

Szent István Egyetem Állatorvos-tudományi Kar

Belgyógyászati Tanszék és Klinika

**A *Cyniclomyces guttulatus*, valamint egyéb
sarjadzó gombák előfordulásának vizsgálata
hasmenéses kutyák és macskák bélsarában**

Készítette: Csizmás Máté

Témavezető:

Dr. Pápa Kinga, SZIE-ÁOTK Belgyógyászati Tanszék és Klinika

Budapest

2015

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	4
2. Irodalmi áttekintés	6
2.1. A <i>C. guttulatus</i> jellemzése	6
2.2. A kutyák és macskák béltraktusában élő gombák	8
2.2.1. Tenyésztéses kutatások	8
2.2.2. Molekuláris vizsgálatok	9
2.3. <i>C. guttulatus</i> -szal kapcsolatos esetek.....	10
2.3.1. Nyúl.....	10
2.3.2. Kutya és macska.....	10
3. Anyag és módszertan.....	13
3.1. Mintagyűjtés	13
3.2. Mintafeldolgozás	13
3.3. A minták kiértékelése	14
3.3.1. Morfológiai karakterizálás	14
3.3.2. Tenyésztéses vizsgálatok.....	15
3.3.3. Molekuláris vizsgálatok	16
3.3.4. Biokémiai vizsgálatok.....	18
4. Eredmények.....	19
4.1. A minták mikroszkópos kiértékelése	19
4.2. A tenyésztéses kísérletek eredményei.....	22
4.3. A molekuláris vizsgálatok eredményei.....	26
4.4. A szekvencia-analízis eredményei.....	27
4.5. A cukorasszimilációs vizsgálat eredményei	27
5. Megbeszélés	28
5.1. Esetleírások.....	28
5.1.1. <i>C. guttulatus</i> macskában	28
5.1.2. <i>C. guttulatus</i> kutyában.....	28
5.1.3. Az esetleírások megbeszélése	29

5.2. A mikroszkópos vizsgálat eredményeinek megbeszélése.....	29
5.3. A <i>C. guttulatus</i> előfordulási gyakorisága	30
5.4. A talált sarjadzó gombák áttekintése	31
5.4.1. <i>C. guttulatus</i>	31
5.5.2. <i>Candida</i> fajok	33
5.5.3. <i>Pichia</i> fajok.....	33
5.6. A gombák hatása a gastrointestinalis traktusra.....	35
6. Összefoglalás.....	36
7. Summary.....	37
8. Irodalomjegyzék	38
9. Köszönetnyilvánítás	45

1. Bevezetés

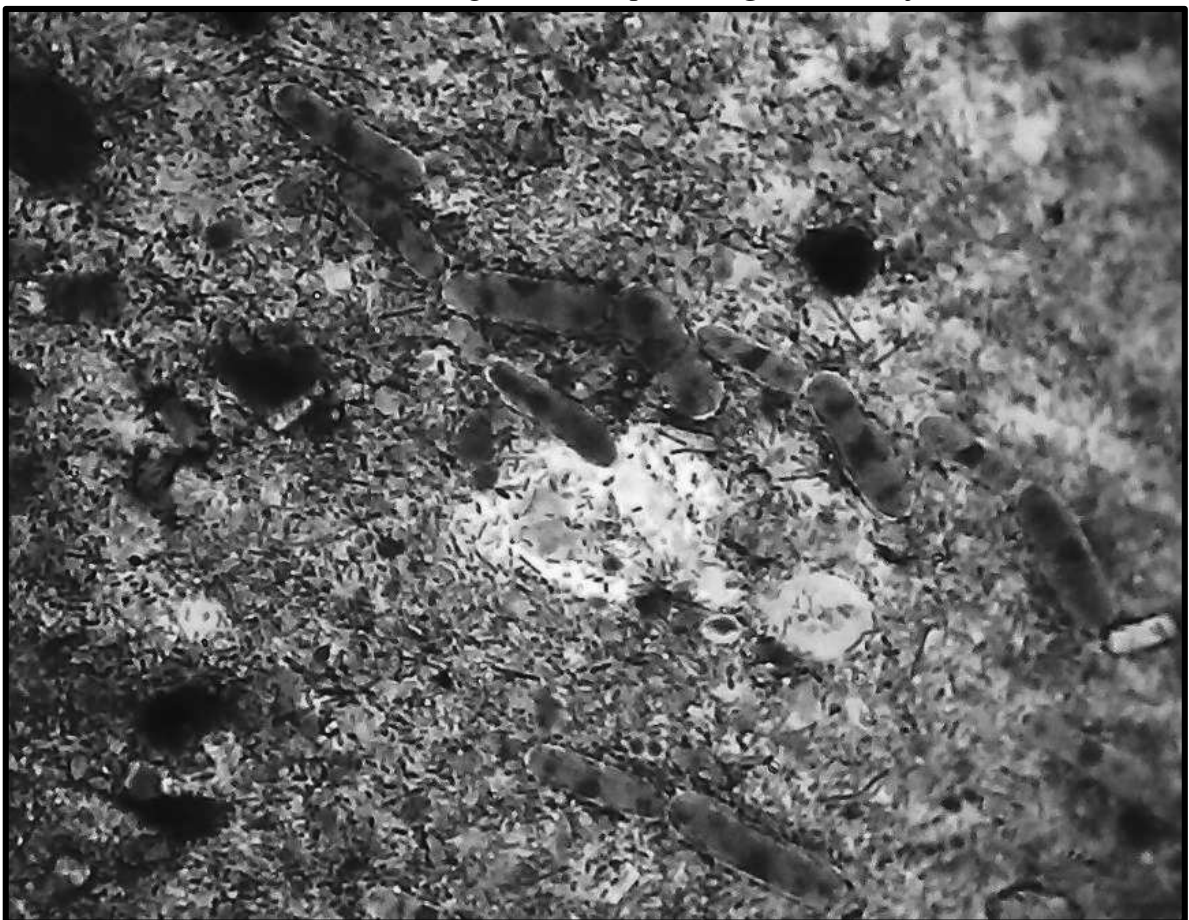
Napjainkban a hasmenéses kutya és macska páciensek az egyik legnagyobb betegcsoportot alkotják, és ezen belül a hasmenés, mint a leggyakoribb tünet sokszor konkrét okhoz nem köthető adott rendelői körülmények között. Gyakoriak a feltételezett diagnózis alapján történő, illetve tapasztalati terápiák, melyek sok esetben elegendőek lehetnek, olykor azonban a probléma nem enyhül vagy visszatér. A kutyák fertőző eredetű hasmenéseinek fő okaként baktériumok, vírusok, egysejtű-, illetve egyéb paraziták jelölhetők meg, melyek többségét mind kóroktanilag, mind kórélettanilag is alaposan vizsgálták már a kutatók, szemben a gombákkal, melyekről jóval kevesebb szakirodalom áll rendelkezésre. Fenn áll az esélye, hogy a sokszor csak mellékleletként számon tartott gombás sejtalakok jelenléte – akár önállóan, akár társfertőzésként, de – hozzájárul az adott betegség kórlefolyásának súlyosbításához.

A témához a kiindulópontot az a 2013 februárjában az Ebcson Belforr Állatorvosi Rendelőbe érkezett, rendszeresen oltott, féreghajtott francia bulldog kan kutya adta, melynek – kórelőzménye szerint – 2012 szeptemberében bélgyulladásos panaszai voltak, barnás-bordó hasmenés kíséretében. A fiatal kutya gyümölcsöt, zöldséget, mindent elfogyasztott, a coprophagia lehetősége is felmerült. Gyógykezelésként az állatnak enrofloxacin és famotidin terápiát, probiotikumokat, valamint bélkímélő diétát (fructo-oligosacharidot tartalmazó tápot) írtak elő. Ettől tünetmentessé vált, de egy hónapra rá visszatért a hasmenés. A állatnál elvégeztük a bélsár citológiai vizsgálatát. A bélsár kenetben, panoptikus festést követően mikroszkópos vizsgálattal nagy mennyiségben mutatkoztak *Cyniclomyces guttulatus* (továbbiakban *C. guttulatus*) vegetatív sejtek és spórák (**1. ábra**). Egyébként az állatot normál összetételű bélfloóra jellemezte kóros sejtalakok nélkül, normál emésztőképességgel. A gombák nagy száma miatt felmerült elsődleges szerepük a hasmenés kiváltásában, emiatt a kutya nystatin kezelésben részesült, aminek hatására meggyógyult. Hasmenéses betegek bélsárának citológiai vizsgálata során, azóta is többször szembesültünk gombák jelenlétével. A *C. guttulatus* patogenitásának pontos hátterét illetően a szakirodalom szerint megoszlanak a vélemények, de Neel és munkatársai (2013) szignifikáns kapcsolatot fedeztek fel a *C. guttulatus* mennyisége és a bélsármintákból kimutatható bakterialis dysbiosis között. Eredményeik alapján mi is fontosnak láttuk, hogy hasmenéses kutyák és macskák bélsármintáiban felmérjük ennek a gombának az előfordulási gyakoriságát.

Felvetettük, hogy a *C. guttulatus* mellett más – nystatinra szintén reagáló – sarjadzó gombák is jelen lehetnek a hasmenéses állatokban, melyek szintén hozzájárulnak a tünetek kialakításához. Az általunk vizsgált mintákban 2 olyan sarjadzó gomba fajt is találtunk, melyeket összefüggésbe hoztak gastrointestinalis megbetegedésekkel, valamint egy olyan élesztő fajt is kimutattunk, melyet – legjobb tudásunk szerint – ez idáig nem írtak le hasmenéses kutyákban. Ezek alapján is az volt a véleményünk, hogy a sarjadzó gombák hasmenésben betöltött kóroktani szerepét és előfordulásukat jobban meg kell vizsgálni.

Emellett szándékunkban állt, hogy a *C. guttulatus*-t kitenyésszük és szintenyészeteiből molekuláris vizsgálatokat végezzünk annak kivizsgálására, hogy a kutyákban megtalált *C. guttulatus* genetikailag azonos-e a nyulakból izolált törzsekkel. Habár ez klinikai szempontból nem esszenciális, mégis fontosnak tartottuk a kutya és a macska, valamint a nyúl vagy egyéb vektorok közötti fertőzés-átvitel járványtani szempontjai miatt.

1. ábra A francia bulldogban talált, spórás *C. guttulatus* sejtalakok.



(bélsár kenet, panoptikus festés, 1000x nagyítás)

2. Irodalmi áttekintés

2.1. A *C. guttulatus* jellemzése

A *C. guttulatus*-t Remak (1845) figyelte meg elsőként, aki nagy, hengeres, vegetatív gombasejteket írt le nyúl és egyes más növényevők bél- és gyomortartalmában, de nem találta meg ragadozókbán, madarakban és hüllőkben sem (Edward és mtsai, 1970). Robin (1853) megerősítette a gomba jelenlétét nyulakban és elnevezte *Cryptococcus guttulatus*-nak, a vegetatív sejtekben található jellegzetes vakuólumok alapján. Winter (1884) később átnevezte *Saccharomyces guttulatus*-ra, majd Schiöning (1903) áthelyezte a fajt a *Saccharomycopsis* nemzetségbe, mint *Saccharomycopsis gutturalata*. Közben Cochet (1940) ilyen gombasejteket figyelt meg kisebb mennyiségben, patkányban és tengerimalacban is. Tengerimalac ürülékében a *C. guttulatus* aszkospóráit (az Ascomycota gombatörzs tagjainak ivaros szaporodással képződő haploid szaporítóképleteit) nagy mennyiségben találta meg. Végül van der Walt és Scott (1971) átnevezték a fajt *C. guttulatus*-ra és elhelyezték a *Saccharomycetaceae* alcsaládban, mint a *Cyniclomyces* nemzetség egyetlen tagját.

Több mint 100 éven keresztül ezt az élesztőt csak *in situ* tudták megfigyelni kényes szaporodási igényei miatt. Az izolálás nehézségei végett az azonosításban kiemelt szereppel bírt és bír a mai napig is a gomba jellegzetes morfológiája. Szemüvegtok alakú vegetatív sejtjei hosszant-oválisak, hengeresek, egytől-három világosabb vakuólával. A sejtek 5-7 μm x 20 μm nagyságúak és tisztán kivehető sejtfaluk van (Andreasen és mtsai, 2001). Ivartalan szaporodása során a sejtek a sejtpólusoknál vagy a széles sejtállak mentén sarjadzással osztódnak különböző irányba, ezután magányosan, párban vagy láncokban állnak, pszeudomicéliumot képezve. Buscalioni (1898), valamint Buscalioni és Cassagranti (1898) voltak az elsők akik sporulációt értek el a felhasznált nyúl bélsárminta felváltva végzett nedvesítésével és szárításával. A gomba ivaros szaporodásakor rizsszemszerű aszkospórák képződnek, melyekből általában kettő vagy több fekszik egymáshoz egy zsákszerű képletben, az aszkuszban (a tömlősgombák micéliumának végén kialakuló tömlőszerű szaporító szervben), amiről az Ascomycota törzs a nevét is kapta (Shifrine és Phaff, 1958). Az aszkuszok nem konjugáltak és általában perzisztálnak. Az aszkospórák 3.6-4.8 x 7-10 μm méretűek. Szemben a többi *Saccharomycetaceae*-vel, a *C. guttulatus* aszkospórái lazán helyeződnek az aszkuszban (Boundy-Mills és Miller, 2011).

A gomba sikeres izolálásához speciális laboratóriumi körülményeket kell biztosítani, többek között aminosavakat, B-vitaminokat és megemelt szintű széndioxidgáz koncentrációt (Mendonca-Hagler és Phaff, 1975). Életképes kultúrákat fenntartani igen bonyolult, mivel a természetes gazda fajok valószínűleg speciális növekedési faktorokkal látják el ezt a gombát, amiket *in vitro* nehéz reprodukálni (Parle, 1956). Ennek kapcsán Parle (1956) sikerrel használt nyúl gyomortartalom szuszpenziót a *C. guttulatus* izolálásához.

Shifrine és Phaff (1959), valamint Buecher és Phaff (1972) erős szaporodást értek el *Cyniclomyces* táptalajon. A tenyészeteket 10-15%-os CO₂-szint mellett és 37°C-on kultiválták, mivel ez egy pszichrofób élesztő, mely csak 30 és 40°C között képes szaporodni. A sejtek szoba- vagy magasabb hőmérsékleten is általában rövid életűek. Az előző kondíciók mellett 24 óra után a telepek simák és kissé fényesek (Boundy-Mills és Miller, 2011), a sejtek citoplazmája pedig többnyire átlátszó és nagyon kevés vakuólumot vagy granulumot tartalmaz. Két nap után a citoplazma némileg granuláltabb lesz és általában kettő vakuólumot tartalmaz. Három nap után a citoplazma granulálttá válik, majd egy hét vagy több nap után a sejtek szétesnek. Ezután már csak „szellemek”, granulumok és sejtfaltöredékek figyelhetők meg (Shifrine, és Phaff, 1958). Ezért a sejtek rövid életideje miatt a tenyészetet 3 naponta át kell oltani (Zierdt és mtsai, 1988).

A kimutatás megkönnyítése érdekében a morfológiai jegyek kiemelését festési eljárásokkal lehet fokozni. Gram festéssel a *C. guttulatus* sejtek egységesen lilák, a belső szerkezet nem látszik. Kinyoun (módosított Ziehl-Neelsen) festéssel világoskék citoplazma és a gyengén saválló sejtmagok láthatóak. Giemsa festéssel erősen lila sejteket lehet kapni néhány nem festődő, széles, keresztirányú sávval. PAS (Periodic acid schiff festés) pozitív, a sejtek egységesen mély bíborvörös színűek. Metilzöld-pironin festéssel rózsaszín a citoplazma és sötétzöld a sejtmag. A vakuólumok az előző festési eljárásokkal nem festődnek, ezzel szemben a hematoxin-eozin festés részletesen megfesti a sejten a vakuólumokat és a sejtmagokat is. Interferencia kontraszt mikroszkóppal az askospórák világos arany színűek, míg a sporangium fala (a spórát határoló sejtplazma) és a vegetatív sejtek színtelenek, közömbösek (Zierdt és mtsai, 1988).

