

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Melina BURNIĆ

**PRISOTNOST OPORTUNO PATOGENIH GLIV V
RUTINSKO NEKONTROLIRANIH PROSTORIH V
BOLNIŠNICI GOLNIK**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Melina BURNIĆ

**PRISOTNOST OPORTUNO PATOGENIH GLIV V RUTINSKO
NEKONTROLIRANIH PROSTORIH V BOLNIŠNICI GOLNIK**

DIPLOMSKA NALOGA
Univerzitetni študij

**THE PRESENCE OF OPPORTUNE PATHOGENIC FUNGI IN
ROUTINELY UNCONTROLLED AREAS OF A HOSPITAL GOLNIK**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2013

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija biologije. Raziskave so bile opravljene na Katedri za molekularno genetiko in biologijo mikroorganizmov, Oddelek za biologijo Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani.

Študijska komisija Oddelka za biologijo je za mentorico diplomske naloge imenovala doc. dr. Polono Zalar, in za somentorico dr. Viktorijo Tomič, dr.med.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Nina GUNDE-CIMERMAN

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: doc. dr. Polona ZALAR

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: dr. Viktorija TOMIČ, dr. med.

Univerzitetna klinika za pljučne bolezni in alergijo Golnik

Članica: doc. dr. Tadeja MATOS, dr. med.

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Datum zagovora: 25. 03. 2013

Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Melina Burnič

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn

DK UDK 573.4:582.282.123.4:615.282.84:614.253.1(497.4Golnik)(043.2)=163:6

KG prostori bolnišnice na Golniku / kužnine bolnikov / patogene glive / *Aspergillus* // *Candida* / *Cladosporium* / *Exophiala* / ITS rDNA / LSU rDNA / aktin

AV BURNIČ, Melina

SA ZALAR, Polona (mentorica) / TOMIČ, Viktorija (somentorica) / MATOS, Tadeja (recenzentka)

KZ SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111

ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

LI 2012

IN PRISOTNOST OPORTUNO PATOGENIH GLIV V RUTINSKO NEKONTROLIRANIH PROSTORIH V BOLNIŠNICI

TD Diplomsko delo (Univerzitetni študij)

OP XIII, 86 str., 10 pregl., 18 sl., 103 vir.

IJ sl

JI sl/en

AI Glive so ubikvitarni, medicinsko pomembni mikroorganizmi. Lahko povzročajo alergije in različna respiratorna obolenja, predvsem pri imunsko oslabljenih ljudeh, zaradi suhoprašnih spor, ki se prenašajo po zraku. Najpogostejši glivni bolnišnični okužbi sta s predstavniki rodov *Aspergillus* in *Candida*. Zdravljenje je lahko dolgotrajno, zapleteno in se velikokrat konča s smrtjo. V diplomskem delu smo ugotavljali prisotnost oportuno patogenih gliv v rutinsko nekontroliranih prostorih bolnišnice za respiratorne bolezni na Golniku ter preverili morebitne povezave s izmečki bolnikov. V bolnišnici smo vzorčili prostore, v katerih lahko vlaga in temperatura prdstavljata potencialno možnost za naselitev gliv. Vzorčili smo: (i) različne prostore namenjene zračenju, in sicer klimatske naprave ter zračnike; (ii) prostore in aparature, kjer se zadržuje voda, kot so kopalnice oz. zelo različne mikroniše znotraj le-teh, avtomati za vodo, izlivniki. Poleg tega smo na prisotnost gliv testirali tudi (iii) izmečke bolnikov, ki se zdravijo za različnimi respiratornimi boleznimi. Glive smo v namen primerjave izolirali tudi iz domačih kopalnic. Ugotovili smo, da so predvsem v zračnikih in režah klimatskih naprav pogosto prisotne plesni vrste *Aspergillus fumigatus* ter različne vrste rodu *Cladosporium*. Prisotnost vrste *A. fumigatus* smo ugotovili v bolnišničnih kopalnicah, v nasprotju z domačimi kopalnicami, kjer so se pojavljale predvsem različne kvasovke. Iz izmečkov bolnikov smo izolirali kvasovke vrste *Candida albicans*, ki smo jo našli tudi v bolniških sobah. Povezanosti med prisotnostjo plesni *A. fumigatus* in bolnikih nismo dokazali.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn

DC UDC 573.4:582.282.123.4:615.282.84:614.253.1(497.4Golnik)(043.2)=163:6

CX the premises of the hospital at Golniku / secretions of patients / pathogenic fungi / *Aspergillus* / *Candida* / *Cladosporium* / *Exophiala* / ITS rDNA / LSU rDNA / aktin

AU BURNIĆ, Melina

AA ZALAR, Polona (supervisor) / TOMIČ, Viktorija (co-advisor) / MATOS, Tadeja (reviewer)

PP SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111

PB Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

PY 2012

TI THE PRESENCE OF OPPORTUNE PATHOGENIC FUNGI IN ROUTINELY UNCONTROLLED AREAS OF A HOSPITAL

DT Graduation Thesis (University studies)

NO XIII, 86 p., 10 tab., 18 fig., 103 ref.

LA sl

AL sl/en

AB Fungi are ubiquitous, medical important microorganisms. Spores are transmitted by air and can cause allergies and respiratory disorders, particularly in humans with suppressed immune system. The representatives of the genera *Aspergillus* and *Candida* are the most common fungi, that cause nosocomial fungal infections. In our diploma work, we have to determine the presence of pathogenic fungi in routine uncontrolled areas of the hospital for respiratory diseases at Golnik and check any connections between areas and sputums of the patients. In the hospital we took samples in areas, in which the humidity and temperature represent potential option for the introduction of the fungi. The areas are: (i) the various rooms intended for breathing, air conditioners and vents; (ii) the areas and apparatus, which hold the water, such as bathrooms or very different microniches inside these machines for water; (iii) the sputums of the patients being treated for various respiratory diseases. We isolated fungi in the purpose of the comparison was isolated from domestic bathrooms. We discovered that fungi *Aspergillus fumigatus*, and various species of the genus *Cladosporium* are present in the slots of air conditioners. We also found species of *A. fumigatus* in hospital bathrooms, in contrast with domestic bathrooms, where we isolated different yeasts. From the sputums of the patients we isolated the yeast species *Candida albicans*, which we also found in hospital rooms. The connection between the species *A. fumigatus* and patients we did not demonstrate.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	X
KAZALO SLIK	XI
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XIII
1 UVOD	1
1.1 NAMEN IN CILJI	1
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 GLIVE V BOLNIŠNIČNIH PROSTORIH TER NJIHOV VPLIV NA ZDRAVJE LJUDI	3
2.1.1 Bolnišnične glivne okužbe	4
2.2 PREDSTAVNIKI POSAMEZNIH RODOV MEDICINSKO POMEMBNIH GLIV	5
2.2.1 Rod <i>Candida</i>	5
2.2.1.1 Taksonomija	5
2.2.1.2 Ekologija	5
2.2.1.3 Patogeneza	5
2.2.1.4 Identifikacija	7
2.2.1.5 Predstavniki različnih vrst	8
2.2.1.5.1 Kvasovka <i>Candida albicans</i>	8
2.2.1.5.2 Kvasovka <i>Candida dubliensis</i>	9
2.2.1.5.3 Kvasovka <i>Candida glabrata</i>	10
2.2.1.5.4 Kvasovka <i>Candida inconspicua</i>	10
2.2.1.5.5 Kvasovka <i>Candida parapsilosis</i>	10
2.2.1.5.6 Kvasovka <i>Candida tropicalis</i>	11
2.2.2 Rod <i>Cryptococcus</i>	11
2.2.2.1 Taksonomija	11
2.2.2.2 Ekologija	11

2.2.2.3	Patogeneza	12
2.2.2.4	Identifikacija	13
2.2.2.5	Predstavniki različnih vrst	13
2.2.2.5.1	Kvasovka <i>Cryptococcus neoformans</i>	13
2.2.3	Rod <i>Exophiala</i>	13
2.2.3.1	Taksonomija	13
2.2.3.2	Ekologija	14
2.2.3.3	Patogeneza	14
2.2.3.4	Identifikacija	14
2.2.3.5	Predstavniki različnih vrst	15
2.2.3.5.1	Kvasovka <i>Exophiala dermatitidis</i>	15
2.2.4	Rod <i>Pichia</i>	16
2.2.4.1	Taksonomija	16
2.2.4.2	Ekologija	16
2.2.4.3	Patogeneza	16
2.2.4.4	Identifikacija	16
2.2.4.5	Predstavniki različnih vrst	16
2.2.4.5.1.	Kvasovka <i>Pichia anomala</i>	17
2.2.4.5.2	Kvasovka <i>Pichia ohmeri</i>	17
2.2.5	Rod <i>Aspergillus</i>	17
2.2.5.1	Taksonomija	17
2.2.5.2	Ekologija	17
2.2.5.3	Patogeneza	18
2.2.5.4	Identifikacija	19
2.2.5.5	Predstavniki različnih vrst	19
2.2.5.5.1	Gliva <i>Aspergillus flavus</i>	19
2.2.5.5.2	Gliva <i>Aspergillus fumigatus</i>	20
2.2.5.5.3	Gliva <i>Aspergillus niger</i>	21
2.2.5.5.4	Gliva <i>Aspergillus versicolor</i>	21

