би *M. globosa* могла бити доминантна врста укључена у патогенезу *Pityriasis versicolor* [7].

С обзиром на то да је род *Malassezia* тек недавно подељен на седам врста, код нас не постоје подаци који би указивали на клинички значај сваке поједине врсте. Ова чињеница намеће потребу да се нова открића у таксономији примене практично и код нас, а пре свега у циљу утврђивања заступљености појединих врста и испитивања њиховог значаја у патогенези појединих обољења. Гљиве рода *Malassezia* имају значаја у различитим областима медицине будући да поред *Pityriasis versicolor* могу да узрокују и *Malassezia folliculitis*, себороиични дерматитис и неке форме атопијског дерматитиса, а код имунодефицијентних особа и недоношчади која су на парентералној исхрани липидним емулзијама могу да доведу до фаталне фунгемије [8, 9]. С друге стране, показана је и различита осетљивост појединих врста рода *Malassezia* на антимицотике (нпр. кетокназол, вориконазол, итраконазол и тербинафин) [8], што додатно

повећава значај изолације и идентификације појединих врста у оквиру рода *Malassezia*. *In vitro* испитивање осетљивости на антимицотике повећава клинички значај изолације ових гљива јер се тиме стварају могућности одабира и примене најефикасније терапије у лечењу оболелих [9].

ЗАКЉУЧАК

На основу првог случаја изолације гљива рода *Malassezia* код нас можемо да закључимо да је лабораторијски поступак за изолацију сложен, не постоје комерцијално доступне подлоге, а процедура инкубације није стандардна, што захтева додатну лабораторијску опрему. Међутим, ова лабораторијска процедура се препоручује у раду референтних миколошких лабораторија за пацијенте са упорним и тешким инфекцијама. Изолација етиолошких агенаса у оваквим случајевима посебно је значајна и због могућности испитивања изолованих сојева на антимицотике [10, 11], као и због добијања епидемиолошких података о учесталости појединих врста рода *Malassezia* у различитим формама болести.

ЗАХВАЛНИЦА

Израду рада ѿмогло је Министарство за науку, шехнолојију и развој Републике Србије, Београд.

ЛИТЕРАТУРА

1. Gueho E et al. The role of *Malassezia* species in the ecology of human skin and as pathogens. *Medical Mycology* 1998; 36, (Suppl 1), 220-9.
2. Kwon-Chung KJ, Bennett JE. Infections caused by *Malassezia* species. In: Lea & Febiger, *Medical Mycology*, Philadelphia, 1992: 170-82.
3. Gueho E, Midgley G, Guillot J. The genus *Malassezia* with description of four new species. *Antonie van Leeuwenhoek* 1996; 69: 337-5.
4. Cunningham AC, Leeming JP et al. Differentiation of three serovars of *Malassezia furfur*. *J Appl Bacteriol* 1990; 68:439-46.
5. Aspiroz C et al. Differentiation of three biotypes of *Malassezia* species on human normal skin. Correspondence with *M. globosa*, *M. sympodialis* et *M. restricta*. *Mycopathologia* 1999; 145: 69-74.
6. Burke RC. *Tinea versicolor*: susceptibility factors and experimental infections in human beings. *J Invest Dermatol* 1961; 36: 389-402.
7. Crespo EV et al. *Mycology of pityriasis versicolor*. *J Mycol Med* 1999; 9: 143-8.
8. Gupta AK et al. *In vitro* susceptibility of the seven *Malassezia* species to ketoconazole, voriconazole, itraconazole and terbinafine. *Brit J Dermatol* 2000; 142: 758-65.
9. Milobratović D, Arsić-Arsenijević V, Džamić A. *Malassezia* species and skin pathology. *J Microbiol Immunol Infect* 2002; 1: 33-36.
10. Arsić V, Mitrović S, Kranjčić-Zec I, Džamić A. Isolates of *Cryptococcus neoformans* serotype A or D resistant to 5-fluorocytosine. *J Chemotherapy* 1995; 7: 90-92.
11. Mitrović S, Kranjčić-Zec I, Mraović M, Šćepan Lj, Arsić V. Disk agar diffusion testing of yeasts - effect of culture media. *J Chemotherapy* 1991; 4:474-476.

THE FIRST CASE OF ISOLATION OF MALASSEZIA GLOBOSA IN OUR COUNTRY

Valentina ARSIĆ-ARSENIJEVIĆ¹, Danica MILOBRATOVIĆ², Aleksandar DZAMIC¹, Sanja MITROVIC¹, Ivana RADONJIC¹,
Ljubica PETKOVIC¹, Ivana KRANJIC-ZEC¹

1. Laboratory of Mycology, Institute of Microbiology and Immunology, University School of Medicine, Belgrade;

2. Clinic of Dermato-sexual Diseases, Military Medical Academy, Belgrade

ABSTRACT

Today is known that genus *Malassezia* includes seven species: *M. furfur*, *M. sympodialis*, *M. obtusa*, *M. globosa*, *M. restricta*, *M. slooffiae* and *M. pachydermatis*, but role of each of the species in the pathogenesis of disease has not been elucidated yet, so further laboratory isolation and identification are necessary.

We report the first case of isolation of *Malassezia globosa* in Serbia (Belgrade), in a patient suffering from Pityriasis versicolor. Identification of *M. globosa* was based on macroscopic, microscopic and biochemical characteristics. Isolation was done on Leeming and Notman medium and on mDixona agar, at 35°C, during 7 days in aerobic conditions. Also the yeast's biochemical phenotype was determined as catalase (+), lipase (+), esculin degradation (-), Tween (20, 40, 60 and 80) assimilation (-).

M. globosa is a lipophilic yeast of the genus *Malassezia* and the common member of the skin flora. In concordance with some predisposing factors *M. globosa* is implicated in the pathogenesis of sev-

eral skin diseases (pityriasis versicolor, *malassezia* folliculitis, seborrheic dermatitis and some forms of atopic dermatitis). In immunocompromised patients and neonates this yeast can even cause fatal systemic infections.

Because the role of *Malassezia* spp. in pathogenesis of skin disease is not still determined, we suggest laboratory diagnosis and identification of these species as a routine diagnostic procedure.

Key words: *Malassezia globosa*, Pityriasis versicolor, laboratory diagnosis.

Valentina ARSIĆ-ARSENIJEVIĆ
Institut za mikrobiologiju i imunologiju
Medicinski fakultet
Dr Subotića 1, 11000 Beograd
E-mail: medparbg@eunet.yu