Roll és Mehnert (1957) szerint a gomba nincs jelen a szopós nyulakban, csak olyanokban, melyeket szénával etettek. Ezért feltételezhető, hogy e gombát az állatok a környezetből veszik fel (Shifrine és Phaff, 1958). A fent említett fajokban ez az élesztő egy laza barriert képez a bél lumene és nyálkahártyája között, a gyomor fundusi területén és a pylorus tájékán. A *C. guttulatus* az állatok egészségének fenntartásában nem játszik szerepet, hatására nincs nyilvánvaló válasz a gazdaszervezet felől (Zierdt és mtsai, 1988). Osztódó alakok a gyomortartalomban gyakran megfigyelhetők, szemben a vékony- és vastagbéllel, ahol nincsenek jelen. Végül továbbhalad a bélben, majd nagy számban választódik ki a bélsárral. Az askospóra képződés a bélpaszázts során a vastagbélben történik. Shifrine és Phaff úgy találták, hogy lágybél-sár-evés kell a gomba életciklusának fenntartásához (Shifrine és Phaff, 1958), de Zierdt és munkatársai szerint ez nem esszenciális, mert a nyálkahártyán vastag rétegben szaporodó élesztő valószínűleg önfenntartó a lágybél-sár-evés nélkül is (Zierdt és mtsai, 1988). Összességében az emlősök, azzal, hogy különféle táplálékokat fogyasztanak el, melyek élesztőket is tartalmazhatnak, hozzájárulhatnak e sarjadzó gombák, így a *C. guttulatus* terjesztéséhez is (Gouliamova és mtsai 2011).

2.2. A kutyák és macskák béltraktusában élő gombák

2.2.1. Tenyésztéses kutatások

Tenyésztéses kísérletek eredményei alapján a béllumenben magasabb a gombák prevalenciája (27%), mint a bélsárban (5%) (Foster és mtsai, 2013). Tenyésztéses tanulmányokban leírták, hogy élesztők és penészek az egészséges beagle kutyák megközelítőleg 25%-ának bélrendszerében voltak jelen (Davis és mtsai, 1977; Mentula és mtsai, 2005). Ugyanakkor a hagyományos gombatenyésztés több napot vehet igénybe (Suchodolski és mtsai, 2008) és eredményei sokszor nem reprezentálják az állatok béltraktusában élő gombaközösségek relatív megoszlását, mivel a lassabban szaporodó, igényesebb fajok elveszhetnek az identifikálásnál (Kurtzman és mtsai, 2011).

2.2.2. Molekuláris vizsgálatok

A riboszomális cisztron régióon belül az ITS (internal transcribed spacer) szakaszt vizsgálva, egy tanulmányban a gomba DNS előfordulási arányát értékelték ki 64 egészséges és 71 krónikusan bélbeteg kutya vékonybélből származó mintáiból, általános gomba primerekkel. Eredményképpen az egészséges kutyák 60,9%-ából, míg a betegek 76,1%-ából mutattak ki gomba DNS-t, és bár a klinikailag fontosabbnak vélt fajok a beteg kutyák körében gyakrabban megfigyelhetőek voltak, az eltérés a két csoport között nem volt szignifikáns. Az ITS-PCR módszerrel is lehet, hogy egyes fajok rejtve maradnak a detektálás során, valamint a nagy amplifikációs ciklusszám miatt relatíve csak a nagymértékben jelen lévő gombák DNS-e fog felszaporodni, míg a kis mennyiségben előforduló gombák elveszhetnek az identifikálásnál (Suchodolski és mtsai, 2008).

Ezért Handl és munkatársai (2011) – a kutyák béltraktusában lévő gombák előfordulási arányát és filogenetikai viszonyukat vizsgáló – kutatásaikhoz már fTEFAP (fungal tag-encoded FLX-Titanium amplicon) 16S rRNS gén piroszekvenálást alkalmaztak, általános gomba primerekkel, hogy a kis mennyiségben jelen lévő gombákat is azonosítani tudják. Ezután az eredményeket összehasonlították a gomba szekvencia adatbázisokkal. Összesen 12 egészséges kutya és 12 egészséges macska összevont bélsármintájának fekális mikrobiomját (gomba eredetű mikrobáit, mikrobiotáit) elemezték ki. A kapott szekvenciák 99%-át az Ascomycota törzs tagjai adták, melyen belül a Saccharomycetes volt a leggyakoribb osztály és kutyáknál a Nacaseomyces, míg macskáknál a Saccharomyces, Aspergillus és Penicillium nemzetségek domináltak.

Ugyanezzel a módszerrel, Foster és munkatársai (2013) hasonló eredményeket tapasztaltak. Összesen 12 egészséges és 7 akut hasmenéses kutya mikrobiomját értékelték ki. Utóbbi csoport tüneti kezelése eredménytelen volt és a bélsárvizsgálatok (flotációs dúsítás, bakteriológiai-, parazitológiai-vizsgálatok) alapján egyik kutyából sem tudtak kimutatni specifikus enteropatogéneket. Eredményeik szerint az Ascomycota törzs tagjai voltak a leggyakoribbak, ezen belül a Saccharomycetes osztályok tagjai fordultak elő a legnagyobb számban. A leggyakoribb nemzetség ebben az esetben a Candida volt mindkét csoportnál, ezen belül a *Candida natalensis* volt a legtöbbször azonosított faj.

Az egészséges és a hasmenéses kutyák bélsármintái változatos mikrobiális társulásokat és gomba nemzetségeket tartalmaznak, de a két csoportban lévő gombaközösségek relatív megoszlásában nem találtak szignifikáns különbséget. Csak feltételezhető, hogy ezek a szervezetek a béltraktus lakói, felmerül ugyanis, hogy mindössze elhalt gombaszervezetek DNS maradványai, esetleg a környezetből vagy a táplálékkal felvett és a bélen áthaladó gombák DNS-anyaga. Ezeket az információkat csak az állatok koplaltatása után elvégzett tenyésztési vizsgálatok után lehetne pontosítani (Suchodolski és mtsai, 2008).

2.3. *C. guttulatus*-szal kapcsolatos esetek

2.3.1. Nyúl

Peeters és munkatársai (1984) hasmenéses nyulak kórokozóit vizsgálták, melynek során kórokként több esetben is csak a *C. guttulatus* nyilvánvaló proliferációja volt kimutatható. Tanulmányuk szerint ugyan a nyúltelepek mintegy 100%-ában jelen van ez az élesztő és a nyúlállomány közel egyharmadában (32.3%) előfordul, de a magas hordozási arány ellenére sem találtak a gombára specifikus patológiás károsodást. Utaltak a jelenlétére hasmenéses nyulak esetében svájci (Richle és Scholer, 1961) és amerikai tanulmányokban is (Hersey-Benner, 2008). A gyakori előfordulás ellenére patológiás szerepe nem igazolódott: Burgessier (1961), valamint Richle és Schöler (1961) sem tapasztalt semmilyen klinikai tünetet nyulak nagyszámú *C. guttulatus* blasztospórával (a sarjadzó gombák ivartalan, diploid szaporító képletével) való kísérleti fertőzésekor.

2.3.2. Kutya és macska

A holland Állatorvosi Mikrobiológiai Diagnosztikai Centrum (VMDC) visszamenőleges, cinkszulfát-flotációs eredményei szerint, a visszatérő, krónikus hasmenéses kutyák 15%-ában nagy számban volt jelen a *C. guttulatus*, ami a korábbi felvetésekkel ellentétben bizonyítja, hogy a kolonizáció kutyában is megtörténhet. Más enterális kórokozót a mintákban nem találtak, így nem volt más – egyéb kórokozó jelenlétével összefüggő – magyarázat az állatok hasmenését illetően. A szerzők, a tanulmányban arra a következtetésre jutottak, hogy a *C. guttulatus* patogén szereppel bírhat kutyában (Houwens és Blankenstein, 2001). Mindeközben ismét holland kutatók, Mandigers és Houwers (2007) 44 krónikus hasmenés kutyában talált nagyszámú *C. guttulatus* gombasejtet. Az összes kutyát, egyéb kezelés vagy étrendi változtatás nélkül nystatin gombaellenes orális szuszpenzióval kezelték

3x 100.000 NE/nap/kutya dózisban, 5 napon át, melynek hatására 25 állat hasmenése tartósan megszűnt. Houwers (2009) folytatta kutatásait, majd sikerült egy *C. guttulatus* fertőzött macska esetet is leírnia. A bélsárvizsgálat során itt is nagy mennyiségben volt jelen a gomba. Napi egyszeri adag, 50.000 NE dózisú nystatin-t adott az állatnak 4 napig, amitől az meggyógyult és a gomba már nem volt kimutatható a bélsárból. Az eset leírását követően a holland VMDC munkatársai is találtak hasmenéses macska eseteket ilyen élesztő túlszaporodással, ezért ezeket az állatokat is nystatin-nal kezelték (Peters és Houwers, 2009). Később Mandigers és munkatársai (2014), 57 hasmenéses kutyában írtak le erős *C. guttulatus* proliferációt, melyekből más kórokozó nem volt kimutatható. Napi 150.000 NE/kutya/nap dózisú, 5 napos nystatin kezelés hatására 21 kutyában (37%) javulás történt. Ez az arány hasonlít a 2007-ben végzett kísérletek eredményeihez.

Gjerde és munkatársai (2009) egy *C. guttulatus*-szerű gombát találtak, mint lehetséges kórokozót egy szibériai husky perzisztens hasmenéses, olykor hányásos tüneteinek hátterében, melyek diéta hatására átmenetileg javultak, majd ismét jelentkeztek. Az addigi sikertelen metronidazol kezeléstről átváltottak nystatin-ra, melyből 2x 500.000 NE/nap, 4 héten át eredményes volt. A tünetek és a gombaürítés azonban két hónap múlva visszatért, mely feltehetőleg egy újabb fertőződés eredménye volt. Újabb nystatin kezelés után a tünetek gyorsan elmúltak és a hasmenés már nem tért vissza. A *C. guttulatus*-ra hasonlító gombasejtek 26 S rRNS gén régiójára elvégzett PCR-vizsgálat alapján a PCR-terméket (FJ755179) megszekvenálták, majd összevetették egy – már génbankban elhelyezett – nyúlból származó *C. guttulatus* szekvenciával (U76196). A legnagyobb egyezést, 97.9%-kal a *C. guttulatus*-szal mutatta, viszont a 2.1 %-os eltérés már felvetette, hogy a kutya nem *C. guttulatus*-szal fertőződött.

Kurtzman és Robnett (1998) ascomycotákkal kapcsolatos kutatásai alapján, ezen a genomszakaszon a legtöbb azonos fajú szekvencia egyáltalán nem vagy csak 1-2 nukleotid pozícióban különbözik az összes, megközelítőleg 600 nukleotidból, így 1%-nál nagyobb eltérés ezen a genomszakaszon azt veti fel, hogy az adott szekvencia már egy másik fajhoz tartozik. Gjerde és munkatársai (2009) tehát esettanulmányukban egy morfológiailag azonos, de genetikailag eltérő gombát találtak, mely visszatérő gyomor-bélgyulladás okozott kutyákban.

Szintén 2009-ben, japán kutatók írtak le morfológiailag *C. guttulatus*-szerű gombát egy köszénkátrány-szerű hasmenéses nyúlban és egy krónikus, haemorrhagiás hasmenéses labrador retriever szukában, mely utóbbinak *Trichuris vulpis* fertőzöttsége is volt, de többszöri anthelmintikum kezelés után ismételt hasmenése volt. A gomba patogenitásának módját Saito és munkatársai sem tudták tisztázni (Saito és mtsai, 2009).

Egy brazíliai kutatás során 3 beteg kutyát vizsgáltak meg. Bélsármintáik mikroszkópos megfigyelése alapján mindháromban jelen volt a *C. guutulatus*. Az egyik kutyából molekuláris vizsgálatokat végeztek el, majd szekvencia analízissel (BLAST) értékelték ki az eredményeket, mely kimutatta, hogy a talált élesztőgomba 98-99% egyezést mutat a génbankban található *C. guttulatus* szekvenciákkal (Flausino és mtsai, 2012). Ugyanakkor az U76196 típus törzs és az ugyanazon fajhoz tartozó újonnan kapott, és már meglévő izolátumok szekvenciája között a nukleotid polimorfizmus megfigyelt szintje a vizsgált D1/D2 domén régió belül lényegesen magasabb volt, mint a többi Ascomycota faj esetében, melyek szekvenciái általában csak kevesebb, mint 3 nukleotidban tértek el (Kurtzman és Robnett, 1998).

Ismét brazil kutatók két olyan kutyának a gyomortartalmából és bélsármintájából is kimutatták a gombát, melyek kórtörténetében hányás, hasmenés, a gyomor mucosa megvastagodása és az epehólyag hypertrophiája szerepelt. Esetükben kezelésként fluconazol terápia hatásosnak bizonyult (Torres Furtado és mtsai, 2013).

Ezen kívül Neel és munkatársai (2006) egy labrador retriever bélsarában és epéjében is megtalálták a gombát, de ezt csupán mellékleletként értékelték. Később más kutatók másodlagos gastrointestinalis fertőző ágensként azonosították a *C. guttulatus*-t, fehérjevesztéses enteropáhiában szenvedő rottweilerekben (Dijkstra, 2010), valamint egy granulomatosus colitisben szenvedő, haematochesiás francia bulldogban is megtalálták a gombát és egyben kóroki szerepet is tulajdonítottak neki (Manchester és mtsai, 2013).

3. Anyag és módszertan

3.1. Mintagyűjtés

A mintagyűjtést 2015 őszén, októbertől-novemberig végeztük hasmenéses kutyák és macskák bélsármintáiból, melyek a Vet-Med-Labor Kft. Állatorvosi Diagnosztikai Laboratóriumtól (továbbiakban Laboratórium), és a Cura-Vet Állatorvosi Rendelőtől származtak. A Laboratóriumhoz az egész országból érkeztek be vizsgálati felkérések, így az innen gyűjtött 73 minta képviselte kutatásunk országos szintű adatbázisát, míg a Cura-Vet Állatorvosi Rendelőtől gyűjtött 15 minta a fővárosi adatbázisunkat. Kórtörténeti információkat csak ez utóbbi mintákból gyűjtöttem. A mintagyűjtési időszak alatt minden beérkező hasmenéses kutya és macska eredetű bélsármintát feldolgoztuk, válogatás nélkül. Összesen 88 mintát gyűjtöttünk, ebből 79 minta kutyától, 9 minta macskától származott (**1. táblázat**).

Feldolgozott bélsárminták	Kutya (db)	Macska (db)	Sum.
Országos (Vet-Med-Labor Kft.)	65	8	73
Fővárosi (Cura-Vet Áo.-i Rendelő)	14	1	15
Összesen:	79	9	88

1. táblázat

3.2. Mintafeldolgozás

Minden mintából bélsár kenetet készítettünk a későbbi mikroszkópos vizsgálat elősegítéséhez. A bélsármintákat friss vagy több napos hűtött állapotban dolgoztuk fel. Ennek során a mintákat 26 x 76 mm-es (zsírtalanított) tárgylemezre (Biosigma) kentük ki egyenletesen vékony rétegben, steril, mintavevő vattapálcákkal (Biloab Zrt.), majd hagytuk megszáradni.

Az eredményesebb morfológiai identifikáció érdekében a natív bélsár keneteket az Ebcson Beforr Állatorvosi Rendelőben metanollal (REAG-FIX PANOPTIC előfestő és fixáló oldattal, Reagens Kft.), a Laboratóriumban pedig tiszta etanollal (REANAL Zrt.) fixáltuk, majd gyorsfestési eljárásokkal festettük meg. A Cura-Vet Állatorvosi Rendelőből gyűjtött mintákat az Ebcson Beforr Állatorvosi Rendelőbe szállítva dolgoztuk fel és panoptikus festéssel, REAG-RED PANOPTIC Eozinofil, és REAG-BLUE PANOPTIC Basofil oldattal (Reagens Kft. Budapest) festettük meg. A Laboratóriumtól gyűjtött mintákból a helyszínen készítettük el a bélsár keneteket, ezeket lactophenol-blue oldattal (Sigma-Aldrich) vagy az előbb említett panoptikus festékoldatokkal festettük meg. Ezek a festések alkalmasak egyes sarjadzó-gombák morfológiai alapon történő azonosításához (Kass, 1988; Lindegren, 1945). Az így elkészített festett keneteket végül hagytuk megszáradni, kivéve a lactophenolos festés esetében, ahol a kenetet fedőlemezzel (Biosigma) láttuk el.