2.2.6	Rod <i>Cladophialophora</i>	21
2.2.6.1	Taksonomija	21
2.2.6.2	Ekologija	22
2.2.6.3	Patogeneza	22
2.2.6.4	Identifikacija	22
2.2.6.5	Predstavniki posameznih vrst	22
2.2.6.5.1	Gliva <i>Cladophialophora bantiana</i>	22
2.2.6.5.2	Gliva <i>Cladophialophora carrionii</i>	23
2.2.7	Rod <i>Cladosporium</i>	23
2.2.7.1	Taksonomija	23
2.2.7.2	Ekologija	24
2.2.7.3	Patogeneza	25
2.2.7.4	Identifikacija	25
2.2.7.5	Predstavniki posameznih vrst	25
2.2.7.5.1	Gliva <i>Cladosporium cladosporoides</i>	25
2.2.7.5.2	Gliva <i>Cladosporium herbarum</i>	26
2.2.7.5.3	Gliva <i>Cladosporium sphaerospermum</i>	26
2.2.8	Rod <i>Penicillium</i>	28
2.2.8.1	Taksonomija	28
2.2.8.2	Ekologija	28
2.2.8.3	Patogeneza	28
2.2.8.4	Identifikacija	28
2.2.8.5	Predstavniki posameznih vrst	29
2.2.8.5.1	Gliva <i>Penicillium chrysogenum</i>	29
2.2.8.5.2	Gliva <i>Penicillium marneffeii</i>	29
3	MATERIAL IN METODE	30
3.1	MATERIALI	30
3.1.1	Gojišča	30
3.1.2	Raztopine	31

3.1.3	Laboratorijska oprema	33
3.2	METODE	34
3.2.1	Vzorčenje	34
3.2.2	Odvzemanje vzorcev	35
3.2.3	Izolacija čistih kultur gliv	35
3.2.3.1	Kvasovke	35
3.2.3.2	Filamentozne glive	35
3.2.4	Fenotipska opredelitev gliv	35
3.2.5	Genotipska opredelitev gliv	36
3.2.5.1	Izolacija genomske DNA	36
3.2.5.1.1	Kvasovke	36
3.2.5.1.2	Filamentozne glive	36
3.2.5.2	Verižna reakcija s polimerazo (»polimerase chain reaction« - PCR)	37
3.2.5.3	Gelska elektroforeza	39
3.2.5.4	Določevanje nukleotidnih zaporedij	39
3.2.6	Shranjevanje sevov	39
4	REZULTATI	41
4.1	IZOLACIJA GLIV S/IZ PREZRAČEVALNIH NAPRAV V PROSTORIH KLINIKE GOLNIK	41
4.2	IZOLACIJA KVASOVK IZ BOLNIŠNIČNIH KOPALNIC	43
4.3	IZOLACIJA GLIV IZ DOMAČIH KOPALNIC	43
4.4	IZOLACIJA GLIV IZ IZMEČKOV BOLNIKOV	44
4.4.1	Kvasovke	44
4.5	IDENTIFIKACIJA PLESNI IN KVASOVK	46
4.5.1	Rod <i>Aureobasidium</i>	46
4.5.2	Rod <i>Candida</i>	47
4.5.3	Rod <i>Exophiala</i>	50
4.5.4	Rod <i>Acrodontium</i>	50
4.5.5	Rod <i>Alternaria</i>	51
4.5.6	Rod <i>Aspergillus</i>	52

4.5.7	Rod <i>Cladosporium</i>	52
4.5.8	Rod <i>Epicoccum</i>	58
4.5.9	Rod <i>Fusarium</i>	58
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	60
5.1	RAZPRAVA	60
5.2	SKLEPI	69
6	POVZETEK	71
7	VIRI	74
	ZAHVALA	
	PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Seznam uporabljenih naprav in njihov proizvajalec v laboratorijih Katedre za molekularno genetiko in biologijo mikroorganizmov na Oddelku za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani	33
Preglednica 2: Seznam uporabljenih naprav in njihov proizvajalec v laboratorijih za Respiratorno mikrobiologijo v bolnišnici za pljučne bolezni in alergijo Golnik	33
Preglednica 3: Priprava PCR mešanice za 1 vzorec za ITS in LSU	38
Preglednica 4: Program za pomnoževanje predela ITS rDNA, LSU rDNA in ACT	38
Preglednica 5: Oligonukleotidni začetniki, ki smo jih uporabili za pomnožitev izbranih predelov genoma za identifikacijo	39
Preglednica 6: Glive, ki smo jih izolirali iz rež klimatskih naprav (K) in zračnikov (Z) v prostorih bolnišnice Golnik. Izolate označene z * smo identificirali na podlagi morfologije in mikroskopskih znakov, ostale pa na podlagi nukleotidnih zaporedij izbrane DNA regije	41
Preglednica 7: Plesni in kvasovke, ki smo jih izolirali iz z vodo povezanih habitatov v bolnišnici Golnik, in identificirali na podlagi nukleotidnih zaporedij izbrane DNA regije oz. na podlagi morfologije (označeni z *)	42
Preglednica 8: Glive, ki smo jih izolirali iz bolnišničnih kopalnic, in identificirali na podlagi nukleotidnih zaporedij izbrane DNA regije oz. na podlagi morfologije (z *)	43
Preglednica 9: Plesni in kvasovke, ki smo jih izolirali iz domačih kopalnic	43
Preglednica 10: Kvasovke, ki smo jih izolirali iz izmečkov bolnikov z različnimi respiratornimi boleznimi. Bolniki so označeni s številkami	44

KAZALO SLIK

Slika 1: Konidiofor rodu <i>Cladosporium</i> z ramokonidiji, sekundarnimi ramokonidiji, vmesnimi konidiji in majhnimi končnimi konidiji (Schubert in sod., 2007)	27
Slika 2: Delež posameznih vrst kvasovk, ki smo jih izolirali iz izmečkov bolnikov	46
Slika 3: Makromorfološki posnetek glive <i>Aureobasidium pullulans</i> (EXF-6934) na gojišču PDA	46
Slika 4: Mikromorfološki posnetki glive <i>Aureobasidium pullulans</i> (EXF-6934) na gojišču PDA	47
Slika 5: Koreninjeno sosedsko-pridružitveno filogenetsko drevo na osnovi poravnanih zaporedij LSU rDNA (D1/D2 domeni) izbranih askomicetnih kvasovk in referenčnih sevov z izračunano evolucijsko oddaljenostjo. Kot korenina je uporabljeno zaporedje črne kvasovke <i>Exophiala dermatitidis</i>	48
Slika 6: Makromorfološki posnetki kvasovk rodu <i>Candida</i> na gojiščih MEA. A-B: <i>C. parapsilosis</i> (EXF-6998); C-D: <i>C. glabrata</i> (EXF-7104); E: <i>C. albicans</i> (EXF-6936)	49
Slika 7: Makromorfološka posnetka kvasovke <i>E. dermatitidis</i> na gojišču MEA. A: <i>E. dermatitidis</i> (EXF-7000); B: <i>E. dermatitidis</i> (EXF-6942)	50
Slika 8: Makromorfološki posnetek glive <i>Acrodontium</i> sp. (EXF-6930) na gojišču OA	50
Slika 9: Mikromorfološki posnetek glive <i>Acrodontium</i> sp. (EXF-6930)	51
Slika 10: Makromorfološka posnetka gliv iz rodu <i>Alternaria</i> na gojišču MEA. Prvo (levo) smo izolirali iz rež klimatske naprave v LKBH, drugo (desno) pa iz rež zračnikov v prosekturi	51
Slika 11: Makromorfološki posnetek glive <i>A. fumigatus</i> na gojišču MEA	52
Slika 12: Koreninjeno sosedsko-pridružitveno filogenetsko drevo nukleotidnih zaporedij ITS rDNA sevov rodu <i>Cladosporium</i> z izračunano evolucijsko oddaljenostjo. Kot korenina je uporabljeno zaporedje vrste <i>C. salinae</i>	54
Slika 13: Koreninjeno sosedsko-pridružitveno filogenetsko drevo na osnovi poravnanih zaporedij dela gena, ki kodira aktin (ACT) sevov rodu <i>Cladosporium</i> z izračunano	

evolucijsko oddaljenostjo. Kot korenina je uporabljeno zaporedje vrste *C. salinae*. S piko označeni sevi so bili izolirani v bolnišnici Golnik 55

Slika 14: Makromorfološki posnetki gliv rodu *Cladosporium* na gojiščih OA: A: *C. pseudocladosporoides* (EXF-6928); B: *C. tenuissimum* (EXF-6931); C: *C. bruhnei* (EXF-6923); D: *C. cladosporoides* (EXF-6929) 56

Slika 15: Mikromorfološki posnetki gliv rodu *Cladosporium*. A-B: *C. bruhnei* (EXF-6923); C-E: *C. cladosporoides* (EXF-6929); F-H: *C. pseudocladosporoides* (EXF-6928) 57

Slika 16: Makromorfološki posnetek glive *Epicoccum nigrum* (EXF-6927) na gojišču PDA. Levo: oblika in barva kolonij; deno: reverz 58

Slika 17: Makromorfološki posnetek glive *Fusarium dimerum* (EXF-6997) na gojišču PDA, ki smo jo izolirali iz odtoka v kopalnici v tleh 58

Slika 18: Mikromorfološki posnetki glive *Fusarium dimerum* (EXF-6997) na gojišču PDA 59

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AIDS	sindrom pridobljene imunske pomankljivosti (ang. acquired immunodeficiency syndrome)
BSL	rizična skupina (ang. Biosafety level)
dNTP	deoksiribonukleotid
KH_2PO_4	kalijev dihidrogen fosfat
K_2HPO_4	kalijev fosfat
MgCl_2	magnezijev klorid
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	magnezijev sulfat
NaCl	natrijev klorid
Na-EDTA	etilendiamintetraocetna kislina
OA	gojišče ovsenih kosmičev
PCR	verižna reakcija s polimerazo (ang. Polymerase Chain Reaction)
PDA	krompirjevo gojišče (ang. Potato Dextrose Agar)
TAE pufer	tris baza/acetat/EDTA
Tris	tris (hidroksimetil)aminometan

1 UVOD

V okviru diplomskega dela smo ugotovljali pojavnost oportuno patogenih gliv v prostorih Univerzitetne klinike za pljučne bolezni in alergijo Golnik. V bolnišnicah, kjer se zdravijo bolniki z boleznimi dihal ter bolniki z zmerno / močno okrnjenim delovanjem imunskega sistema, predstavljajo predvsem plesni z zračnimi spori enega od ključnih dejavnikov tveganja, vendar pa prisotnost le-teh v prostorih bolnišnic rutinsko ne preverjajo. Večina gliv je ubikvitarnih, naselijo se lahko že na neznatnem organskem materialu oz. so oligotrofne. Razmnožujejo se s spori, ki jih sprostijo v zrak ali vodo. Glive tvorijo alergene, toksine, encimske proteine, hlapne organske spojine, ki lahko povzročajo respiratorne bolezni. Inhalirane spore iz zraka se lahko razrastejo v micelij v pljučih in drugih organih. Povzročajo kronične, včasih tudi smrtne okužbe (Rainer in sod., 2001).

V prostorih Univerzitetne klinike Golnik smo vzorčili potencialne habitate gliv, ki so jih predstavljali predvsem vlažni prostori, kot so klimatske naprave ter kopalnice v sobah bolnikov (vodovodne pipe, odtoki umivalnikov in tušev, fuge v kopalnicah, glave tušev, goske). Vzorčili smo tudi pomivalna korita in odtoke v Laboratoriju za respiratorno mikrobiologijo (LRM), v Laboratoriju za citologijo in patologijo (LPC), v Laboratoriju za klinično biokemijo in histologijo (LKBH). Vzorčili smo vodne avtomate razporejene po različnih prostorih bolnišnice (čajne kuhinje, hodniki, glavna avla). Naključno smo na glive testirali tudi vzorce izmečkov bolnikov, ki sicer niso izkazovali znakov glivnih obolenj.

Predvidevali smo, da bomo v določenih, predvsem z visoko vlago povezanih prostorih bolnišnice, našli oportuno patogene glive in tudi, da bomo ugotovili morebitno povezavo z okužbo bolnikov bivajočih v teh prostorih.

1.1 NAMEN IN CILJI

Z diplomsko nalogo smo želeli dobiti vpogled v prisotnost gliv v Kliniki Golnik ter iskati povezavo s izmečki bolnikov. Zanimala nas je predvsem pojavnost oportuno patogene črne kvasovke *Exophiala dermatitidis*, ki je bila nedavno odkrita kot naseljevalka pomivalnih

strojev v domačih okoljih (Zalar in sod., 2011) in lahko predstavlja nevarnost predvsem za imunsko oslabiljene ljudi (de Hoog in sod., 2000). Poleg tega pa je bil namen raziskati tudi pojavnost drugih, tako oportuno patogenih filamentoznih gliv kot tudi kvasovk.

Obenem smo vzorčili izmečke imunsko oslabiljenih bolnikov iz Klinike Golnik, za katere ne vemo ali so bili zdravljeni za glivnimi boleznimi.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

- Predvidevali smo, da se oportuno patogene glive nahajajo na/v rutinsko nekontroliranih nišah v bolnišnici .
- Pričakovali smo, da se bodo v različnih vzorcih bolnišnice pojavljale tako filamentozne, kot tudi dimorfne glive ter kvasovke.
- Pričakovali smo tudi, da obstaja povezava med glivami, ki se nahajajo na različnih mestih v bolnišnici in v izmečkih bolnikov.

2 PREGLED OBJAV

2.1 GLIVE V BOLNIŠNIČNIH PROSTORIH TER NJIHOV VPLIV NA ZDRAVJE LJUDI

Plesni in kvasovke so ubikvitarni mikroorganizmi, ki se razmnožujejo s sporami oz. kvasnimi celicami ter rastejo na substratu v obliki micelija oz. psevdomicelija. Do prenosa glivnih struktur po zraku pride s pomočjo aerosolov, ki jih inhaliramo. Čeprav nas pred glivami v okolju varuje učinkovit obrambni mehanizem, kot je T- specifični imunski odziv, pa lahko kljub temu zbolimo, saj se lahko ob izpostavljenosti glivam razvije hiperaktivacija glivnega alergena. Posledica hiperaktivacije je običajno astma ali alergijski alveolitis (Perdelli in sod., 2006).

Bolniki s prirojeno ali pridobljeno imunsko pomankljivostjo so izpostavljeni velikemu tveganju za številne vrste okužb. Zmanjšana obrambna sposobnost, do katere pride zaradi bolezni, kot so rak, okužbe z virusom HIV, povzroči nenadzorovano razmnoževanje gliv, katere posledica je okužba. Specifična pomakljivost imunskega sistema določa, za katero vrsto okužb je bolnik najbolj dovzeten. Številne študije so pokazale, da največ bolnišničnih okužb povzročajo kvasovka *Candida albicans* ter posamezne vrste rodov *Aspergillus* (Rainer in sod., 2001; Perdelli in sod., 2006). Predvsem predstavniki slednjih rodov so suhoprašni, lahko so okoljskega ali bolnišničnega izvora.

V vseh bolnišnicah obstajajo tveganja za prenos okužb. Študija Perdelli in sodelavcev (2006) je pokazala, da uporaba klimatskih sistemov, tudi tistih opremljenih z visoko učinkovitimi filtri, ne zagotavlja popolne zaščite pred glivnimi okužbami. Ukrepi proti njim bi morali biti predvsem v bolnišnicah na prvem mestu, vendar v praksi ni tako. Pomembno vlogo pri zmanjševanju prenosa okužb ima bolnišnično osebje, in sicer s primerno higieno rok, menjavanjem rokavic po vsakem kontaktu z bolnikom ali stiku s telesnimi tekočinami, rednim menjavanjem zaščitnih oblek in mask. Pomembno je razkuževanje in čiščenje površin, ki so bile v stiku z bolniki in nenazadnje tudi bolnikova higiena (Siegel in sod., 2007). Prav tako je

možna okužba preko predmetov, ki jih vnašamo v telo. Zato morajo biti kirurški inštrumenti, srčni in sečni katetri ter vsadki, sterilni (Rutala in sod., 2008). Posledica zračnih tokov v bolnišničnem okolju je lahko okužba drugega pacienta, čeprav nista bila z okuženim pacientom v isti sobi. Da preprečimo razširjanje oportunističnih patogenov po zraku, je potrebno posebno ravnanje s prezračevalnim sistemom, ki mora odstraniti povzročitelja okužbe. Nekateri povzročitelji okužb lahko izvirajo iz okolja, drugi pa od sobivajočih bolnikov. Spore okoljskih gliv (npr. rodu *Aspergillus*) so prisotne povsod in lahko povzročajo okužbe pri imunsko oslabljenih ljudeh, ko jih le-ti vdihnejo. (Siegel in sod., 2007).