3.3. A minták kiértékelése

3.3.1. Morfológiai karakterizálás

A bélsármintákban lévő sarjadzó gombák felkutatásához a megfestett keneteket fénymikroszkóppal (Biological Microscope Model N-180M) vizsgáltuk meg. A sarjadzó gombák közül a *C. guttulatus* azonosítását a bélsár citológiai vizsgálata során, morfológiai alapon végeztük el. Ebben, kezdetben segítségemre volt Dr. Halmay Dóra, az Ebcson Beforr Állatorvosi Rendelőből és Dr. Kelemen Barbara Szilvia, a Cura-Vet Állatorvosi Rendelőből és a Laboratórium munkatársai. Később a *C. guttulatus* jellegzetes morfológiája lehetővé tette számomra, hogy ezt a fajt önálló munka során is azonosítsam. Nagyméretű, szemüvegtok alakú, vegetatív gombasejtek után kutattam, melyekben két nem festődő vakuólum foglalt helyet a sejt két végén. A sejtek mérete 4.5-6 x 14-21 µm volt. Amennyiben a minta *C. guttulatus*-t vagy más sarjadzó gombát tartalmazott és lehetőségünk adódott rá, fotódokumentációt is készítettünk, melyhez én a Laboratórium mikroszkóp-kameráját (TUCSEN) használtam.

3.3.2. Tenyésztéses vizsgálatok

A 88 mintából 35 darabot választottunk ki, melyek sarjadzó gombákat vagy spórákat tartalmaztak nagy számban, összesen 34 kutya, és 1 macska mintát. Ezekből általános gomba tenyésztést végeztünk a Laboratóriumban. Egyszer használatos, steril oltókaccsal (Biolab Zrt.) élesztő-autolizátumot, glükózt és cloramphenicolt tartalmazó (ÉGC) táptalajra oltottuk ki a mintákat. Ezeket a táptalajokat szobahőmérsékleten inkubáltuk, légköri levegőn (Aguilar-Uscanga és François, 2003).

A morfológiai karakterizálás alapján *C. guttulatus*-ként azonosított élesztőt tartalmazó mintákból, az előbbi tenyésztésen kívül, speciális kondíciók közötti – kifejezetten a *C. guttulatus* igényeire szabott – tenyésztést is végeztünk. Ehhez *Cyniclomyces* táptalajt és élesztős Sabouraud-dextróz agar táptalajt is használtunk, majd a beoltás után a táptalajokat BD GasPak™ EZ hermetikusan zárható tárolóban helyeztük el. Ezután egy 13% széndioxid-koncentrációt biztosító BD GasPak™ EZ Anaerobe Container System gázfejlesztő tasakot tettünk a tárolóba és lezártuk azt, majd az egészet 37°C-on inkubáltuk széndioxid-termosztátban (ASSAB CO₂-INCUBATOR). Mivel Zierdt és munkatársai (1988) szerint a 3-as vagy ez alatti pH-értékre beállított táptalaj optimálisabb a szaporodáshoz, ezért az élesztős-Sabouraud-dextróz agar táptalajokhoz 2 csepp 20%-os sósavoldatot adagoltunk. A *Cyniclomyces* táptalajt a következő recept alapján (Kurtzman, és mtsai, 2011) készítettük el BSL-2 sterilbox alatt (Captair), rendelt alapanyagokból:

Először feloldottunk 10 g élesztő kivonatot (Merck), 40 g glükózt (forgalmazó: Reanal, gyártó: Lachner), 10 g Bacto peptone-t (Becton and Dickinson) és 20 g technikai agart (Merck), 1 liter ioncserélt vízben. Az alapanyagokat egyben összemértük, majd melegítés közben oldottuk fel őket. Beállítottuk a táptalaj pH értékét 2,7-3-ra, 20%-os sósav oldattal, amit indikátorpapírral ellenőriztünk (Zierdt és mtsai, 1988). Ezután kiöntöttük a táptalajt Petri csészékbe, amiket 121°C-on 15 percig sterilizáltunk autoklávozással. Az így kapott *Cyniclomyces* táptalajra egyszer használatos steril oltókaccsal (Biolab Zrt.) kioltottuk a *C. guttulatus* tartalmú mintákat. Azokat a tenyészeteket, melyeken szaporodást vagy telepképződést tudtunk megfigyelni, mikroszkóposan ellenőriztük, és a sarjadzó gombákat tartalmazókból szintenyészetet készítettünk, az előzőeknek megfelelő paraméterek mellett.

3.3.3. Molekuláris vizsgálatok

A 35 bélsárminta közül 15 esetben tudtunk olyan sarjadzó gombákat kitenyészteni, melyeket morfológiai alapon nem tudtunk biztosan beazonosítani, csak hasonló megjelenésük révén kategorizálni. Így 2 olyan csoportot alakítottunk ki, amelyek morfológiailag lényegében megegyeztek egymással. Az egyik ilyen csoportot a *Candida* vagy *Saccharomyces* nemzetségbe tartozó fajok alkották. Ezt a csoportot cukorasszimilációs próbával vizsgáltuk tovább. A másik csoportot a *Pichia* nemzetségbe tartozó fajok képviselték. Ezt a csoportot molekuláris módszerekkel vizsgáltuk tovább. A kapott 5 darab *Pichia* tenyészetből csak 3-at vizsgáltunk meg PCR segítségével (Schoch és mtsai, 2012), mivel a maradék 2 esetben a tenyészetek erősen kontaminálódtak penész fajokkal. A *C. guttulatus* PCR-vizsgálatait az általunk tervezett *Cyniclomyces* primerekkel végeztük el, közvetlenül bélsármintából kivonva a DNS-t. Színtenyészet hiányában a *C. guttulatus* PCR-vizsgálatait az általános gomba primerekkel nem tudtuk kivitelezni.

3.3.3.1. DNS-kivonás

A Laboratóriumban a 3, morfológiailag megegyező *Pichia* színtenyészetből elvégeztük a DNS-kivonást a további PCR-vizsgálatokhoz (Cenis, 1992). Ehhez High Pure PCR Template Preparation Kit-et (Roche Diagnostics) használtunk a következő protokoll szerint: Egy steril Eppendorf csövecskébe mikropipettorral kimértünk 500 µl steril PBS (Phosphate-buffered saline) oldatot. Ezután az oldatba belekevertük a gomba színtenyészet mintát, egyszer használatos, steril oltókacs segítségével, majd lezártuk a csövet. Vortex géppel (Heidolph REAX top) homogenizáltuk a kapott szuszpenziót. Következő lépésként 15 percig fagyasztottuk a mintát, majd felolvasztottuk és újra homogenizáltuk azt. Ezt a folyamatot háromszor megismételtük, végül az egészet lecentrifugáltuk 8000 G-n, 1 percig. Ezután 200 µl felülúszót kimértünk egy új steril Eppendorf csövecskébe és hozzáadtunk 200 µl Binding-puffert (working solution), vortexszel összekevertük és 10 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk. Utána hozzáadtuk 100 µl izopropanolt és ismét jól összekevertünk. Összeraktuk az atmosó-filtert és a hozzá tartozó gyűjtőcsövet. Az összes mintát átpipettáztuk a szűrőre és 5 percig centrifugáltuk 8000 G-n. A filtert új gyűjtőcsőbe helyeztük és ráértünk a szűrőre 500 µl „Inhibitor Removal” puffert és 1 percig centrifugáltuk 8000 G-n. Ezután a filtert új gyűjtőcsőbe helyeztük. A mosáshoz ráértünk 500 µl „Washing” puffert és 1 percig centrifugáltuk 8000 G-n. A filtert ismét új gyűjtőcsőbe

helyeztük, majd a mosást megismételtük. Eltávolítottuk a folyadékot a gyűjtőcsőből és ismét 1 percig centrifugáltuk a mintát 8000 G-n. A filtert áthelyeztük egy steril Eppendorf csőbe és hozzáadtunk 200 µl 70°C-on előmelegített elúciós puffert és 3 percig állni hagytuk, ezután 1 percig centrifugáltuk 8000 G-n. Az így kivont gomba DNS-t fagyaszttva tároltuk a PCR-vizsgálatig. A DNS-kivonás során minden munkafázishoz új, steril pipetta-hegyet használtunk fel. A *C. guttulatus*-ra tervezett primerekkel megvalósított PCR-ekhez az első 2 *C. guttulatus*-ra pozitív bélsármintából vontuk ki közvetlenül a DNS (Cenis, 1992).

3.3.3.2. Primer tervezés

A *C. guttulatus*-ra külön primert terveztünk, internetes primertervező programok segítségével (NCBI, www.genscript.com és Olygoanalyzer, www.eu.idtdna.com). Forward primer-ként az 5'- GAG CAG GGG ACG CAA CCT – 3' (Tm = 60.5 °C), Reverse primer-ként, pedig az 5'- CTC CAA GTG GGT GGT AAA CTC C – 3' (Tm = 57.5 °C) primereket választottuk, mert a különböző primer-tervezési analízisek során ezeknél tapasztaltuk a legkedvezőbb guanin-citozin-tartalom-, hairpin-, self-dimer-, hetero-dimer és kötési energia-értékeket (Abd-Elsalam, 2003).

3.3.3.3. PCR

A Laboratóriumban BSL-2 sterilbox alatt (FASTER TWO 30) állítottuk össze a PCR Mastermix-eket az általunk tervezett *Cyniclomyces* primerekkel végzett *C. guttulatus* PCR és az általános gomba primerekkel végzett *Pichia* PCR-vizsgálatokhoz. (Steril víz – 5,1 µl, magnézium-klorid oldat – 1,2 µl, Bovin serum albumin (BSA) – 0,5 µl, forward primer – 0,6 µl, reverse primer – µl 0,6, PCR Mastermix Kit: LightCycler® DNA Master SYBR GREEN I (Roche Diagnostics) – 10 µl, és a minta (templát) - 2µl. A TaqMan PCR Kit-ek magas ára miatt kevésbé specifikus Sybr-green PCR-t alkalmaztunk. A *Pichia* nemzetségbeli fajok identifikálásához általános gomba primereket használtunk a PCR-vizsgálathoz, az előbb leírt protokollnak megfelelően. ITS5 Forward: 5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3 és ITS4 Reverse: 5'-GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G-3' általános gomba primereket választottunk, mert amerikai kutatások alapján a riboszomális cisztron régióon belül az internal transcribed spacer (ITS) szakaszban van a legmagasabb a sikeres identifikációs valószínűsége, a legszélesebb gombafaj tartomány mellett (Schoch és mtsai, 2012). A *Cyniclomyces* PCR-t az általunk tervezett *C. guttulatus* primerekkel (Forward: 5'- GAG CAG GGG ACG CAA CCT – 3' és Reverse: 5'- CTC CAA GTG GGT GGT AAA CTC C – 3') végeztük el. A PCR-vizsgálatokat Roche LightCycler 1.5 Real-Time PCR-

automatával készítettük el, Ponchel és munkatársai (2003) által leírt kondíciók mellett. A kész PCR-termékeket – 20°C-on tároltuk a szekvenálásig.

3.3.3.4. Szekvenálás

A 3 darab *Pichia*- és a 2 darab *Cyniclomyces*-PCR-vizsgálat PCR-termékét tartalmazó mintát futárral küldtük el a BIOMI Kft.-hez, szekvenálás céljából. Innen email-ben érkeztek meg az eredmények a Laboratóriumba.

3.3.3.5. Szekvencia-analízis

Végül a kapott szekvenciák alapján, mind az 5 esetben (2 *Cyniclomyces* és 3 *Pichia*) szekvencia-analízissel (BLAST) határoztuk meg a talált gomba fajtát. (McGinnis és Madden, 2004). A 2 *C. guttulatus* esetében össze kívántuk hasonlítani a kutyából nyert minták szekvenciáját a világhálón elérhető génbanki *C. guttulatus* adatokkal. Ehhez rendelkezésünkre álltak a *C. guttulatus* génszekvenciák elérési számai: LSU (Nuclear large subunit rRNA) – JQ 689 012; SSU (Nuclear small subunit rRNA) – JQ 698 886; EF-1-alfa (transzlációs elongációs faktor 1-alfa) – JQ 699 036; RNS polimeráz II.-B1 alegység – JQ 713 018; RNS polimeráz II.-B2 alegység – JQ 698 950; és a fenntartott gombatorzs száma: Y-17561.

3.3.4. Biokémiai vizsgálatok

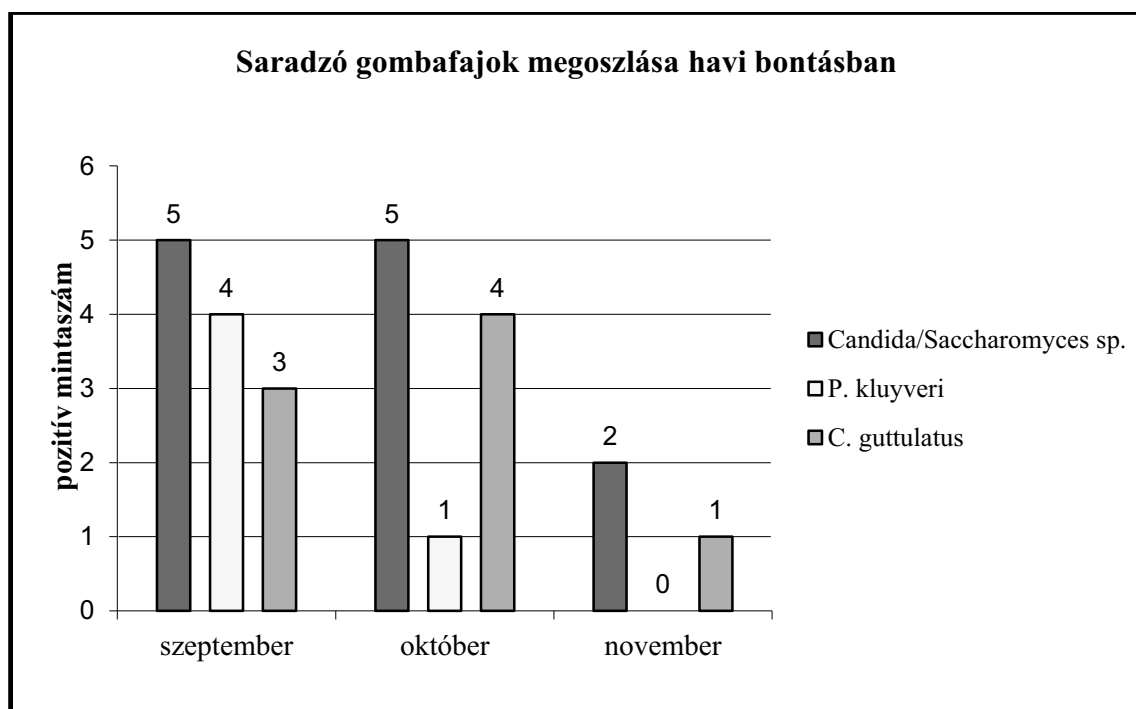
A *Candida*/*Saccharomyces* csoportból szűrőpróbaszerűen vizsgáltunk meg 2 esetet AUXACOLOR™ 2 (Bio-Rad) cukorasszimilációs teszttel (Manjunath és mtsai, 2012). Ez egy kolorimetriás határozó rendszer a főbb élesztő és penészfajok meghatározásához. Azon az elven működik, hogy a különböző gombafajok eltérő cukorvegyületeket bontanak. Amelyik cukrot a gomba bontja, ott színváltozás történik (lilából sárga lesz), és ezáltal pozitívnak kell tekinteni. Összesen 5 panel szerepelt ezen a teszten, mindegyikben 3 különböző cukorvegyülettel, valamint minden cukorhoz tartozott egy számérték (1, 2, vagy 4). A használati útmutató alapján összeadtuk az egyes panelek pontértékeit, így 5 számot kaptunk, mely számok alapján a keresett faj kikereshetővé vált a teszthez mellékelt útmutató fajlistájából. Mindegyik kétes minta cukorasszimilációs teszttel való vizsgálatát a teszt magas ára miatt nem végeztük el.