Med imunsko oslabljenimi ljudmi se pojavljajo invazivne aspergiloze, ki so lahko smrtno (Perdelli in sod., 2006). Glivne okužbe so zelo pogoste pri bolnikih po presaditvi organov. Priporočljivo je, naj bi imunsko oslabljeni bolniki ne bi bili izpostavljeni bližini bolnikov s prenosljivimi boleznimi (npr. gripa, boleznimi dihal) (Siegel in sod., 2007).

2.1.1 Bolnišnične glivne okužbe

V zadnjih dvajsetih letih so postale glive pomembni povzročitelji bolnišničnih okužb. Imunsko oslabljeni bolniki so dovzetni za bolnišnične okužbe z glivami, za katere so včasih mislili, da so nepatogene. Glivne bolnišnične okužbe so dokaj pogoste, hitro se širijo. Zdravljenje je dolgotrajno in se lahko konča s smrtjo. Razumevanje epidemiologije glivnih okužb je ključnega pomena za razvoj učinkovitih preventivnih strategij. Bolniki lahko pridobijo bolnišnično okužbo neposredno iz bolnišničnih prostorov, tekom zdravljenja v bolnišnici. Vir spor filamentoznih gliv v bolnišničnih sobah so prezračevalni in klimatski sistemi, prah, okrasne rastline, cvetje, razpadajoči organski material, sveže sadje, voda, gradbena dela v okolici bolnišnice (Kordbacheh in sod., 2005). Spore se širijo po zraku in v zraku ostanejo dalj časa, bolniki pa se okužijo z njihovim vdihavanjem. Zdravstveno osebje ima pomembno vlogo pri prenosu gliv na bolnike. Kvasovke rodu *Candida* so pogosto izolirali iz rok zdravstvenega osebja in tako lahko pride do prenosa z rok zaposlenih na bolnike. Rod *Penicillium* so izolirali z delovnih oblek zaposlenih. Usposabljanje zdravstvenega osebja in izboljševanje njihovega znanja bo pripomoglo k zmanjšanju glivnih okužb (Kordbacheh in sod., 2005).

2.2 PREDSTAVNIKI POSAMEZNIH RODOV MEDICINSKO POMEMBNIH GLIV

2.2.1 Rod *Candida*

2.2.1.1 Taksonomija

Rod *Candida* uvrščamo v deblo *Ascomycota*, poddeblo *Saccharomycotina*, razred *Saccharomycetes*, red *Saccharomycetales*, družino *Saccharomycetaceae* (Kirk in sod., 2008).

2.2.1.2 Ekologija

Vrste rodu *Candida* živijo v in na živalih ali na neživih predmetih. Redko so laboratorijski kontaminanti. So normalni komenzali človeka. Najdemo jih na koži, v izmečku, na sluznici prebavil, v ženskih spolovilih (Pfaller, 1996). Nekaj specializiranih vrst iz rodu *Candida* prebiva kot neškodljivi komenzal v človeškem telesu kot del normalne telesne flore (Naglik in sod., 2011).

2.2.1.3 Patogeneza

Kvasovke iz rodu *Candida* so najpogostejši povzročitelji okužb pri človeku in lahko privedejo do resnih sistemskih infekcij (Calderone, 2002). V rodu *Candida* poznamo več kot 150 vrst. Najpogostejši patogeni človeka so: *C. albicans*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. pseudotropicalis*, *C. dubliniensis*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae* (Pfaller, 1996). Vrsta *C. albicans* je med naštetimi najpogostejši povzročitelj bolezni človeka (Coleman in sod., 1998). Ostale vrste običajno ne povzročajo patoloških sprememb, vendar ob dolgotrajnem jemanju antibiotikov in predoru imunske bariere lahko postanejo patogene. Vrste rodu *Candida* so najpogostejši glivni patogeni, ki povzročajo okužbe pri ljudeh: oralne in vaginalne kandidoze (Naglik in sod., 2011). Ustna *Candida* je največkrat vzrok površinske

glivične okužbe ust. Včasih povzroča pekočo bolečino in težje požiranje (Muzyka and Glick, 1995). Invazija rodu *Candida* v ustni votlini in okužba so najpogosteje povezane z imunosupresijo, poškodbo sluznice in nevtropenijo (Epstein in sod., 1993). Kolonizacija in okužba rodu *Candida* v ustih vpliva na lokalne in sistemske dejavnike. Sistemski dejavniki, ki povečajo prisotnost kvasovk rodu *Candida* v ustni votlini so: diabetes, imunosupresija (npr. HIV), prehranski dejavniki (npr. pomankljivost železa, folne kisline, vitamina B12), jemanje antibiotikov (Epstein, 2003).

Kandidoze

Okužbe ljudi povzročene s kvasovkami rodu *Candida* imenujemo kandidoze. Razdelimo jih lahko v nekaj skupin: površinska kandidoza sluznic in kože, kronična mukokutana kandidoza, kandidoza notranjih organov, sindrom diseminirane kandidoze in kandidemija (Richardson in Warnock, 2003). Poleg površinske kandidoze, kjer so prizadeti koža in nohti, povzročajo kvasovke iz rodu *Candida* tudi sistemsko kandidozo. Pri sistemski kandidozi vdrejo v krvni obtok, iz krvnega obtoka pa se razširijo po celem telesu in povzročajo težko potekajočo bolezen. Umrljivost je 40 % (Ostrosky-Zeichner, 2004). Kandidoze največkrat povzroča kvasovka *C. albicans*, včasih *C. glabrata* in *C. tropicalis*. Živijo kot saprofiti na človeških sluznicah. Invazivne postanejo takrat, ko se zmanjša obrambna sposobnost. Kandidoze so lahko akutne ali kronične. Akutne se pojavljajo največkrat pri novorojenčkih in povzročajo okužbe ustne votline. Kandidoze so lahko kožne ali globoke. Sistemske kandidoze uvrščamo med globoke in jih delimo na:

- fungemija: vdor gliv v krvni obtok, pojavlja se pri imunsko oslabljenih bolnikih, pogosto v povezavi z vstavljenimi katetri;
- sistemska okužba: prizadetost različnih organov;
- diseminirana okužba: pri bolnikih z levkemijo je pogosto smrtna;

Med kožne kandidoze uvrščamo:

- onihomikoze: pojavljajo se na nohtih rok;
- intertrigo: vnetje kože, pordela koža;
- mukokutane kandidoze: afte, vulvo-vaginitis, keratitis, kromoblastomikoze (de Hoog, 2000).

Zdravljenje kandidoz

Povrhne okužbe kože, sluznic in nohtov običajno zdravimo z lokalnim nanašanjem antimikotikov, kot so amfotericin B, nistatin, terbinafin in azoli. Za zdravljenje sistemske kandidoze je izbrano zdravilo amfotericin B, ki se ga včasih kombinira z flucitozinom. Poleg tega zdravila se za zdravljenje kandidoz uporabljajo še kaspofungin, flukonazol, anidulafungin. Za preprečevanje kandidoz se uporabljajo flukonazol, itrakonazol in vorikonazol (Matos, 2002).

2.2.1.4 Identifikacija

Kvasovke lahko identificiramo na več načinov:

FENOTIPSKO DOKAZOVANJE GLIV KVASOVK

Določene vrste iz rodu *Candida* lahko identificiramo neposredno na primarnih diferencialnih gojiščih. V ta namen se uporabljajo kromogena gojišča, s pomočjo katerih lahko na podlagi barve in morfologije kolonij identificiramo vrste *C. albicans*, *C. tropicalis* in *C. krusei*. Kolonije *C. glabrata* so podobne kolonijam številnih drugih vrst iz rodu *Candida*, zato je za identifikacijo potrebno narediti še dodatne biokemične teste. Za večino vrst iz rodu *Candida* se v identifikacijske namene uporabljajo asimilacija ogljikovodikov, fermentacijski testi, dokazovanje encimov in opazovanje morfologije s pomočjo koruznega agarja. V Laboratoriju

za diagnostiko glivičnih infekcij (Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, UL, Ljubljana) uporabljajo za identifikacijo gliv kvasovk dva takšna testa: API Candida in ID 32C (Sodja in sod., 2009). Fenotipske metode so učinkovite za identifikacijo patogenih kvasovk, vendar so dolgotrajne, lahko trajajo od dveh ur do pet dni (Page in sod., 2006).