4. Eredmények

4.1. A minták mikroszkópos kiértékelése

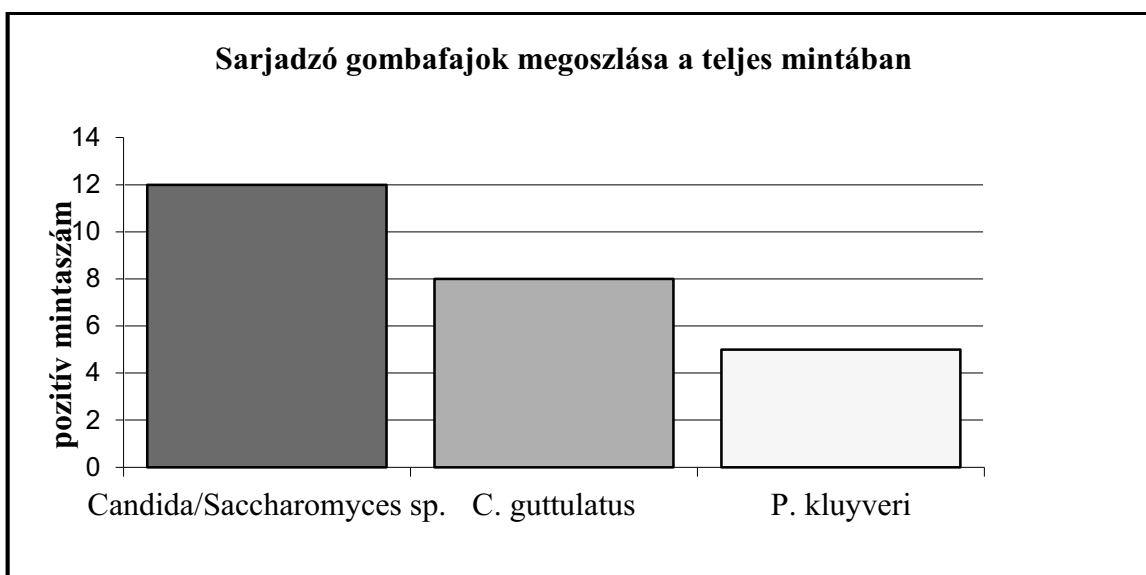
Kutatásunk során összesen 79 hasmenéses kutya bélsármintáját vizsgáltuk meg mikroszkóposan, *C. guttulatus*-t keresve. A vizsgálat ideje alatt a 79 kutya 10.1%-ában, 8 esetben találtuk meg a gombát. Eltéréseket tapasztaltunk a *C. guttulatus* előfordulási gyakoriságát illetően a vizsgált időszak 3 hónapja alatt (**1. diagram**). Szeptemberben ez az érték 9.7% volt (31 mintából 3 volt pozitív), majd októberben megemelkedett 16.7%-ra (24 mintából 4 volt pozitív), végül novemberben lecsökkent 4.2%-ra (24 esetből csak 1-ben volt jelen a gomba). Ezen kívül összesen 9 hasmenéses macskából gyűjtöttünk bélsármintát, melyből 1 tartalmazott sarjadzó gombát, morfológiailag *C. guttulatus*-t (11.1%).

1. diagram



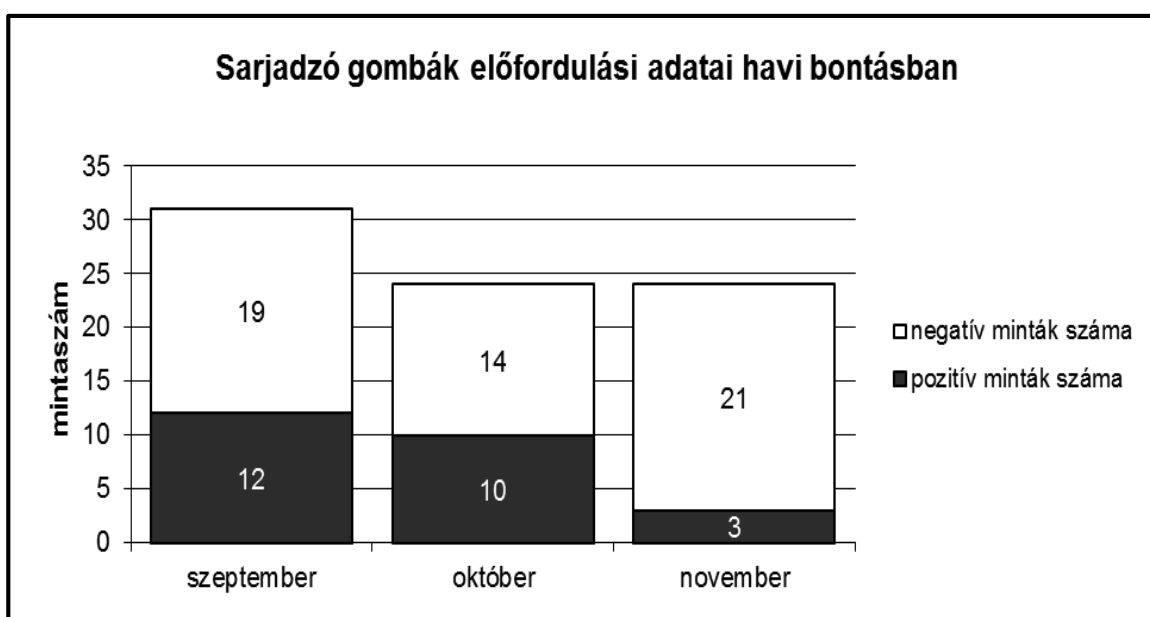
Összességében a 79 kutya eredetű bélsármintából, fajonként lebontva, a mikroszkópos morfológiai vizsgálat alapján 8 esetben találtunk *C. guttulatus*-t. A tenyésztéses kísérletek alapján 12 esetben találtunk Candida vagy Saccharomyces nemzetségbe sorolható sarjadzó gombákat és 5 esetben Pichia nemzetségbeli élesztőfajokat (**2. diagram**). Összesen 4 kutyából mutattunk ki kevert sarjadzó gomba fertőzést.

2. diagram



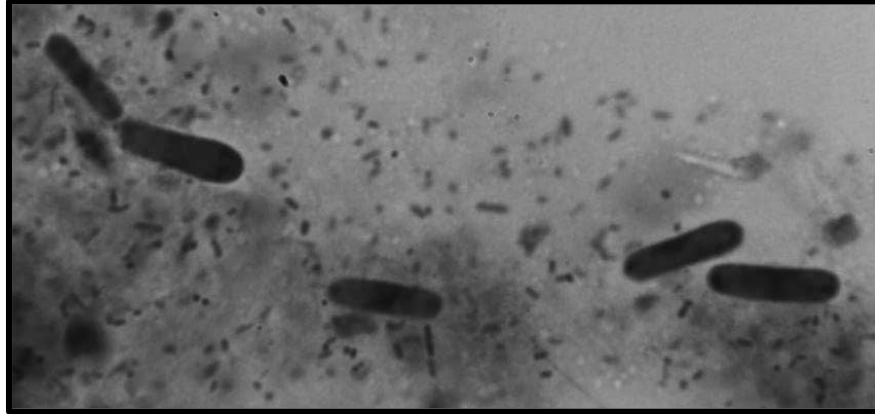
Mikroszkópos morfológiai vizsgálatainkra alapozva 8 minta tartalmazta a *C. guttulatus*-t, így 4 minta volt, mely többféle sarjadzó gombát is tartalmazott. A *C. guttulatus* mellett egy esetben volt jelen *Candida albicans*, 1 esetben *Pichia kluveri*, és 2 esetben *Pichia kluveri* és *Candida albicans* együttesen. Tehát a *C. guttulatus*-ra pozitív kutyák felében vegyes sarjadzó gomba fertőzést tudtunk kimutatni. A mikroszkópos és a tenyésztéses vizsgálatok eredményeit egybevetve szeptemberben 12 (38.7%), októberben 10 (41.7%), november 3 (12.5%) minta tartalmazott sarjadzó gombákat (3. diagram).

3. diagram



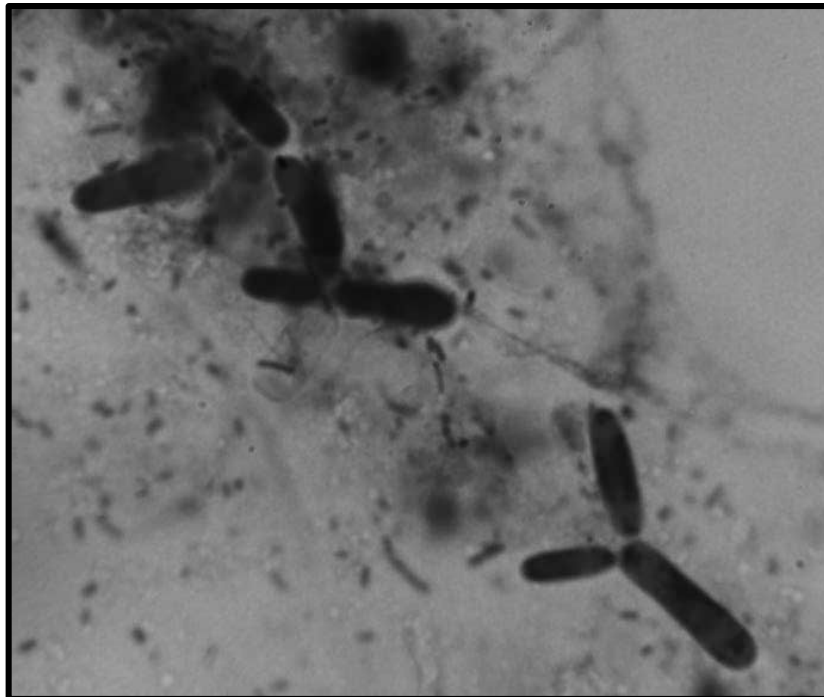
A *C. guttulatus*-t a mikroszkópos vizsgálat során, morfológiai alapon identifikáltuk a bélsár kenetéből, melyekről felvételeket készítettünk:

2. ábra *C. guttulatus* vegetatív sejtalakok bélsárkenetben.



(Panoptikus festés, 1000x nagyítás)

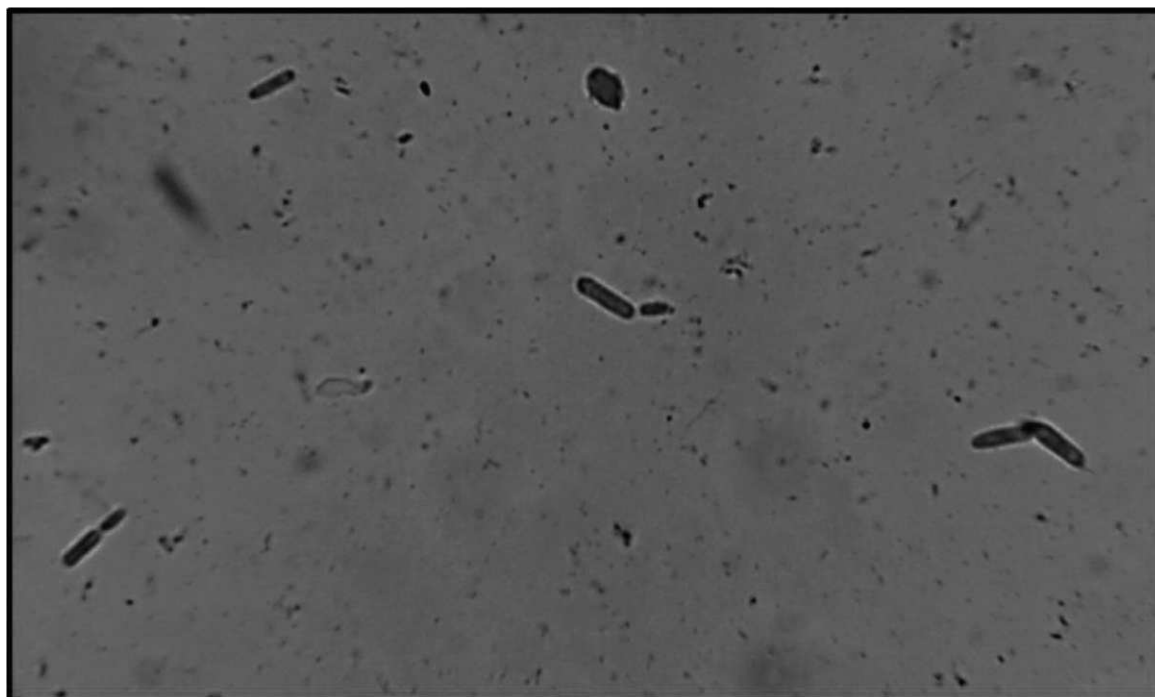
3. ábra *C. guttulatus* vegetatív sejtalakok bélsárkenetben.



(Panoptikus festés, 1000x nagyítás)

A *C. guttulatus* vegetatív sejtalakjai bélsárkenetben, panoptikus festéssel jól vizsgálhatóak voltak (**2. ábra** és **3. ábra**). A bélsárkenetben a gomba vegetatív sejtjei olykor kisebb, elágazó láncokat képeztek.

4. ábra *C. guttulatus* vegetatív sejtalakok bélsárkenetben.



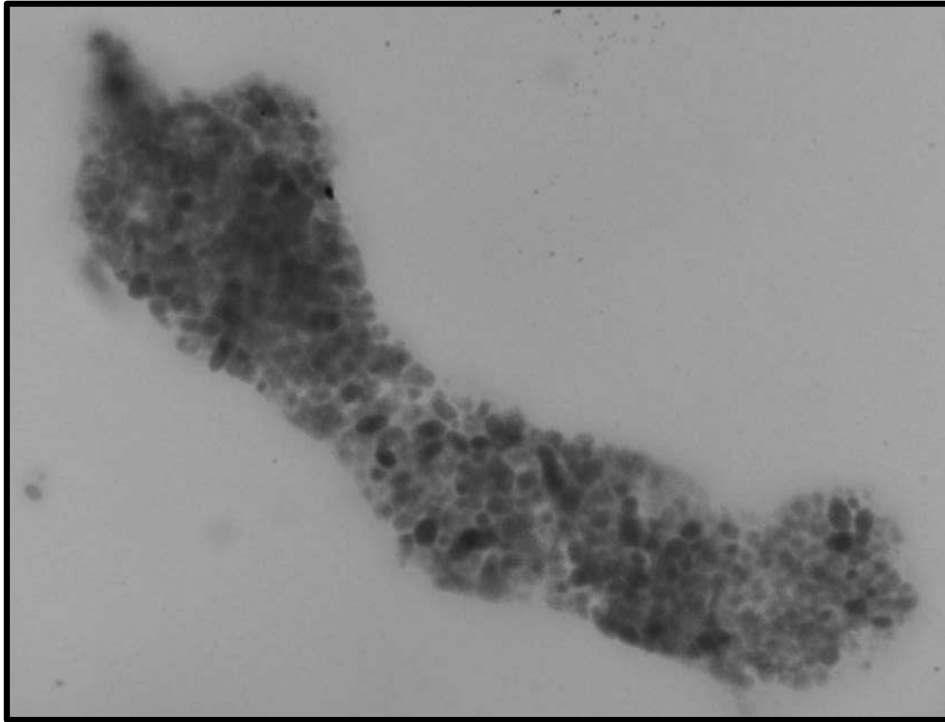
(Lactophenol-blue festés, 400x nagyítás)

A *C. guttulatus* vegetatív sejtjei a bélsár-citológiai kenetben, lactophenol-blue festéssel (**4. ábra**) oválisnak-hengeresnek mutatkoztak, a sejtek két végén nem festődő, világos vakuólumokkal. Magányosan vagy párban helyeződtek. A gomba sejtfa és a vakuólumok jól kirajzolódtak.