MOLEKULARNA GENETSKA DIAGNOSTIKA KVASOVK

Sekveniranje specifičnih genov pomnoženih z verižno reakcijo s polimerazo (ang. Polymerase Chain Reaction - PCR) predstavljata hitro in natančno identifikacijo gliv. Najpogostejša tarča molekularnih metod za identifikacijo kvasovk je rDNA (geni, ki nosijo zapis za ribosomne podenote). Podenote rDNA vključujejo visoko ohranjene domene, ki jih ločujejo variabilne regije in so pogosto vrstno specifične. Novost na področju sekveniranja je t.i. pirosekveniranje s katerim lahko identificiramo glive kvasovke že na podlagi kratke sekvence znotraj rDNA in je v primerjavi s klasičnim sekveniranjem hitrejše in preprostejše za uporabo. Metwally in sod. so leta 2007 razvili PCR v realnem času, ki v pozitivnih hemokulturnih stekleničkah loči med vrstami, ki so občutljive na flukonazol (*C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* in *C. dubliniensis*), in vrstami, ki so na flukonazol običajno odporne (*C. glabrata* in *C. krusei*). Perspektivna je metoda in situ fluorescentne hibridizacije s peptidonukleotidnimi sondami PNA FISH (angl.: Peptide nucleic acid fluorescence in situ hybridization), ki omogoča dokazovanje različnih vrst gliv iz rodu *Candida* v pozitivnih hemokulturah (Sodja in sod., 2009). Molekularne metode so uporabne za hitro in natančno identifikacijo medicinsko pomembnih kvasovk (Page in sod., 2006).

2.2.1.5 Predstavniki različnih vrst

2.2.1.5.1 Kvasovka *Candida albicans*

Kvasovka *C. albicans* je najpogostejši človeški glivni patogen (Beck-Sague in Jarvis, 1993).

Običajno je neškodljiv komenzalni organizem. Za imunsko oslABLJENE ljudi predstavlja oportunističnega patogena. Vrsta *C. albicans* je odgovorna za številne boleče sluznične okužbe, kot so vaginitis pri ženskah, pri imunsko oslABLJENIH ljudeh pa lahko povzroča okužbe krvi - kandidemije in okužbe notranjih organov (Kim in Sudbery, 2011).

Pri nedonošenčkih povzroča sistemske kandidoze. Lahko povzroči okužbe pri bolnikih z opeklinami, operacijami trebuha in prsnega koša. Uvrščamo jo v rizično skupino BSL-2 (de Hoog in sod., 2000). BSL-2 mikroorganizmi lahko povzročijo bolezni, vendar za njih ob upoštevanju preventivnih in terapevtskih pravil obstaja majhna verjetnost razširitve v okolico, oz. predstavljajo ti mikroorganizmi nizko do srednjo nevarnost za laboratorijske delavce in nizko stopnjo nevarnosti za skupnost (Wilson in sod., 2009).

Vrsta *C. albicans* je najbolj patogena vrsta med vsemi znotraj rodu *Candida*. Ima veliko virulentnih lastnosti, s katerimi lahko preživi v gostitelju. Celice *C. albicans* zaradi pridobljene in prirojene specifične imunosti težko prodrejo v gostiteljsko celico. Epitelijske celice predstavljajo prvo obrambno črto pred patogeni (Naglik in sod., 2011). Rahle spremembe fiziološkega stanja celice gostiteljice lahko spremenijo normalno neškodljivo komenzalno kvasovko v nevarnega patogena (Naglik in sod., 2011). *C. albicans* lahko raste kot enocelična kvasovka, lahko tvori hife in psevdohife (Kim in Sudbery, 2011), ki predstavljajo invazivno obliko.

2.2.1.5.2 Kvasovka *Candida dubliensis*

Kvasovka *C. dubliensis* je znana po okužah bolnikov, ki imajo AIDS. Uvrščamo jo v rizično skupino BSL-2 (de Hoog in sod., 2000). S pomočjo DNA fingerprintinga so vrsto leta 1995 ločili od *C. albicans*. Izolati so poznani skoraj izključno iz krvi bolnikov, ki imajo AIDS. Med drugimi bolniki pa so znane okužbe genitalnega trakta (d'Enfert in Hube, 2007).

2.2.1.5.3 Kvasovka *Candida glabrata*

Kvasovka *C. glabrata* povzroča okužbe urogenitalnega trakta predvsem pri HIV pozitivnih ljudeh in starejših. Filogenetsko gledano je *C. glabrata* tesneje povezana z nepatogenimi kvasovkami, kot so *S. cerevisiae*, kot z ostalimi vrstami rodu *Candida*, ki povzročajo okužbe pri človeku. Nima številnih virulenčnih dejavnikov znanih iz rodu *Candida*, kot so psevdohifna rast. *C. glabrata* lahko tvori biofilme na urinskih katetrih (Kaur in sod., 2005). Uvrščamo jo v rizično skupino BSL-2 (de Hoog in sod., 2000). Haploidna kvasovka *C. glabrata* je najpogostejša vrsta rodu *Candida*, ki povzroča sluznične in sistemske okužbe (kandidemije); pri slednjih je povzročiteljica kar 15 % vseh okužb z kandidami (Pfaller in Diekema, 2004).

2.2.1.5.4 Kvasovka *Candida inconspicua*

Kvasovka *C. inconspicua* pogosto okuži bolnike, ki imajo AIDS. Fenotipsko je podobna *C. krusei* (Baily in sod., 1997). Uvrščamo jo v BSL-2 (de Hoog in sod., 2000). *C. inconspicua* je manj občutljiva za flukonazol, zato tega ne uporabljajo za zdravljenje okužb z vrsto *C. inconspicua* kot pri ostalih vrstah rodu *Candida* (Majoros, 2005).

2.2.1.5.5 Kvasovka *Candida parapsilosis*

Kvasovka *C. parapsilosis* je tipični komenzal na človeški koži (Clark in sod., 2004). Uvrščamo jo v BSL-1 (de Hoog in sod., 2000). Mikroorganizmi, ki jih uvrščamo v BSL-1 niso nevarni. Dosledno lahko povzročajo bolezni pri imunsko oslabljenih ljudeh. Njihova nevarnost za laboratorijsko osebje in okolje je minimalna (Wilson in sod., 2009). Je zelo razširjena vrsta v naravi, poznana iz različnih virov kot so domače živali, žuželke, tla in morska okolja (Fell in sod., 1967), predstavlja pa tudi pomembnega bolnišničnega patogena. Tvori biofilme na katetrih in drugih vsadkih (Clark in sod., 2004). Povzroča bolezni kot so kandidemija, endokarditis, septični artritis, peritonitis, endoftalmitis. Študije so pokazale, da je manj virulenčna od vrst *C. albicans* in *C. tropicalis* (Weems, 1992). Najbolj ogrožena populacija

pacientov za bolnišnično okužbo s kvasovko *C. parapsilosis* so nedonošenčki. Kolonizacija kože ali prebavnega trakta nedonošenčkov je pogosto prvi korak k patogenezi kandidozne bolezni (Saiman in sod., 2001). Glavni prenašalci kvasovke *C. parapsilosis* so roke zdravstvenega osebja. Kot normalni komezal človeške kože ogroža večje število pacientov, ki so v stiku z zdravstvenim osebjem. Največkrat pride do okužbe, ko zdravstveno osebje ne razkužuje rok. V Ameriki so izvedli poskus, kjer so z rok zdravstvenega osebja izolirali 2989 kultur in od tega jih je bilo kar 19 % *C. parapsilosis* (Saiman in sod., 2001). *C. parapsilosis* je pomemben povzročitelj z glivami povzročenih bolezni po celem svetu, zlasti med nedonošenčki v bolnišničnih prostorih. Bolezni, ki jih povzročajo so: onihomikoze, infekcije urinalnega trakta, vulvovaginitis, otomikoze, keratitis, artritis, peritonitis, glivni meningitis, kandemija (Trofa in sod., 2008).

2.2.1.5.6 Kvasovka *Candida tropicalis*

Kvasovka *C. tropicalis* povzroča bolezni pri bolnikih z oslabljenim prirojenim imunskim sistemom. Uvrščamo jo v rizično skupino BSL-2. Povzroča bolezni pri nedonošenčkih, izolirali pa so jo tudi pri bolnikih po presaditvi kostnega mozga (de Hoog in sod., 2000).

2.2.2 Rod *Cryptococcus*

2.2.2.1 Taksonomija

Rod *Cryptococcus* je polifiletskega izvora. Uvrščamo ga v deblo *Basidiomycota*, razred *Tremellomycetes*, znotraj le-tega pa v 4 rodove: *Tremellales*, *Trichosporonales*, *Filobasidiales* in *Cystofilobasidiales*, družino *Tremellaceae* (Kurtzman in sod., 2011).