4.2. A tenyésztéses kísérletek eredményei

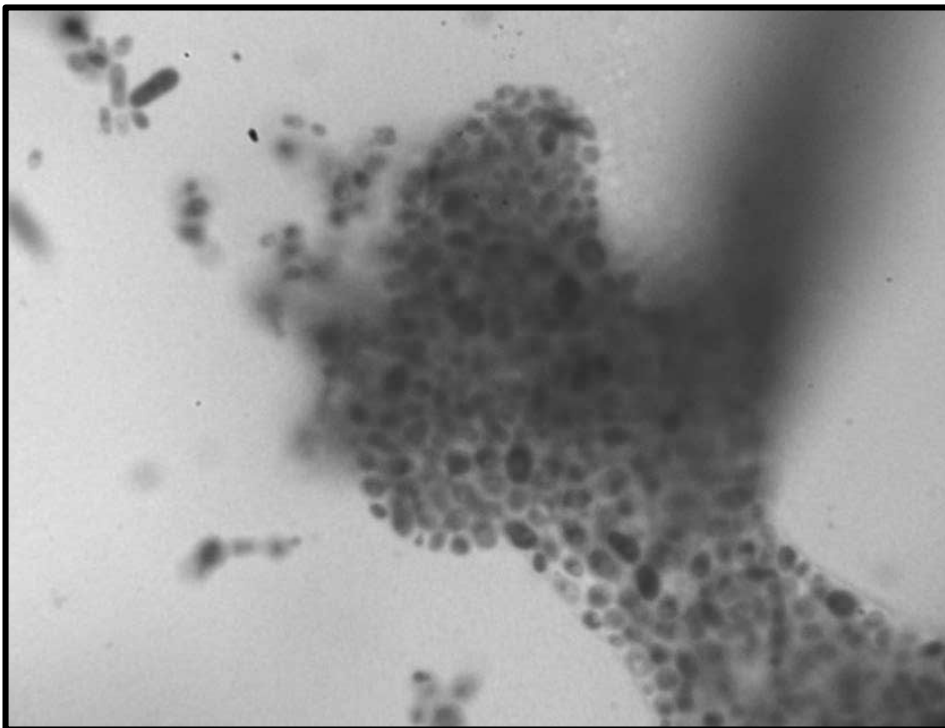
A többi sarjadzó gomba fajt tenyésztéses kísérletekkel vizsgáltuk tovább a pontosabb azonosítás érdekében. A mikroszkópos vizsgálat során 19 kutyából (24.1%) származó mintában figyeltünk meg sarjadzó gombákat és/vagy gomba spórákat, valamint 16 esetben (20%) csak gomba spórákat láttunk, így összesen 35 mintából végeztük el az általános gombatenyésztést. A 35 mintából 15 esetben tudtunk sarjadzó gombákat kitenyésztetni (42.9%), míg a többi esetben penész (34.3%) és baktérium fajok (11.4%) nőttek ki, a maradék tenyésztéses kísérlet során pedig semmi sem tenyészett ki (11.4%). A 15 sikeres sarjadzó gomba tenyészetből 12 esetben (12.7% az összes, 79 mintából) találtunk olyan sarjadzó gombákat, melyek morfológiailag a *Candida* vagy a *Saccharomyces* nemzetségbe tartoznak. Ezek tenyészeiteiből a mikroszkópos ellenőrzés során készítettünk felvételeket:

5. ábra Morfológiailag Candida vagy Saccharomyces nemzetségbe tartozó sarjadzó gomba szintenyészetéből készült kenet mikroszkópos képe.



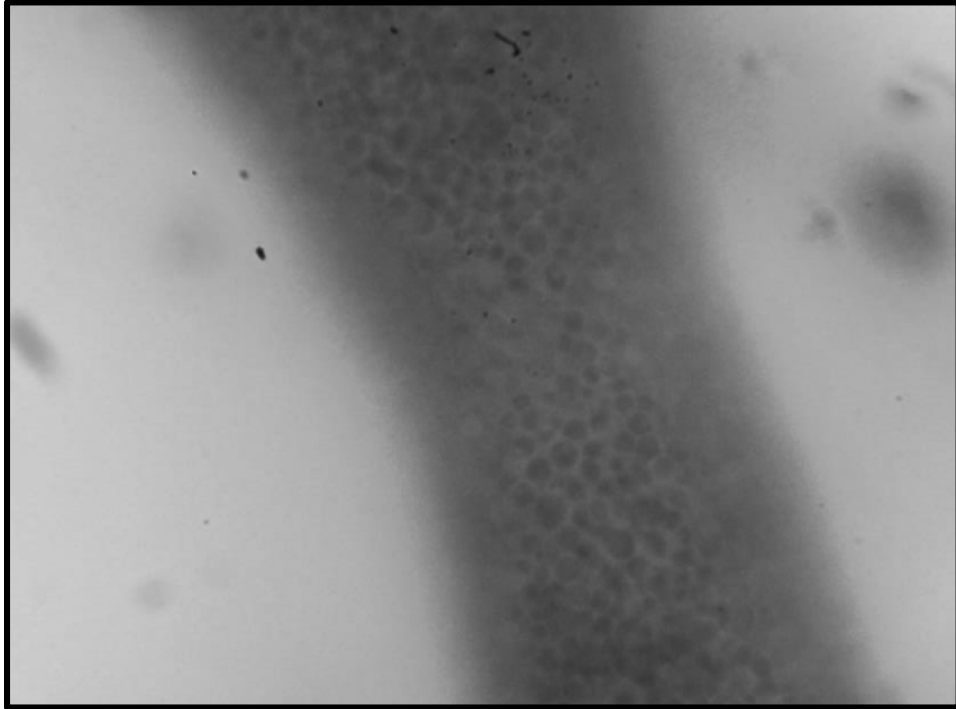
(Lactophenol blue festés, 1000x nagyítás)

6. ábra Morfológiailag Candida vagy Saccharomyces nemzetségbe tartozó sarjadzó gomba szintenyészetéből készült kenet mikroszkópos képe.



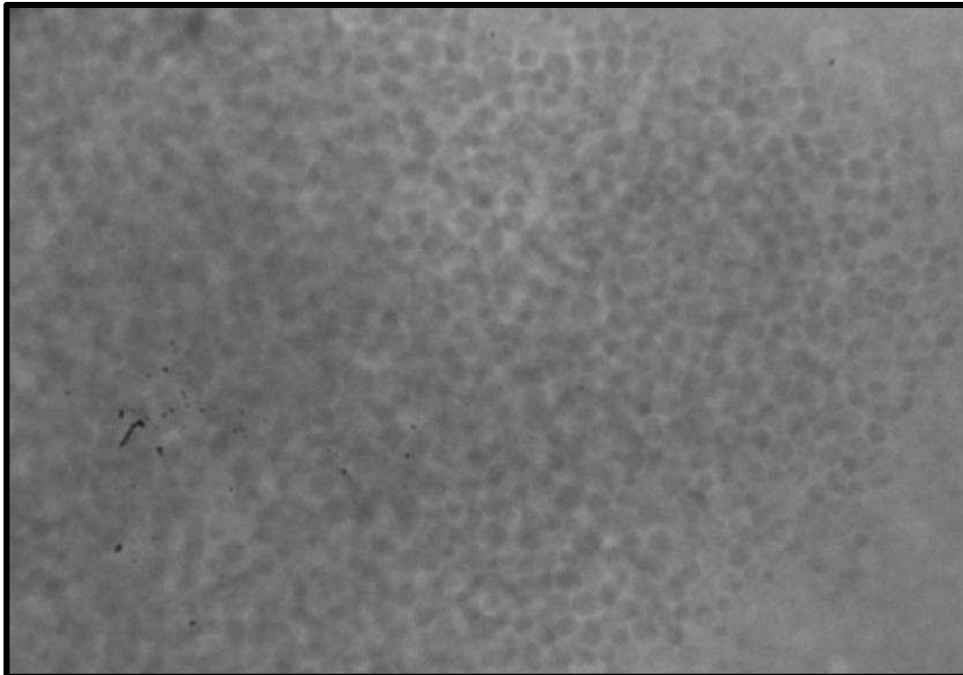
(Lactophenol blue festés, 1000x nagyítás)

7. ábra Morfológiailag Candida vagy Saccharomyces nemzetségbe tartozó sarjadzó gomba színtenyészetéből készült kenet mikroszkópos képe.



(Lactophenol blue festés, 1000x nagyítás)

8. ábra Morfológiailag Candida vagy Saccharomyces nemzetségbe tartozó sarjadzó gomba színtenyészetéből készült kenet mikroszkópos képe:

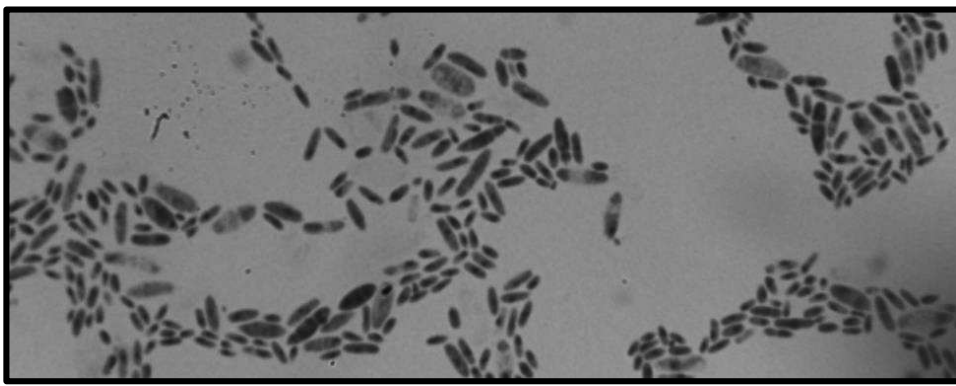


(Lactophenol blue festés, 1000x nagyítás)

A morfológiailag *Candida* vagy *Saccharomyces* nemzetségekbe sorolható sarjadzó gombák mikroszkópos felvételein (**5.**; **6.**; **7.**; és **8. ábra**) a gombasejtek kerekdednek, oválisnak mutatkoztak, egy nagy sejt-maggal a sejt egyik végén vagy a sejt közepén (**5.**; és **6. ábra**), vagy egységesen kerek megjelenést mutattak (**7.**; és **8. ábra**).

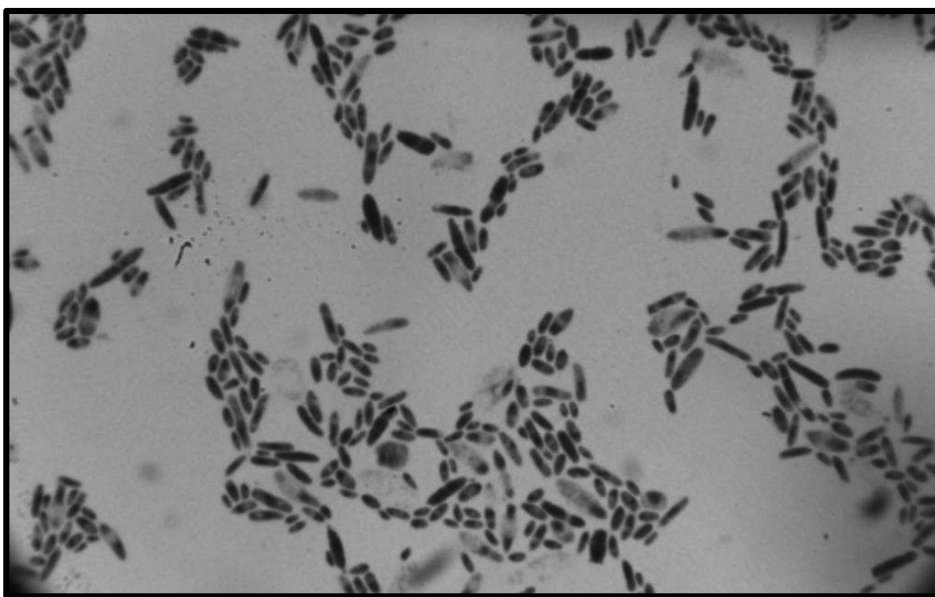
A 15 sikeres sarjadzó gomba tenyészetből 5 esetben *Pichia* fajokat tudtunk izolálni (6.3% az összes, 79 mintából). Ezekről a tenyészetekről is készítettünk felvételeket:

9. ábra *Pichia* nemzetségbe tartozó sarjadzó gomba színtenyészetéből készült kenet mikroszkópos képe.



(Panoptikus festés, 1000x nagyítás)

10. ábra *Pichia* nemzetségbe tartozó sarjadzó gomba színtenyészetéből készült kenet mikroszkópos képe.



(Panoptikus festés, 1000x nagyítás)

A *Pichia* nemzetségbe tartozó sarjadzó gomba fajok szintenyészeteinek (**9. ábra** és **10. ábra**) mikroszkópos megfigyelésekor megnyúlt, hengeres és orsó alakú gombasejteket láttunk, melyek többségében 2 sejtmag volt megfigyelhető.

A *C. guttulatus* izolálására tett kísérleteink, mind az élesztő-Saboraud-dextróz agaron, mind a *Cyniclomyces* táptalajon sikertelennek bizonyultak, minden *C. guttulatus* tartalmú bélsármintából.

Ugyanakkor 2 esetben is egy másik sarjadzó gomba szaporodott el a *C. guttulatus* számára optimális paraméterek mellett, egyszer az élesztő-Saboraud-dextróz agaron, egyszer pedig a *Cyniclomyces* táptalajon. Ezek telepmorfológiája megegyezett és a mikroszkópos ellenőrzés alapján a *Candida*/*Saccharomyces* csoportba tartoztak. Végeredményben nem tudtunk kialakítani *C. guttulatus* szintenyészeteket.

4.3. A molekuláris vizsgálatok eredményei

A *C. guttulatus* kitenyésztésének sikertelensége miatt a *C. guttulatus* PCR-vizsgálatait az ITS általános gomba primerekkel nem tudtuk elvégezni, mert ennél a módszernél a gomba-DNS kivonását szintenyészetből kellett volna végrehajtani, ellenkező esetben értékelhetetlen szekvenálási eredmény születne.

Az előbbiekből kifolyólag a *C. guttulatus* PCR-vizsgálatait az általunk tervezett *Cyniclomyces* primerekkel végeztük el a két leghamarabb begyűjtött *C. guttulatus*-ra pozitív bélsármintából, majd a kapott PCR-termékeket elküldtük szekvenálásra. A többi mintából a szekvenálás és a szekvencia-elemzés kedvezőtlen eredményei miatt nem csináltuk meg a PCR-vizsgálatokat.

Az 5 darab *Pichia* tenyészetből 3-at tudtunk megvizsgálni PCR segítségével, a maradék 2 esetben a tenyészetek penész fajokkal kontaminálódtak. Ebből 2 PCR-vizsgálat volt sikeres, a harmadiknál a negatív kontroll is reakciót mutatott, így ezt a PCR-terméket nem küldtük tovább szekvenálásra. Telepmorfológiájuk, szaporodási kondícióik, valamint mikroszkópos megjelenésük alapján azonban mind az 5 *Pichia* tenyészet megegyezett.

4.4: A szekvencia-analízis eredményei

Az általunk tervezett *Cyniclomyces* primerekkel végzett PCR amplikonjai (PCR-termékei) azonban a szekvencia-elemzés során *Candida* fajokkal mutattak 97%-os genetikai egyezést, melyből arra következtettünk, hogy a primerek aspecifikusan működtek. Ezáltal a kutatás során nem sikerült a *C. guttulatus* PCR-vizsgálatait sikeresen elvégezni, így specifikus szekvenciák hiányában, eredményeinket nem tudtuk összehasonlítani a génbanki adatokkal, ezáltal arra sem kaptunk választ, hogy az általunk talált *Cyniclomyces* törzsek mekkora egyezést mutatnak a korábban izolált törzsek adataival, illetve egymással.

A *Pichia* nemzetségbe tartozó sarjadzó gombákra elvégzett 2 sikeres PCR-vizsgálat amplikonjának szekvenciaelemzése során mindkét mintát *Pichia kluyveri*-ként tudtuk azonosítani, a szekvenciák 98-99%-os egyezésével.

4.5. A cukorasszimilációs vizsgálat eredményei

A morfológiailag *Candida*/*Saccharomyces* csoportból szűrőpróbaszerűen vizsgáltunk meg 2 mintát cukorasszimilációs próbával. Ebből egyik a *Cyniclomyces* táptalajon elszaporodott sarjadzó gomba volt. Mindkét esetben a megvizsgált fajokat *Candida albicans*-ként tudtuk azonosítani. Mindegyik morfológiailag kétes minta cukorasszimilációs teszttel való vizsgálatát a teszt magas ára miatt nem végeztük el.

5. Megbeszélés

5.1. Esetleírások

5.1.1. *C. guttulatus* macskában

2015.10.22.-én egy 14 éves ivartalanított házimacska kandúr érkezett a Cura-Vet Állatorvosi Rendelőbe, pár hete tartó hasmenéses tünetekkel. Az állat bélsara szúrós szagú, barna és pépes volt, benne nagyszámú *C. guttulatus*-szal, mely a bélsárminta parazitológiai vizsgálatánál, a flotációs dúsításnál jól megfigyelhető volt. Gyógykezelésként rostdús tápot és probiotikumot kapott, melynek hatására az állat javult, gyógyult. Mivel a macska rendszeresen kijárt, így valószínűleg a környezetből, rágcsálóktól vagy egyéb vektoroktól fertőződhetett a *C. guttulatus*-szal.

5.1.2. *C. guttulatus* kutyában

Egy körülbelül 1 éves, kertben tartott, nőtény német juhászkutya érkezett a Cura-Vet Állatorvosi Rendelőbe 2015. júliusának közepén, lesóványodás és krónikus hasmenés tüneteivel. Búzós, világosbarna bélsarat ürített, benne közepes mennyiségű Giardia cisztával. Gyógykezelésként napi 2x 750 mg fenbendazolt és fűrésztést írtak elő az állatnak. Július végén jöttek vissza kontrollra a kutyával, amely még mindig hasmenéses volt, dohos szagú, világosbarna bélsarat produkálva, benne kevés Giardia-cisztával és nagyszámú Saccharomyces-szerű gombával. Gyógykezelésként napi 2x 750 mg fenbendazolt kapott még 6 napig, újabb fűrésztést, diétát és probiotikumot írtak elő az állatnak. Ennek hatására szeptember közepére a Giardia ciszták eltűntek a kutya bélsarából, viszont a hasmenés és a nagyszámú Saccharomyces-szerű élesztő mellett más gomba is megjelent. A gyógykezelésnél elhagyták az anthelmintikumot és hosszú távon folytatták a rostdús diétát és a probiotikum terápiát. Ennek eredményeként 2015. október végére enyhült a hasmenés. A bélsárminta nem tartalmazott Giardiát, csak kisebb számú gombát. Későbbi bélsárminta elemzéseink során kiderült, hogy ennek a kutyának *C. guttulatus*, *Candida albicans*, és *Pichia kluyveri* fertőzése is volt, tehát összesen 3 olyan sarjadzó-gomba is megtelepedett a kutyában, melyek potenciálisan összefüggésbe hozhatóak emésztőszervi zavarokkal. Ezek a gombák együttesen, de akár önállóan is szerepet játszhattak a giardiosis kórlefolyásának súlyosbításában, valamint a parazita eltűnte után a dysbiosis hosszú távú fenntartásában.

5.1.3. Az esetleírások megbeszélése

Mindkét esetleírásban a *C. guttulatus* gomba túlzott proliferációja mellett feltételezhető volt valamiféle immunszuppresszív hatás. A német juhászkutyánál elsődlegesen a giardiosis okozhatott dysbiosist és emiatt tudott később a gomba elszaporodni, míg a 14 éves macska esetében az állat kora már önmagában egy jelentős immunszuppresszív tényezőként fogható fel. Ezen kívül a szakirodalomban úgyszintén giardiosis, valamint granulomatosus colitis (Manchester és mtsai, 2013) és PLE jelenléte mellett is több esetben leírták a *C. guttulatus* felbukkanását (Dijkstra és mtsai, 2010). Véleményünk szerint ezek az esetek a gomba opportunistá patogén szerepének lehetőségét erősítik.

A német juhászkutya esetleírásában közölt vegyes gombafertőzés alapján a hasmenéses páciensek kisebb arányában lehetnek olyan esetek, melyeknél biztonságosan nem alkalmazható antibiotikum, tüneti kezelésként. Ellenkező esetben a baktériumok elpusztítása révén a sarjadzógombák teret nyernének a túlszaporodáshoz, ami akár még súlyosbíthatja is a már meglévő gastrointestinalis tüneteket. Véleményünk szerint, ezért mikroszkóp birtokában minden krónikus hasmenéses kutyából és macskából ajánlott bélsár kenetet vizsgálni, mert elkészítése egyszerű, gyors diagnózist ad és általa elkerülhetőek lehetnek egyes téves terápiás kezelések. Emellett – kiemelten fővárosi viszonylatban – egyre több kutya- és macskatulajdonos tart igényt a fertőző eredetű hasmenések háttérében álló kórokozók pontos azonosítására, hogy állatuk mihamarabb a legmegfelelőbb kezelésben részesülhessen.

5.2. A mikroszkópos vizsgálat eredményeinek megbeszélése

Azért is kevés az információnk a gombákról, mert nehéz a detektálásuk és a besorolásuk a komplex biológiai mintákból. A gombák szövettani metszeteken való detektálása speciális, rutinszerűen nem végzett festéseket igényel és ezek a festések nem mindig alkalmasak az azonosításhoz. A szerológiai tesztek és immunoesszék csak a specifikus patogének esetében érhetőek el és gyakran alacsony érzékenységgűek (Suchodolski és mtsai, 2008). Ezért kutatásunk során mikroszkópos bélsár kenet-, hagyományos gomba-tenyésztés-, molekuláris-, és biokémiai vizsgálatokat végeztünk a gombák azonosításához. A mikroszkópos megfigyeléseknél számos patogén faj morfológiailag megkülönböztethetetlen az esetlegesen jelen lévő nem patogén elemektől, ezért a bélsár kenetek vizsgálati

eredményeit mindig a beteg tüneteivel és az egyéb diagnosztikai tesztek eredményeivel összhangban kell értelmezni. Ez a módszer alkalmas a háttér sejtek, az abnormális eukarióták és a patogén gyanús sejtalakok felderítésére (Wamsley, 2001).

Kutatásunk során a vizsgált kutyák 10.1%-ában találtuk meg mikroszkópos vizsgálattal a *C. guttulatus*-t. Ez az arány nem sokban tért el a szakirodalmi értékektől, ugyanis holland kutatók adatai szerint az általuk vizsgált 1564 hasmenéses kutyából 215 (14%) volt masszív *C. guttulatus* ürítő (Mandigers, és mtsai, 2014). Flausino és munkatársai (2012) egészséges kutyák bélsármintáinak 22,2%-ában találtak *C. guttulatus*-t, habár a beteg állatok mintáihoz képest jóval kisebb mennyiségben. Mivel a *C. guttulatus* gyakran előfordul egészséges kutyák bélsárában is, ezért – véleményünk szerint – nem a gomba jelenlétének van klinikai jelentősége, hanem annak, ha az képes erősen és hosszan tartóan megtelepedni és szaporodni kutyák és macskák gastrointestinalis traktusában, melyhez át kell törnie a gazda béltraktusának védelmi mechanizmusait.

5.3. A *C. guttulatus* előfordulási gyakorisága

A *C. guttulatus* előfordulási gyakoriságában hónapos megoszlásbeli eltéréseket tapasztaltunk (**1. diagram**). Az ősz vége felé lecsökkent a pozitív minták aránya. Már 2014-ben is megfigyelhető volt egy erős novemberi csökkenés a *C. guttulatus* előfordulási gyakoriságában, de az ezekről gyűjtött adatok elvesztek, így ezekre a jelenlegi kutatásban már nem tudunk támaszkodni. Megismételtük a kutatást 2015 őszén és hasonló eredményeket kaptunk. Shifrine és Phaff (1958) szerint a *C. guttulatus* szaporodása a bélcsatornán való továbbhaladás során leáll, vagy csak korlátozott mértékben folyik tovább, a magas környezeti pH miatt. Leírták, hogy a vegetatív sejtek átmenetileg a környezetben is túlélhetnek. Amennyiben a hőmérséklet, és a páratartalom adottak, a sejtek sporulálódnak, és az így képződött aszkuszokat állatok, rovarok és egyéb vektorok terjeszthetik és kontaminálhatják velük a vegetációt, melyet később egy másik állat elfogyaszthat. A gyomorban a spórák kicsíráznak, és új ciklus indul. Ezek alapján a prevalenciabeli csökkenés egyik oka lehet az időjárás kedvezőtlené válása, melynek során lecsökken a spóráképződés üteme a környezetben. Az aszkospóra képződés csak a szaporodási hőmérséklet alatt megy végbe, 18 °C hőmérsékleti optimummal (Boundy-Mills és Miller, 2011).

Másik oka lehet ennek az eltérésnek a vektorok számának megfogyatkozása. Az esetleírásban említett *C. guttulatus*-ra pozitív német juhászkutya kórelőzményi adatainak felvétele során a tulajdonos elmondta, hogy a kutyát a kertben tartották, ahol az utóbbi időben nagyszámú sünt figyeltek meg. Budapesten több kutya tulajdonos is jelezte, hogy gyakori volt náluk a sünök jelenléte, melyekkel kutyájuk érintkezhetett. Habár Parle (1957) egy új-zélandi kutatásában többek között sünök bélbeli élesztőfajait is vizsgálta és eredményképpen sünökben nem, csak nyulakban talált *C. guttulatus*-t, ennek alapján azonban mégsem zárható ki, hogy a Magyarországon is előforduló keleti sün (*Erinaceus roumanicus*) a *C. guttulatus* potenciális vektora lehet, mivel Új-Zélandon az európai sünt (*Erinaceus europaeus*-t) terjesztették el és Parle csak ez utóbbi fajt vizsgálta. A keleti sün szeptember végén, októberben keres téli menedéket, ezért, ebben az időszakban aktivitása megnő, majd valódi téli álmat alszik november közepétől március végéig (Barrett-Hamilton, 1900). A sünöknek ebből az életmódbeli sajátosságból adódó őszi előfordulási gyakorisága korrelált az általunk vizsgált kutyák *C. guttulatus* fertőzöttségének gyakoriságával. További, sünökre is kiterjesztett, kutyákra nézve pedig megemelt mintaelem-számú kutatások lennének szükségesek annak felderítéséhez, hogy a magyarországi keleti sünök hordozzák-e ezt a gombafajt, és hogy kutyákkal lehet-e járványtani kapcsolatuk.

5.4. A talált sarjadzó gombák áttekintése

5.4.1. *C. guttulatus*

Magyarországon végzett tanulmányokban is leírták a *C. guttulatus* kóroki szerepét. Egy, a Szent István Egyetem Állatorvos-tudományi Karának Kórbonctani és Igazságügyi Állatorvostani Tanszékén végzett, 39 degu elhullásának oktatát kivizsgáló kutatás során több esetben is a belekben *C. guttulatus* proliferáció miatti gáz akkumulációt, tympaniát és következményes fulladást diagnosztizáltak (Nagy és mtsai, 2009). Ehhez hasonlóan Prof. Dr. Fekete Sándor György (2009) nyulakban írt le rost-hiány szindrómánál jelentkező *C. guttulatus* okozta saccharomycosist. Masszív proliferációjának hatására túlzott gázfejlődés lépett fel a nyulak belében, tympaniát és invaginációt okozva.

Bár biopszia mintákban a *C. guttulatus* nincs jelen, és hatására a gazdaszervezetben nem találtak semmilyen gyulladást okozó reakciót (Mandigers és mtsai, 2014), nagymértékű kolonizációja mégis súlyosbítja a már meglévő emésztési zavart. Ezáltal a hasmenés

kiváltója vagy fenntartója is lehet (Houwens és Blankenstein, 2001). A gombának nincs nyilvánvaló hatása, mint elsődleges patogén, de nystatinnal végzett gyógykezelési tanulmányok eredményei alapján feltételezhető, hogy az esetek kisebb hányadában, ez a gomba opportunistá patogén szereppel bír (Mandigers és mtsai, 2014).

Mandigers és munkatársai (2014) a *C. guttulatus*-t Sabouraud-dextróz agaron sikeresen tenyésztették, amelyen legkevesebb 5 nap után világosbarna gombatelepek képződtek. Flausino és Baroni (2009) kísérletei alapján pedig jó eredményekkel szaporítható élesztő-pepton-dextróz agaron is, melyen a telepek simák, krémszínűek vagy barnák, vajszerű konzisztenciájúak. Ennek a táptalajnak az összetétele lényegében megegyezik az általunk használt élesztő-Sabouraud-dextróz-agar táptalajával. Ezzel szemben nekünk még savanyított, élesztő-Sabouraud-dextróz-agaron sem sikerült telepképződést elérnünk, 37°C-on inkubálva, 13% CO₂-gáz jelenlétében.

Shifrine és Phaff (1959), valamint Buecher és Phaff (1972) erős szaporodást értek el *Cyniclomyces* táptalajon, 15% széndioxid-gáz jelenlétében, 37°C-on. A táptalaj 1% élesztő autolizátumot, 1% proteóz-peptont, 2% glükózt és 1.5 % agart tartalmazott és a pH értéke 4.5-re volt beállítva. A szerzők 24 óra után sima, kissé fényes telepeket kaptak, melyben ovális, hengeres, 4.7-7.9 x 8.8-19.5 µm méretű, magányosan vagy párban álló, ritkán rövid láncokat alkotó sejteket figyeltek meg (Boundy-Mills és Miller, 2011). Az általunk rekonstruált *Cyniclomyces* táptalaj 1% élesztőgomba autolizátumot, 1% proteóz peptont, 4% glükózt és 2% agart tartalmazott Kurtzman és munkatársainak (2011) *Cyniclomyces* táptalaj receptje alapján. Ettől kissé eltérve, mi a táptalaj pH-értékét 3-as vagy ez alatti értékre állítottuk be, mely Zierdt és munkatársai (1988) szerint optimálisabb a szaporodáshoz. Emellett 13% CO₂-gázt biztosítottunk a gombának és 37°C-ot.

Munkánk során a *C. guttulatus*-t, megfelelő táptalajok és kondíciók biztosítása ellenére sem sikerült kitenyésztelnünk. Kezdetben arra gyanakodtunk, hogy a minták túl idősek ahhoz, hogy még élő állapotban tartalmazzák a gombát, de a friss mintákból elvégzett tenyésztési kísérletek szintén hasonló eredményre vezettek. Azok a gombák, amelyek kinőttek a *C. guttulatus* számára optimális élesztős-Sabouraud-dextróz és *Cyniclomyces* táptalajokon, savtűrő *Candida albicans* törzsek voltak két esetben is. Itt a fajt cukorasszimilációs próbával identifikáltuk. További tenyésztési kísérletek és újabb táptalajok bevonása lehet szükséges a *C. guttulatus* sikeres izolálásához.

A tenyésztési kísérletek eredménytelenségéből és a tervezett *C. guttulatus* primer aspecifikus reakciójából fakadóan a *C. guttulatus*-t nem tudtuk sikeresen megvizsgálni molekuláris módszerekkel. Ezáltal nem tudtuk összevetni szekvenciáit a génbanki adatokkal, így nem kaptunk választ arra a kérdésünkre, hogy az általunk kutyákból kimutatott *C. guttulatus* törzsek egyezést mutatnak-e korábbi *C. guttulatus* izolátumokkal.

5.5.2. Candida fajok

Kutatók leírták, hogy egyes invazív *Candida* törzsek a bélben való túlszaporodásuk során képesek a vérpályába lépni, ezzel fungaemiát okozva (Stone és mtsai, 1974). 2010-ben egy kutyából is leírtak ilyen, szisztémás mycosist, melyet egy invazív *Candida albicans* törzs okozott (Skoric és mtsai, 2010). Ugyanebben az évben egy *Candida albicans* törzs által okozott peritonitist is kimutattak egy kutyából, mely szintén szisztémás mycosis eredménye volt (Ong és mtsai, 2010). Emellett emberi újszülöttekben invazív *Candida* fajok képesek enteritist előidézni (Bond és mtsai, 2000). Valamint Japánban egy kutya esetében tudtak kutatók intestinalis candidiasist megfigyelni (Ochiai és mtsai, 2000). Ezek alapján a *Candida* fajok, különös tekintettel a *Candida albicans* törzsek opportunistá patogén szerepével is számolni kell, melyek két, általunk vizsgált kutyából is kimutathatóak voltak.