2.2.2.2 Ekologija

Kvasovke rodu *Cryptococcus* se nahajajo na površini rastlin, v tleh in vodi. Izmed 37 vrst sta patogeni le dve, in sicer: *C. neoformans* in *C. gattii* (de Hoog in sod., 2000). *C. neoformans* var. *neoformans* so izolirali iz narave, predvsem v povezavi z ptičjimi iztrebki. Kriptokokoze

pri ljudeh povzroča večinoma vrsta *C. neoformans* var. *neoformans*. *C. neoformans* var. *gattii* so pred kratkim izolirali iz narave z drevesa rodu *Eucalyptus*. Okužba z *C. neoformans* var. *gattii* se pojavlja predvsem v tropskih in subtropskih predelih. V ZDA letno ugotovijo okužbo pri 5 % - 10 % bolnikov, ki imajo AIDS (Levitz, 1991).

2.2.2.3 Patogeneza

Kriptokokoze

Kriptokokoze uvrščamo med globoke mikoze. Vrsta *C. neoformans* najpogosteje povzroča pljučnico in meningitis pri imunsko oslabljenih bolnikih. Kriptokoza se najpogosteje pojavi pri osebah okuženih s HIV. Gliva zelo hitro prodre v krvne žile in se razširi po celem telesu. Ločimo več vrst kriptokokoz:

pljučna kriptokokoza: spore pridejo v pljuča z vdihovanjem, nastanejo lezije;

diseminirana kriptokokoza: največkrat okuži imunsko oslABLJENE ljudi, posledica te okužbe je najpogosteje meningitis. Ta bolezen lahko vključi tudi drugi organe. Možen je nastanek lezij na koži;

cerebralna kriptokokoza: pride do okužbe možganov, katero povzroča *C. neoformans* var. *gattii*;

kožna kriptokokoza: nastanejo lezije na koži (de Hoog, 2000).

2.2.2.4 Identifikacija

Rod *Cryptococcus* identificiramo na podlagi analize LSU zaporedja in seroloških metod (Ikeda in sod., 2000).

2.2.2.5 Predstavniki različnih vrst

2.2.2.5.1 Kvasovka *Cryptococcus neoformans*

Kvasovka *C. neoformans* največkrat okuži bolnike z motnjami delovanja T-celic. Pogosto okuži bolnike z Hodgkingovim sindromom. V telo pride z vdihovanjem kvasnih celic. Povzroča meningitis in kasneje meningoencefalitis. Razširjena je po celem svetu. Uvrščamo jo v rizično skupino BSL-2/3. Znotraj vrste ločimo več različic: var. *gattii*, var. *grubii*, var. *innococcus*, var. *neoformans*, var. *uniguttulatus*. Različica *neoformans* je razširjena v Evropi največkrat v votlih drevesih, var. *gatti* pa v centralni Afriki in Avstraliji, Kaliforniji ter južni Evropi (de Hoog in sod., 2000).

2.2.3 Rod *Exophiala*

2.2.3.1 Taksonomija

Rod *Exophiala* uvršamo v deblo *Ascomycota*, poddeblo *Saccharomycotina*, razred *Ascomycetes*, red *Chaetothyriales*, družino *Herpotrichiellaceae* (Kirk in sod., 2008). Rod *Exophiala* obsega 46 vrst, kar je največje število vrst v skupini takoimenovanih črnih kvasovk (de Hoog in sod., 2000).

2.2.3.2 Ekologija

Vrste rodu *Exophiala* so izolirali iz tal, rastlin in vode (Sudhadham in sod., 2008). Izolirali so jih iz oligotrofnih vodnih virov kot so odtoki in bazeni (Porteous in sod., 2003). Kvasovke rodu *Exophiala* rastejo pri zelo visokih temperaturah, prav tako pri kislem in bazičnem pH-ju, pri visokih koncentracijah soli in ob prisotnosti agresivnih čistilnih sredstev. Izolirali so jih iz pitne vode. Sposobne so preživeti v vodnem okolju tudi do 19 let. (Biedunkiewicz in Schulz, 2012). Velikokrat so jih izolirali iz vodovodne vode v bolnišnicah. To predstavlja nevarno tveganje za bolnike, saj se kvasovke lahko prenesejo iz vode na hospitalizirane bolnike (Biedunkiewicz in Schulz, 2012).

2.2.3.3 Patogeneza

So potencialno patogene kvasovke in pri ljudeh povzročajo mikoze. Uvršamo jih v rizično skupino BSL-2. Pri človeku lahko povzročajo benigna obolenja, površinske bolezni ali smrtne bolezni. Povzročajo kožne lezije, ki se najpogosteje pojavljajo na rokah, nogah, zadnjici, vratu in obrazu. Sprva so lezije boleče, kasneje pa se razvijejo v temno obarvane abscese. V telo pridejo s pomočjo spor, ki jih ljudje vdihavajo, ali skozi poškodovano kožo. Mikoze s kvasovkami rodu *Exophiala* so pogostejše med hospitaliziranimi bolniki, saj imajo le-ti oslavljen imunski sistem. Prisotnost teh kvasovk v pitni vodi pogosto izzove alergije in druge mikotske bolezni pri bolnikih (Biedunkiewicz in Schulz, 2012).

2.2.3.4 Identifikacija

Rod *Exophiala* identificiramo na podlagi makroskopskih in mikroskopskih morfoloških značilnosti in s pomočjo molekularnih analiz. Vrste rodu *Exophiala* identificiramo s pomočjo analize ITS zaporedja (Porteous in sod., 2003).

2.2.3.5 Predstavniki različnih vrst

2.2.3.5.1 Kvasovka *Exophiala dermatitidis*

Črna kvasovka *E. dermatitidis* je saprofitska melanizirana dimorfna ubikvitarna gliva, ki povzroča različne vrste mikoze, redko pljučnice. Redko jo najdemo v naravnem okolju. Redko povzroča okužbe pri človeku, ko pa je invazivna, je skoraj vedno usodna (Nachman in sod., 1996). Uvrščamo jo v rizično skupino BSL-2 (de Hoog in sod., 2000). Iz naravnih okolij so *E. dermatitidis* izolirali v tropskih in subtropskih gozdovih, in sicer iz ptic in netopirjev (Sudhadham in sod., 2009). Vrsto najdemo tudi v Evropi, vendar ne v naravi, temveč v s človekom povezanih umetno ustvarjenih habitatih, kot so turške savne (Matos s sod., 2002), kuhinje in kopalnice (Zalar in sod., 2011). Nedavno so v raziskavi, ki je zajemala več kot 100 lokacij po celem svetu, primarno pa v Sloveniji, odkrili, da so kar več kot 50 % z glivami kontaminiranih pomivalnih strojev naseljevali dve vrsti rodu *Exophiala*, *E. dermatitidis*, redkeje *E. phaeomuriformis*. Pomivalni stroji zagotavljajo odlične pogoje za rast teh bolj ekstremofilnih črnih kvasovk, ki so: konstantna vlaga, visok pH zaradi uporabe detergentov, visoke temperature od 60 - 80 °C, prisotnost velike količine organskih snovi. V odsotnosti organskih snovi pa lahko gliva predvidoma metabolizira tudi gumijasta tesnila (Zalar s sod., 2011). Okužbe s kvasovko *E. dermatitidis* se pojavljajo pri bolnikih s cistično fibrozo (Kondori in sod., 2011). Povzroča tudi kronične okužbe možganov, do sedaj je smrt povzročila samo v vzhodni Aziji, in sicer predhodno pri popolnoma zdravih ljudi (Chang in sod., 2000). V drugih predelih sveta povzroča okužbe kože, in sicer pride do le-te po travmatskem vdoru, povzroča pa tudi keratitis in onihomikoze (Matos in sod., 2002).

Znotraj vrste *E. dermatitidis* ločimo 3 genotipe: genotip A, genotip B in genotip C. Razlikujemo jih na podlagi ITS rDNA zaporedja. Genotip B so pretežno izolirali iz okoljskih virov, medtem ko so genotip A izolirali predvsem iz vzorcev. To je lahko posledica razlik v virulenci (Matos in sod., 2003), saj je poznano, da večinoma sevi genotipa A tvorijo kapsule, kar je tudi pomembno za preživetje te vrste pri visokih temperaturah (Matos in sod., 2002).

Kot drug faktor virulence pa je posebna oblika rasti v muriformnih skupkih in pa sama melanizacija (Zalar s sod., 2011).

2.2.4 Rod *Pichia*

2.2.4.1 Taksonomija

Rod *Pichia* uvrščamo v deblo *Ascomycota*, poddeblo *Saccharomycotina*, razred *Saccharomycetes*, red *Saccharomycetales*, družino *Saccharomycetaceae* (Kirk in sod., 2008). Znotraj rodu so poznane tudi teleomorfne oblike (Manfredini in sod., 1995).

2.2.4.2 Ekologija

Kvasovke rodu *Pichia* so ubikvitarne. Izolirali so jih iz tal, sveže vode, izločkov dreves, žuželk, rastlin, sadja, pijače, alkoholnih pijač, zelenjave, mesa, sira, vina (Villa-Carvajal in sod., 2006). Izolirali so jih iz razpadajočega kaktusa (Ganter in sod., 1986).

2.2.4.3 Patogeneza

Redko se pojavljajo kot oportunistični patogeni človeka (Manfredini in sod., 1995). Običajno se okužbe pojavijo pri bolnikih, ki so dalj časa v bolnišnici (Manfredini in sod., 1995). Klinično pomembne vrste znotraj rodu *Pichia* so: *P. ohmeri*, *P. anomala* (Kurtzman in Fell, 1998).

2.2.4.4 Identifikacija

Rod *Pichia* identificiramo s pomočjo sekveniranja ITS zaporedja (5.8S-ITS rDNA) (Villa-Carvajal in sod., 2006).

2.2.4.5 Predstavniki različnih vrst

2.2.4.5.1. Kvasovka *Pichia anomala*

Kvasovko *P. anomala* so izolirali iz tal, rastlin, zrnja, kavčukovca, iz jezer in tekočih voda, toplokrvnih živali, sadja in gob (Kurtzman in Fell, 1998).

Vrsto *P. anomala* so izolirali pri otrocih na pediatričnem oddelku, ki so imeli fungemijo (Chakrabarti in sod., 2001) in pri bolnikih z okužbami na kirurškem intenzivnem oddelku (Kalenic in sod., 2001). Uvrščamo jo v rizično skupino BSL-2 (de Hoog in sod., 2000).

2.2.4.5.2 Kvasovka *Pichia ohmeri*

Vrsto *P. ohmeri* so izolirali pri bolnikih z okužbami sečil (Puerto in sod., 2002), peritonitisom (Choy in sod., 2000) in fungemijo (Bergman in sod., 1998).

2.2.5 Rod *Aspergillus*

2.2.5.1 Taksonomija

Rod *Aspergillus* uvrščamo v deblo *Ascomycota*, razred *Euromycetes*, podrazred *Eurotiomycetidae* red *Eurotiales*, družino *Trichocomaceae* (Kirk in sod., 2008).

2.2.5.2 Ekologija

Rod *Aspergillus* je zelo razširjen v naravi. Naravna niša teh ubikvitarnih gliv so tla, kjer rastejo na razpadajočem organskem materialu, najdemo pa jih tudi v stanovanjih, v gradbenih

elementih, sobnih rastlinah in v vodnih virih (Latgé, 1999; Warris in sod., 2003; Voss in sod., 2002).

2.2.5.3 Patogeneza

Glive iz rodu *Aspergillus* sodijo med pomembne povzročiteljice oportunističnih okužb (Latgé, 1999; Warris in sod., 2003; Voss in sod., 2002). Nekatere vrste rodu *Aspergillus* povzročajo mikoze pri ljudeh, čeprav je njihova ekološka niše drugače. Vrste *A. flavus* in *A. fumigatus* sta najpogostejši povzročiteljici invazivne pljučne aspergiloze. Vrste rodu *Aspergillus* povzročajo toksično, asmatično in alveolarno aspergilozo (Rainer in sod., 2001).

Aspergiloze

Aspergiloze so eksogeno pridobljene okužbe, okužbe lahko nastanejo v bolnišnicah ali domačem okolju. Inkubacijska doba od okužbe do pojava kliničnih znakov ni znana (Alberti in sod., 2001). Aspergiloze lahko potekajo v različnih oblikah, ki jih lahko razdelimo na: alergije, aspergiloze pri imunsko oslabljenih osebah, kronične diseminirane in aspergiloze pri zdravih ljudeh. Med alergije, ki jih povzroča *A. fumigatus*, prištevamo astmo, alergijsko bronhopulmonalno aspergilozo in ekstrinzični alergijski alveolitis. Pri zdravih ljudeh pa lahko vrste rodu *Aspergillus* povzročajo bolezni, kot so: kožna aspergiloza, sinuzitis, otitis externa, invazivna pljučna aspergiloza, aspergilom, plevritis, empiem, okužbe oči. Pri imunsko oslabljenih ljudeh pa povzročajo: hemoragični infarkt, invazivno pljučnico, trahealni bronhitis, kronično nekrotizirajočo bronhopnevmonijo (Ruchel in Reichard, 1999). Zdravi ljudje z normalnim obrambnim sistemom redko zbolijo za aspergilozami, kljub temu, da so stalno izpostavljeni konidijem v zraku, vodi in hrani. Za razliko od teh pa so bolniki, ki prejemajo kortikosteroidno zdravljenje ali tisti, ki se zdravijo s presaditvijo krvotvornih matičnih celic, veliko bolj občutljivi za razvoj okužb (Warris in sod., 2001). Oportunistične okužbe povzroča le okoli 35 vrst znotraj rodu *Aspergillus*, najpogosteje *A. fumigatus*. Sledita vrsti *A. flavus* in *A. niger*, redkeje *A. clavatus*, *A. nidulans*, *A. oryzae*, *A. glaucus*, *A. terreus*, *A. ustus*, *A.*

versicolor (Curtis in sod., 2005). Za glivnimi okužbami pljuč, ki jih povzročajo vrste rodu *Aspergillus* - aspergilozami, pogosto zbolevajo bolniki po presaditvi organov. Smrtnost je v tem primeru lahko zelo visoka, kar 95 - 100 % (Rainer in sod., 2001). Znano je tudi, da se število aspergiloz poveča ob gradbenih procesih v bolnišnicah, takrat je tudi nujno testiranje na prisotnost morebitnih spor v zraku, saj se število konidijev in hifnih fragmentov v zraku takrat poveča. Z vdihavanjem delcev lahko bolniki vdihnejo konidije gliv rodu *Aspergillus*, ki se nato razraščajo in razmnožujejo v pljučih (Rainer in sod., 2001).

2.2.5.4 Identifikacija

Identifikacija rodu *Aspergillus* temelji na makromorfologiji (oblika, velikost in barva kolonij) in mikromorfologiji (oblika konidioforov, konidijev, konidijskih glav in askospor) ali uporabimo sekveniranje predelov genov, ki kodirajo β -tubulin in kalmodulin. Rod *Aspergillus* ne moremo identificirati do vrst na podlagi analiz ITS zaporedja (Silva in sod., 2011).

2.2.5.5 Predstavniki različnih vrst

2.2.5.5.1 Gliva *Aspergillus flavus*

Vrsta lahko povzroča bolezn pri človeku. Je drugi najpogostejši povzročitelj aspergiloz, takoj za vrsto *A. fumigatus*. Napade lahko tudi pljučne in možganske arterije ter povzroči infarkt (Klich, 2007). Glede na patogenost to glivo uvrščamo v rizično skupino BSL-2 razred. Je glavni povzročitelj alergijske bronhopulmonalne aspergiloze in okužb pljuč pri imunsko oslabljenih ljudeh. Povzroča lahko tudi vnetje zunanjšega ušesa (de Hoog in sod., 2000). Je glavna povzročiteljica keratitisa, kožnih aspergiloz, okužb ran, osteomielitisa, infekcij urinarnega trakta (Hedayati in sod., 2005). Vrsta *A. flavus* je pogostejša v bolnišnicah kot *A. fumigatus*. Je tudi 100 x bolj virulenčna od vrste *A. fumigatus*. Gliva *A. flavus* je razširjena po celem svetu, zaradi številnih konidijev, ki se zlahka absorbirajo v zračni pretok in posledično v

žuželke, pljuča sesalcev (Gibson in sod., 1994). Naravna ekološka niša te vrste je v tleh, na arašidih (Klich, 2007). Optimalna temperatura za rast glive *A. flavus* je 37 °C. Večino življenja preživi kot saprofit v tleh in ima pomembno vlogo pri kroženju hranil skupaj z rastlinami in živalimi (Scheidegger in Payne, 2003). Proizvaja aflatoksine, ki so sekundarni metaboliti v semenih arašidov, koruze in drevesnih oreščkov (Klich, 2007).