5.5.3. Pichia fajok

Handl és munkatársai (2011) egészséges kutyák és macskák fekális gombaközösségeit vizsgálták 16S rRNS gén piroszekvenálás segítségével. Egészséges kutyákban a *Pichia* fajok adták a gomba eredetű szekvenciák 0.14 %-át, míg egészséges macskákban nem volt jelen ez a gomba. A kutatásból nem derül ki pontosan, hogy a kutyák hány százalékában fordult elő, így ez az adat csak arra engedett minket következtetni, hogy a vizsgált egészséges kutyák emésztőtraktusának gombatársulásaiban ez a faj nem bírt komoly szereppel. Suchodolski és munkatársai egészséges kutyák mellett már beteg kutyákat is vizsgáltak, többek között *Pichia* fajok után kutatva, melyeket összesen 17 kutyából tudtak izolálni és mindet Észak-Európában. *Pichia anomala* törzseket 12 beteg kutyából, *P. guillermondii* törzseket 3 beteg kutyából és *P. burtonii* törzseket pedig 3 egészséges kutyából mutattak ki. Az általuk kapott összes gomba szekvencia közül kizárólag a 100%-osan *Pichia anomala*-val egyező szekvenciák mutattak szignifikáns összefüggést kutyák intestinalis megbetegedéseivel (Suchodolski és mtsai, 2008).

Az előbbiek közül több fajt, korábban humán megbetegedésekhez is társítottak már. Bakir és munkatársai (2004) gyerekekben írtak le *Pichia anomala* okozta fungaemiát. Kísérletes tanulmányokban kimutatták a „killer toxin” termelő *Pichia anomala* súlyos, akut bélkárosodást előidéző hatását, patkányokban (Pettoellomantovani és mtsai, 1995).

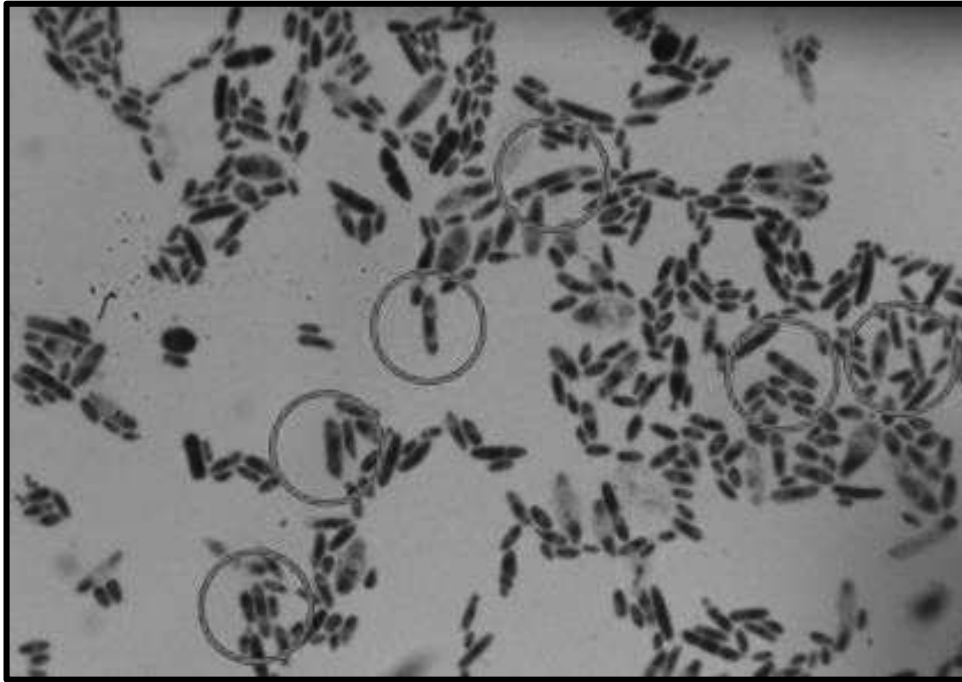
A *Pichia guilliermondii* élesztőfaj *Candida guilliermondii*-ként számon tartott, változatos megjelenésű ivartalan szaporodási alakjait opportunistáknak tartják immunszupresszált emberek esetében (Pfaller és mtsai, 2006). Ilyen törzseket izoláltak humán eredetű hasmenéses klinikai mintákból is (sanMillan és mtsai, 1997). Ugyanez a faj, kutyában bőr-candidiasist képes előidézni (Mueller és mtsai, 2002).

Egy szakállas agámában kutatók *Pichia burtonii* túlszaporodás okozta enteritist figyeltek meg. Feltételezték a faj opportunistáknak szerepét szakállas agámákban, valamint ilyen jellegű fertőzést írtak le egy humán esetben is (Kang és mtsai, 2011).

Mi a hasmenéses kutyák 6 %-ban, 5 esetben találtunk *Pichia* nemzetségbe tartozó élesztőket, macskából ugyanakkor mi sem tudtuk *Pichia* fajokat kimutatni, amely eltérés valószínűleg a kutya és a macska különböző táplálkozási szokásaiból vagy az általunk vizsgált macskák alacsony mintaelem-számából eredhet. Két mintából PCR-rel és szekvencia-elemzéssel is alátámasztottuk, hogy a talált gomba *Pichia* faj. Mindkét esetben *Pichia kluyveri*-t találtunk. Általános gomba tenyésztés során 5 esetben is csak ez a sarjadzó gomba nőtt ki egyből tiszta tenyészetet képezve, melyből arra következtettünk, hogy ez a sarjadzó gomba az adott bélsármintákban a gombatársulások domináns tagja volt. A *Pichia kluyveri* is termeli az említett „killer toxin”, melynek segítségével képes elpusztítani más, jótékony élesztő elemeket a béltraktusban (Pintar és Starmer, 2003; Starmer és mtsai, 1992), ezáltal hatással lehet a bélflóra természetes egyensúlyának felborulására. Ismereteink szerint ez az első leírás kutyákból izolált *Pichia kluyveri* törzsekről és az első leírás mely összefüggésbe hozza megjelenésüket kutyák gastrointestinalis megbetegedéseivel.

Ezen kívül megfigyeltük, hogy a *Pichia kluyveri* egyes vegetatív sejtjei (11. ábra A piros körökkel jelzett területeken) morfológiailag hasonlítanak a *C. guttulatus* vegetatív sejtjeire, de méretben elmaradnak tőlük. A *C. guttulatus* változatos sejtméretei miatt azonban ez a megfigyelési eredmény fontos lehet a két faj pontos elkülönítése során.

11. ábra *Pichia kluyveri* szintenyészetből származó kenet mikroszkópos képe.



(Panoptikus festés, 1000x nagyítás)

5.6. A gombák hatása a gastrointestinalis traktusra

Egy kutya bélsármintán elvégzett metagenom-vizsgálat szerint a gombák átlagosan kevesebb, mint 0.1%-át teszik ki a teljes mikrobiomnak (Swanson és mtsai, 2010). A bélbeli mikrobiom mégis létfontosságú a béltraktus egészségének szempontjából. Segítik az emésztést és az energiafelhasználást, tápanyagokat szolgáltatnak az bélhámsejteknek és szerepet játszanak az immunrendszer fejlődésében, valamint a patogén fajokkal szemben barrierként lépnek fel (Handl és mtsai, 2011).

Eltéréseket fedeztek fel egészséges és IBD-s (inflammatory bowel disease) emberek vastagbél biopszia mintáinak gombaközösségei között (Frank és mtsai 2007; Ott és mtsai, 2008). Valamint kutyákban és macskákban a krónikus hasmenés (Jia és mtsai, 2010) és a vékonybélbeli IBD kialakulása (Xenoulis és mtsai, 2008) kapcsán összefüggéseket találtak a bélbeli komplex ökoszisztéma felborulásával. Ezek az eredmények felvetik, hogy a gomba mikrobiom szerepet játszhat egyes krónikus gastrointestinalis betegségekben (Foster és mtsai, 2013). Ennélfogva a gomba mikrobiomról kutyák esetében is több, részletes leírás szükséges, azok béltraktusban betöltött szerepének jobb megértéséhez.

6. Összefoglalás

Munkánk során 79 hasmenéses kutya és 9 hasmenéses macska bélsarát vizsgáltuk meg. Célunk az volt, hogy felmérjük a főbb hazai sarjadzó gombák előfordulását, melyeket összefüggésbe hoznak gastrointestinalis megbetegedésekkel. A bélsárminták mikroszkópos, citológiai vizsgálata során a 88 bélsárkenetből 8 kutya és 1 macska mintában találtunk *C. guttulatus* élesztőgombát. Tudomásunk szerint ezek az első magyarországi *C. guttulatus* leírások hasmenéses kutyákból és macskából. Az általános gomba tenyésztés elvégzésekor 15 kutya eredetű mintából sikerült kitenyésztenünk *C. guttulatus*-tól eltérő sarjadzó gombákat. Ezek közül 12 esetben találtunk mikroszkópos morfológia alapján nem besorolható sarjadzó gombákat, ebből 2 mintát vizsgáltunk cukorasszimilációs próbával, melynek eredménye szerint mindkét esetben *Candida albicans* fajokat tudtunk izolálni. További 5 mintában találtunk morfológiai alapon a *Pichia* nemzetségbe tartozó sarjadzó gombákat, melyek közül 2 mintát PCR-vizsgálattal *Pichia kluyveri*-ként tudtunk azonosítani. Mind az 5 minta szintenyészetének telep morfológiája, szaporodási kondíciói és mikroszkópos megjelenése megegyezett. Ismereteink szerint ez az első *Pichia kluyveri* leírás hasmenéses kutyákból. Vizsgálataink alapján feltételezzük, hogy az általunk tanulmányozott *Pichia kluyveri* sarjadzó gomba potenciális szereppel bírhat kutyák hasmenéses kórképeiben. Emellett, összesen 4 kutyában találtunk vegyes sarjadzó gomba fertőzést. Az említett eredmények és a szakirodalmi adatok alapján megállapíthatjuk, hogy a sarjadzó gombák hozzájárulhatnak a normál bélflóra felborulásához, mely klinikai tünetekben is megnyilvánulhat, különösen, ha a gombák nagy számban vannak jelen a bélsárban. Véleményünk szerint, súlyos esetekben nystatin kezelést érdemes alkalmazni az eltolódott gombaflóra helyreállítása érdekében. Ezt követően probiotikumokkal kolonizálható újra az állatok bélcsatornája, valamint emelt rosttartalmú diétás tápokkal, gyógytápokkal javítható a beteg állapota. Ezáltal egy irányítottabb folyamat keretei között lehetne elérhető, hogy ismét a gombatársulások hasznos elemei domináljanak a beteg kutyák és macskák béltraktusában. További kutatások lennének szükségesek egyrészt annak megválaszolásához, hogy Magyarországon mely állatok lehetnek a *C. guttulatus* vektorai, másrészt annak felderítésére, hogy a kutyákban előforduló – általunk morfológiailag *C. guttulatus*-ként azonosított – élesztő azonos-e a nyúlban található *C. guttulatus* fajjal. Érdemes lenne továbbá mélyrehatóbb vizsgálatokat végezni a *Pichia kluyveri* gastrointestinalis megbetegedésekben betöltött szerepével kapcsolatban, kutyák esetében.

7. Summary

During a period of 3 months, a total of 88 fecal samples were evaluated from dogs and cats with symptoms of diarrhoea, 79 samples were collected from dogs, 9 from cats. The aim of this study was to determine the prevalence of the main yeasts in dogs and cats related to gastrointestinal disorders, in Hungary. In fecal cytological examination of the 88 fecal smears, *Cyniclomyces guttulatus* yeast was found in 8 dog and 1 cat samples. To our knowledge, this is the first report in Hungary that *C. guttulatus* appeared in feces of dogs and cats with clinical symptom of diarrhea. According to the results of the general fungal cultivation of 35 fecal samples, 15 were contained yeasts except for *C. guttulatus*. Of these, in 12 cases were found that kind of yeasts which were not be able to classify on the basis of microscopic morphology. Two samples of this group were examined with colorimetric sugar assimilation test, and were identified as *Candida albicans*. In another 5 samples were found *Pichia* yeast species on the basis of microscopic morphology, and 2 of these were identified by PCR, as *Pichia kluyveri*. All 5 *Pichia* pure culture were shown complete homology in colonial morphology, reproductive conditions and microscopic appearance. In 4 dogs were found a mixed fungal infection of budding yeasts related to gastrointestinal disorders. To our best knowledge, this is the first report that *Pichia kluyveri* strains were identified from dogs with diarrhoea. According to the results of our study, a yeast fungus, *Pichia kluyveri* can be expected in the similar examinations of diarrhea in dogs. This fungi has been not studied sufficiently despite of possibility of causing potentially digestive disturbances. On the basis of these results and literature data budding yeast were suggested to consider as abnormal flora elements if they are shedding in large quantities and making gastrointestinal symptoms. In our opinion these cases should be started on treatment with nystatine to eliminate the shifted fungal microflora. After this will be possible the re-colonization of the digestive tract of the animals with probiotics. Besides with advanced fiber dietary feeds and medical feed could be improve the condition of the patients. In this way it might be available to dominate again the useful elements of mushroom associations of the patient's intestinal tract of cats and dog, within the framework of a more managed process. Further research would be needed to answer that in Hungary, which the animals could be vectors of *C. guttulatus* and that the occurring yeast in dogs - we morphologically identified as *C. guttulatus* - is identical to the rabbit species found *C. guttulatus* or not. It would also be worth to perform more in-depth analysis of the *Pichia kluyveri*, in the context of gastrointestinal diseases of dogs.

8. Irodalomjegyzék

1. ABD-ELSALAM, K.A., 2003. Bioinformatic tools and guideline for PCR primer design. *African Journal of Biotechnology*: 2003 2(5): p. 91-95.
2. AGUILAR-USCANGA, B., FRANÇOIS, J.M., 2003. A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth conditions and mode of cultivation. *Lett Appl Microbiol.* 2003;37(3):p.268-74.
3. Andreasen, C.B., Jergens, A.E, Meyer, D.J., 2001: Oral Cavity, Gastrointestinal Tract, and Associated Structures. *Atlas of Canine and Feline Cytology*. Missouri: Elsevier, 2001. p.192-214.
4. BAKIR. M., CERIKCIOĞLU, N., TIRTIR, A., BERRAK, S., OZEK, E., CANPOLAT, C., 2004. *Pichia anomala* fungaemia in immunocompromised children. *Mycoses*. 2004 Jun;47(5-6):p.231-5.
5. Barrett-Hamilton, 1900: Species *Erinaceus roumanicus*. In: Don E. Wilson & Dee Ann M. Reeder, 2005: *Mammal Species of the World (3. kiadás)*, *Ann. Mag. Nat. Hist.*, ser. 7, 5: p.365.
6. BOND, S., STEWART, D.L., BENDON, R.W., 2000. Invasive *Candida* enteritis of the newborn. *J. Pediatr. Surg.* 2000 Oct;35 (10):p.1496-8.
7. BOUNDY-MILLS, K, MILLER, M.W., 2011. *Cyniclomyces van der Walt* & D.B. Scott (1971). *The Yeasts, a Taxonomic Study*, Chapter 23, p.357-360.
8. BUECHER, E.J., PHAFF B., PHAFF. H.J., 1970. Growth of *Saccharomyces Schiönning* Under Continuous Gassing. *J. Bacteriol.*, 1970, 104(1):p.133.
9. BURGISSER, H., 1961. *Saccharomyces guttulata* est-il réellement pathogène pour le lapin? *Pathol. Microbiol.*, 24, p.357-362.
10. CARL C. LINDEGREN, 1945. An Analysis of the Mechanism of Budding in Yeasts and Some Observations on the Structure of the Yeast Cell. *Mycologia*, Vol. 37, No. 6 (Nov. - Dec., 1945), p.767-780.
11. CENIS, J.L., 1992. Rapid extraction of fungal DNA for PCR amplification. *Nucleic Acids Res.* 1992 May 11; 20(9): p.2380. PMID: PMC312363
12. DAVIS, C. P., CLEVEN D., BALISH E., YALE C.E., 1977. Bacterial association in the gastrointestinal tract of Beagle dogs. *Appl. Environ. Microbiol.* 34:p.194-206.

13. DIJKSTRA, M, KRAUS J.S., BOSJE J.T. ET AL, 2010. Protein-losing enteropathy in Rottweilers. *Tijdschr Diergeneeskd* 135:p.406–412.
14. FEKETE, S. GY., 2009. Nutrition and dietetics of Rabbit [.pdf] URL: <http://www.univet.hu/en/aotk/department-of-animal-breeding,-nutrition-and-laboratory-animal-science/department-of-animal-nutrition/courses/animal-nutrition-ii/> Letöltve: 2015.02.09.
15. FLAUSINO, G, BARONI F.A., 2009 Isolation of *Cyniclomyces guttulatus* (Robin) Van Der Walt and Scott (1971). *Rev Bras Med Vet* 31:p.100–103.
16. FLAUSINO, G., PAULO D.S., MCINTOSH L.D., AMARAL L.G., TEIXEIRA-FILHO W.L., FLAUSINO W., 2012. Isolation and Characterization of *Cyniclomyces guttulatus* (Robin) Van Der Walt and Scott, 1971 in Dogs in Brazil. *Curr Microbiol.* 2012 Nov;65(5):p.542-6.
17. FOSTER, M.L., DOWD, S.E., STEPHENSON, C., STEINER, J.M., SUCHODOLSKI, J.S., 2013. Characterization of the Fungal Microbiome (Mycobiome) in Fecal Samples from dogs. *Vet Med Int.* 2013; 2013:658373. doi: 10.1155/2013/658373. Epub 2013 Apr 23.
18. FRANK, D.N., ST.AMAND A.L., FELDMAN R.A., BOEDICKER C., HARPAZ N. & PACE N.R., 2007 Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *P Natl Acad Sci USA*, 2007 Aug 21;104(34):p.13780-5. Epub 2007 Aug 15.
19. FURTADO, T.T., FLAUSINO, G., DE SANT'ANNA LEAL, P.D., FERREIRA, J.P., MCINTOSH, D., FLAUSINO, W., TEIXEIRA FILHO, W.L., PAES-DE-ALMEIDA, E.C., GOMES LOPES, C.W., 2013. Diagnóstico de colangite associado à mucocèle da vesícula biliar por *cyniclomyces guttulatus* em cães - relato de casos. *Rev. Bras. Med. Vet.*, 35(1):p.1-6.
20. GJERDE, B.; HOLTET, L.; SANDEN, S.; DAHLGREN, S. S., 2009. *Cyniclomyces guttulatus*-lignende sopp som mulig årsak til gastroenteritt hos hund - en kasusbeskrivelse. *Norsk Veterinærtidsskrift* 2009 Vol. 121 No. 6 p. 507-510.
21. GOULIAMOVA, D.E., STOILOVA-DISHEVA M.M., DIMITROV R.A., GUSHTEROVA A.G., VASILEVA-TONKOVA E.S., PASKALEVA D.A., STOYANOVA P.E. 2011. Preliminary characterization of yeasts and actinomycetes isolated from mammalian feces. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 26:sup 1, p.1-4.

22. HANDL, S., DOWD, S. E., GARCIA-MAZCORRO, J. F., STEINER, J. M., & SUCHODOLSKI, J. S., 2011. Massive parallel 16S rRNA gene pyrosequencing reveals highly diverse fecal bacterial and fungal communities in healthy dogs and cats. *FEMS Microbiol Ecol* 76 (2011) p.301-310.
23. HERSEY-BENNER, C., 2008. Diarrhea in a rabbit. *Cyniclomyces guttulatus* yeast. *Lab Animal (NY)* 37:p.347–349.
24. HOUWERS, D. J., BLANKENSTEIN, B.: *Cyniclomyces guttulatus* and diarrhea in dogs, *Tijdschr Diergeneeskd*, 2001. 126. 14-15. p.502-502.
25. JIA, J., FRANTZ, N., KHOO, C., GIBSON, G.R., RASTALL, R.A. & MCCARTNEY, A.L., 2010. Investigation of the faecal microbiota associated with canine chronic diarrhea. *FEMS Microbiol Ecol* 71: p. 304–312.
26. KANG, H.-M., HAN, J.-I., LEE, S.-J., JANG, H.J., NA, K.-J., 2011. Isolation of *Pichia burtonii* from the Feces of an Enteritis Bearded Dragon (*Pogona vitticeps*) *한국임상수의학회지 제28권 제2호*, 2011.4, p.254-257 (4 pages).
27. KASS, L., 1988. Basic Blue 41: A New Panoptic Stain for Blood and Bone Marrow Cells. *Review.*, *PMID:1703670 Volume 11*, Issue 1 (01 March 1988), p. 10-15.
28. KURTZMAN, C.P., FELL J.W., BOEKHOUT T., ROBERT V., 2011. Methods for Isolation, Phenotypic Characterization and Maintenance of Yeasts. *The Yeasts, a Taxonomic Study*, chapter 7., p. 87-110.
29. KURTZMAN, C.P., ROBNETT, C.J., 1998. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie Leeuwenhoek* 73: p.331–371.
30. MANCHESTER, A.C., HILL S., SABATINO B., ARMENTANO R., CARROLL M., KESSLER B., MILLER M., DOGAN B., MCDONOUGH S.P., AND SIMPSON K.W., 2013. Association between Granulomatous Colitis in French Bulldogs and Invasive *Escherichia coli* and Response to Fluoroquinolone Antimicrobials. *J Vet Intern Med* 2013;27:p.56–61.
31. MANDIGERS, P.J., 2007. *Cyniclomyces guttulatus*, a differential diagnosis in chronic diarrhea (poster). *Proceedings 17th ECVIM-CA Congress and 9th ESVCP Congress: Budapest, Hungary, September 13-15, 2007.* p. 223. (Poster 1.)

32. MANDIGERS, P.J., DUIJVESTIJN, M.B., ANKRINGA, N., MAES, S., VAN ESSEN, E., SCHOORMANS, A.H., GERMAN, A.J., HOUWERS, D.J., 2014. The clinical significance of *Cyniclomyces guttulatus* in dogs. *Vet Microbiol.* 2014 Aug 6;172(1-2):p.241-7.
33. MANJUNATH, V., VIDYA, G.S., SHARMA, A., PRAKASH, M.R., 2012. Speciation of candida by hicrome agar and sugar assimilation test in both hiv infected and non infected patients. *Murugesh, Int J Biol Med Res.* 2012; 3(2): p.1778 – 1782.
34. MCGINNIS, S., MADDEN, T.L., 2004. BLAST: at the core of a powerful and diverse set of sequence analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 2004 Jul 1;32(Web Server issue): p. 20-25.
35. MENDONCA-HAGLER, L.C., PHAFF, H.J., 1975. Deoxyribonucleic Acid Base Composition and Deoxyribonucleic Acid/Deoxyribonucleic Acid Hybrid Formation in Psychrophobic and Related Yeasts. *International Journal of Systematic Bacteriology*, Apr. 1975, Vol. 25, No. 2. p. 222-229.,
36. MENTULA, S., HARMOINEN, J., HEIKKILA, M., RAUTIO, W.E.M., HUOVINEN, P., KONONEN, E., 2005. Comparison between cultured small-intestinal and fecal microbiotas in Beagle dogs. *Apll. Environ. Microbiol.* 71:p.4169-4175.
37. MUELLER, R.S., BETTENAY, S.V., SHIPSTONE, M., 2002. Cutaneous candidiasis in a dog caused by *Candidaguilliermondii*. *Veterinary Record* (2002) 150, p.728-730.
38. NAGY, B., KASSAI E., MÁNDOKI M., ARADI ZS., GÁL J., 2009. Investigation on the causes leading to death in degu (octodon degus) between 1998–2009. *Contents page of the issue march of 2012*, p. 6-7.
39. NEEL, J.A., PIPERSOVA I., MOROFF, S., MOTSINGER-REIF, A., GOOKIN, J.L., 2013. *Cyniclomyces guttulatus* in companion animals: a first look at a potential pathogen. *CVM Annual Research Forum and Litwack Lecture*, (February 20. 2013.), p. 24.
40. NEEL, J.A., TARIGO, J., GRINDEM, C.B., 2006. Gallbladder aspirate from a dog. *Vet Clin Path* 35:p.467–470.
41. OCHIAI, K., VALENTINE, B.A., ALTSCHUL, M., 2000. Intestinal candidiasis in a dog. *The Veterinary Record*, 2000, 146(8):p.228-229, DOI: 10.1136/vr.146.8.228.
42. ONG, R.K., RAISIS, A.L., SWINDELLS, K.L., 2010. *Candida albicans* peritonitis in a dog. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)*. 2010 Feb;20(1):p.143-7. doi: 10.1111/j.1476-4431.2009.00481.x.

43. OTT, S., KÜHBACHER, T., MUSFELD, M., ROSENSTIEL P., HELLMIG S., REHMANN A., DREW O., WEICHERT W., TIMMIS K. & SCHREIBER S., 2008. Fungi and inflammatory bowel disease: alterations of composition and diversity. *Scand J Gastroenterol* 43: p.831–841.
44. PARLE, J.N., 1956. The growth of *Saccharomycopsis guttulata*. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 1956;22(3):p.237-42.
45. PARLE, J.N., 1957. Yeasts Isolated from the Mammalian Alimentary Tract. *J. gen. Microbiol.* 17, p.363-367.
46. PEETERS, J.E., POHL, P., CHARLIER, G., 1984. Infectious agents associated with diarrhoea in commercial rabbits, a field study. *Ann. Rech. Vét.*, 1984. 15 (3), p.335-340.
47. PETERS, S., HOUWERS, D.J., 2009. A cat with diarrhoea associated with the massive presence of *Cyniclomyces guttulatus* in the faeces. *Tijdschr Diergeneeskd.* 2009 Mar 1;134(5):p.198-9. [Article in Dutch: Een geval van diarree geassocieerd met *Cyniclomyces guttulatus* (brillendoosjesgist) bij de kat].
48. PETTOELLOMANTOVANI, M., NOCERINO, A., POLONELLI, L., MORACE, G., CONTI, S., DIMARTINO, L., DERITIS, G., IAFUSCO, M., GUANDALINI, S., 1995. *Hansenula anomala* killer toxin induces secretion and severe acute injury in the rat intestine. *Gastroenterology* 109, p.1900-1906.
49. PFALLER, M.A., DIEKEMA, D.J., MENDEZ, M., KIBBLER, C., ERZSEBET, P., CHANG, S.C., GIBBS, D.L., NEWELL, V.A., 2006. *Candida guilliermondii*, an opportunistic fungal pathogen with decreased susceptibility to fluconazole: geographic and temporal trends from the ARTEMIS DISK antifungal surveillance program. *J Clin Microbiol.* 2006 Oct;44(10):p.3551-6.
50. PINTAR, J., STARMER, W.T., 2003. The costs and benefits of killer toxin production by the yeast *Pichia kluyveri*. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2003;83(1):p.89-97.
51. PONCHEL, F., TOOMES, C., BRANSFIELD, K., LEONG, F.T., DOUGLAS, S.H., FIELD, S.L., BELL, S.M., COMBARET, V., PUISIEUX, A., MIGHELL, A.J., ROBINSON, P.A., INGLEHEARN, C.F., ISAACS, J.D., MARKHAM, A.F., 2003. Real-time PCR based on SYBR-Green I fluorescence: an alternative to the TaqMan assay for a relative quantification of gene rearrangements, gene amplifications and micro gene deletions. *BMC Biotechnol.* 2003 Oct 13;3: p.18.
52. RICHLE, R., SCHOLER, H.J., 1961. *Saccharomycopsis guttulata* vom Kaninchen: kulturelle Eigenschaften und mögliche Bedeutung. *Pathol. Microbiol.*, 24, p.783-793.

53. SAITO, K., SAITO, H., WATANABE, T., 2000. *Cyniclomyces guttulatus*: it can now be clearly observed in canine feces. *Second Board of Veterinary Practitioners Proceedings of Japan*, 2000. p. 245-246.
URL: <http://www33.ocn.ne.jp/saitoahohp/Cyniclomyces.htm>. Accessed: 23.05.2008.
54. SANMILLAN, R.M., WU, L.C., SALKIN, I.F., LEHMANN, P.F., 1997. Clinical isolates of *Candida guillermnoodii* include *Candida fermentati*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47, p.385-393.
55. SCHOCH, C.L., SEIFERT K.A., HUHDORF S., ROBERT V., SPOUGE J.L., LEVESQUE C.A., CHEN W., AND FUNGAL BARCODING CONSORTIUM: 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012 Apr 17; 109(16): p. 6241–6246.
56. SHIFRINE, M., PHAFF, H.J., 1958. On the isolation, ecology and taxonomy of *Saccharomycopsis guttulata*. *Antonie van Leeuwenhoek* 24(3/4):p.193-209.
57. SKORIC, M., FICTUM, P., PAVLIK, I., 2010. systemic mycosis due to candida albicans infection in a dog. *Journal of comparative pathology* 11/2010; 143(4):p.324-324. doi: 10.1016/j.jcpa.2010.09.046
58. STARMER, W.T., GANTER, P.F., ABERDEEN, V., 1992. Geographic Distribution and Genetics of Killer Phenotypes for the Yeast *Pichia kluyveri* across the United States. *Applied and Environmental Microbiology*, Mar. 1992, p.990-997.
59. STONE, H.H., KOLB, L.D., CURRIE, C.A., GEHEBER, C.E., CUZZELL, J.Z., 1974. Candida Sepsis: Pathogenesis and Principles of Treatment. *Ann Surg.* 1974 May; 179(5): p.697–711.
60. SUCHODOLSKI, J.S., MORRIS, E.K., ALLENSPACH, K., JERGENS, A.E., HARMOINEN. J.A., WESTERMARCK, E., STEINER, J.M., 2008. Prevalence and identification of fungal DNA in the small intestine of healthy dogs and dogs with chronic enteropathies. *Veterinary Microbiology* 132 (2008) p. 379-388.
61. SWANSON, K.S., DOWD, S.E, SUCHODOLSKI, J.S., MIDDELBOSS, I.S., VESTER, B.M., BARRY, K.A., NELSON, K.E., CANN, I.K., WHITE, B.A., FAHEY, G.C., 2010. Phylogenetic, and gene-centric metagenomics of the canine intestinal microbiom reveals similarities with humans and mice. *ISME J.* 2011 Apr;5(4):p.639-49.
62. VAN DER WALT, J.P., SCOTT, D.B., 1971. The yeast genus *Saccharomycopsis* Schiönning, 1971. *Mycopathologia et Mycotogia applicata*, vol. 43, 3-4, p.279-288.
63. WAMSLEY, H.L.: Dry-Mount Fecal Cytology. In: *Atlas of Canine and Feline Cytology*. Missouri: Elsevier, 2001. p. 215-225.

64. XENOULIS, P.G., PALCULICT, B., ALLENSPACH, K., STEINER, J.M., VAN HOUSE, A.M. & SUCHODOLSKI, J., 2008. Molecular-phylogenetic characterization of microbial communities imbalances in the small intestine of dogs with inflammatory bowel disease. *FEMS Microbiol Ecol* 66: p.579–589.
65. ZIERDT, C.H., DETLEFSON C., MÜLLER J., WAGGLE K.S., 1988. *Cyniclomyces guttulatus* (*Saccharomycopsis guttulata*) – culture, ultrastructure and physiology. *Antonie van Leeuwenhoek* 54:p.357-366.

9. Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Pápa Kingának, szakmai támogatásáért, tanácsaiért, építő jellegű kritikáiért és türelméért.

Köszönöm Dr. Halmay Dórának és az Ebsont Beforr Állatorvosi Rendelő csapatának a téma felvetését, valamint a mintafeldolgozásban és a mikroszkópos vizsgálatok kiértékelésében nyújtott segítséget, továbbá a Cura-Vet Állatorvosi Rendelő állatorvosainak, Dr. Kelemen Barbara Szilviának és Dr. Gyurovszki Mihálynak a mintagyűjtés megkönnyítését és az esettanulmányok megírásához szükséges adatokat.

Ezen kívül hálával tartozom Dr. Hegedűs György-Tamás laborvezetőnek, szakmai tanácsaiért és a vizsgálatok megvalósításához biztosított tárgyi eszközökért, valamint a Vet-Med-Labor Állatorvosi Diagnosztikai Laboratórium teljes csapatának, de különösen Dr. Szabó Nikolettának a mintagyűjtésben, és Dallos Bianka Adélnak a PCR-vizsgálatokban nyújtott segítségükért.

Végül köszönöm családomnak, hogy mindvégig támogattak, és bátyámnak, Csizmás Gergelynek a szakirodalom-gyűjtésben hasznos javaslatait és a motivációt ahhoz, hogy az állatorvosi pálya mellett kötelezzem el magam.