2.2.5.5.2 Gliva *Aspergillus fumigatus*

Vrsto *A. fumigatus* uvrščamo med oportunistične patogene, saprofite in lahko okuži samo imunsko oslABLJENE gostitelje (Zhao, 2006). Vrsta *A. fumigatus* je ubikvitarna gliva. Ima zelo pomembno vlogo pri kroženju ogljika in dušika. Glede na patogenost jo v rizično skupino uvrščamo v BSL-2 (de Hoog in sod., 2000). Konidiji vrste *A. fumigatus* začnejo kaliti, ko imajo dovolj hranil, vode in ustrezen medij. Kalijo pri višjih temperaturah 37 °C - 42 °C (Zhao, 2006). Gliva *A. fumigatus* sprošča številne konidije, ki so odporni in v okolju preživijo več mesecev. Z zračnimi tokovi se konidiji širijo po zraku. Vdihane konidije fagocitirajo alveolarni makrofagi, pri imunsko oslABLJENIH osebah pa pride do invazivne rasti hif v tkivo. Prisotnost gliv v bolnišničnem okolju igra zelo pomembno vlogo. Glive so prisotne lahko v pitni vodi, vodovodnih sistemih (Warris in sod., 2001). Pogosto povzroča alergije, najpogosteje alergijsko bronhopulmonalno aspergilozo (Perdelli in sod., 2006). Je vodilni patogen med imunsko oslABLJENIMI ljudmi, predvsem med tistimi, ki so imeli transplantacijo kostnega mozga in drugih organov (de Hoog in sod., 2000). Gliva v svojih konidijih akumulira ergot alkaloida, ki lahko negativno vplivajo na kardiovaskularni, živčni, reproduktivni in imunski sistem (Panaccione in Coyle, 2005). Gliva *A. fumigatus* izloča različne toksične molekule. Fumigaklavin C inhibira sintezo DNA in vpliva na limfocite T s preprečevanjem aktivacije, proliferacije in pritrjanja na izvencelični matriks ter z redukcijo produkcije TNF α . Aurasperon C oslabi delovanje živčnega sistema. Fumigacin vpliva na oksidativni izbruh makrofagov, na metabolizem oksidiranih lipoproteinov ter povzroča popolni zastoj migetalčnega epitelijskega tkiva in prekinitvev med epitelijskimi celicami (Latgé, 1999).

2.2.5.5.3 Gliva *Aspergillus niger*

Gliva *A. niger* največkrat okuži bolnike po težkih operacijah, presaditvi kostnega mozga. Uvrščamo jo v rizično skupino BSL-1. Izolirali so ga iz zunanjšega ušesa pri človeku. Redko povzroča pljučne aspergiloze (de Hoog in sod., 2000).

2.2.5.5.4 Gliva *Aspergillus versicolor*

Gliva *A. versicolor* predstavlja nevarnost, ker spada v skupino gliv, ki se nahajajo v vlažnih in zaprtih prostorih (Engelhart in sod., 2002). Uvrščamo jo v BSL-1 (de Hoog in sod., 2000).

Je največji proizvajalec hepatotoksina in rakotvornega mikotoksina sterigmatocistina. Sterigmatocistin je tesno povezan z aflatoksini in je obenem tudi prekurzor za biosintezo aflatoksina. Vendar sta akutna in toksična strupenost sterigmatocistina nižji od strupenosti aflatoksina. Ni podatkov, da bi bil sterigmatocistin škodljiv za človeka. Škoduje mišim in podganam (Engelhart in sod., 2002). Vrsta *A. versicolor* se pogosto nahaja tam, kjer potekajo gadbena dela (Engelhart in sod., 2002). V najnovejši raziskavi so odkrili, da je vodilni alergen rodu *A. versicolor* Asp v 13. Ta alergen je beljakovina sestavljena iz 403 amino kislin z večimi antigenskimi in alergenimi epitopi na površini (Shi in Miller, 2011). Gliva *A.versicolor* povzroča veliko poškodb na nohtih. Pogosto ga skupaj z drugimi vrstami rodu *Aspergillus*, kot so *A. fumigatus* in *A. flavus* najdemo v skladiščenih žitih, bombažu, sirih, mesu in drugih živilih, ki so v stanju razgradnje ter v tleh (Torres- Rodrigez in sod., 1998).

2.2.6 Rod *Cladophialophora*

2.2.6.1 Taksonomija

Rod *Cladophialophora* uvrščamo v deblo *Ascomycota*, razred *Eurotiomycetes*, red *Chaetothyriales*, družino *Herpotrichiellaceae* (Kirk in sod., 2008).

2.2.6.2 Ekologija

Vrste rodu *Cladophialophora* so ubikvitarne. Izolirali so jih iz vode, zraka, tal (de Hoog in sod., 2000). Razlika med rodом *Cladophialophora* in rodом *Cladosporium* je v tem, da ima rod *Cladophialophora* drugačne konidiofore in nepigmentirane brazgotine. Vrste rodu *Cladosporium* redko povzročajo bolezni pri človeku, medtem ko vrste rodu *Cladophialophora* povzročajo mikoze pri človeku (de Hoog in sod., 2000).

2.2.6.3 Patogeneza

Povzročajo kromoblastomikoze in micetome (Dixon in Polak-Wyss, 1991). Medicinsko najpomembnejši vrsti sta: *C. bantiana* in *C. carrionni* (de Hoog in sod., 2000).

2.2.6.4 Identifikacija

Glive rodu *Cladophialophora* identificiramo s pomočjo analiz ITS rDNA zaporedja (Abliz in sod., 2004).

2.2.6.5 Predstavniki posameznih vrst

2.2.6.5.1 Gliva *Cladophialophora bantiana*

Vrsta *C. bantiana* je nevrotropična saj povzroča možganske mikoze pri človeku. Razširjena je po celem svetu. Uvrščamo jo v rizično skupino BSL-3. Rokovanje z BSL-3 kategoriziranimi mikrobi je lahko zelo nevarno, saj mikrobi lahko povzročijo hude, tudi življenje ogrožujoče bolezni, ki jih sicer zaradi obstoja zdravil za zdravljenje tovrstnih bolezni lahko pozdravimo. Ti mikrobi predstavljajo srednjo do visoko stopnjo nevarnosti za laboratorijske delavce in nizko do srednjo stopnjo nevarnosti za skupnost (Wilson in sod., 2009).

Gliva pride v telo z vdihovanjem. Največkrat se okužijo imunsko oslabljeni bolniki, uživalci drog ter bolniki po presaditvi organov (de Hoog in sod., 2000).

2.2.6.5.2 Gliva *Cladophialophora carrionii*

O okužbah z vrsto *C. carrionii* poročajo iz sušnih tropskih predelov južne Amerike, južne Afrike in Avstralije. Uvrščamo jo v rizično skupino BSL-2. Vrsta *C. carrionii* skupaj z vrsto *Phialophora verrucosa* in dvema vrstama rodu *Fonsecaea* povzroča kromoblastomikoze. Simptomi te bolezni so: lezije na koži, kasneje se pojavijo tumorji na koži v obliki cvetače. Gliva pride v telo preko poškodovane kože. (de Hoog in sod., 2000). Je najpogostejša povzročiteljica kromoblastomikoz in kroničnih mikoz kože in podkožnih tkiv. Izolirali so jo iz suhih območij južne Amerike, Afrike in Avstralije (Abliz in sod., 2004).

2.2.7 Rod *Cladosporium*

2.2.7.1 Taksonomija

Rod *Cladosporium* uvrščamo v deblo *Ascomycota*, razred *Dothideomycetes*, podrazred *Dothideomycetidae*, red *Capnodiales*, družino *Davidiellaceae*. Teleomorfna oblika je uvrščena v rod *Davidiella* (Crous in sod., 2009).

Leta 1981 je Roquebert dokazal, da so izbokline na konidijih in konidiogeni predeli karakteristične in unikatne strukture rodu *Cladosporium*. David (1997) je z izvedbo obširnih raziskav z vrstično elektronsko mikroskopijo SEM (Scanning Electron Micrograph), s katero je raziskoval brazgotinaste strukture, prvič podal natančnejši vpogled v rod *Cladosporium*. Na osnovi brazgotin, ki jih je našel na mnogih sevih rodu *Heterosporium*, je sklepal, da je ta rod sinonim rodu *Cladosporium*. David (1997) je tudi prvi vpeljal izraz kronasta brazgotina, ki opisuje značilno izbočen predel, obdan z dvignjenim robom. Odkril je, da je anamorf rodu

Cladosporium, povezan s teleomorfom, ki pripada rodu *Mycosphaerella*. Kasnejša filogenetska študija je to potrdila, saj prikazuje rod *Cladoporium* kot sestrski rod rodu *Mycosphaerella* s. str., imenovan *Davidiella*. Aptroot pa je leta 2006 odkril razliko med rodom *Davidiella* in rodom *Mycosphaerella*, in sicer je pri rodu *Davidiella* v askosporah odkril prisotnost nepravilnih celičnih vključkov (lumina), ki jih v rodu *Mycosphaerella* ni. Kasnejše filogenetske raziskave so potrdile, da rod *Davidiella* uvrščamo v družino *Davidiellaceae*, rod *Mycosphaerella* pa uvrščamo v družino *Mycosphaerellaceae*. Ti obe družini pa uvrščamo v red *Capnodiales* in podrazred *Dothideomycetes* (Crous in sod., 2009). Primarni ramokonidij je opredeljen kot kratek apikalni del konidiofora, ki se odcepi in deluje kot konidij. Imajo eno, dve ali tudi tri izbokline (hilumi), ki se nakopičijo na koncu konidijev. Iz primarnih ramokonidijev izraščajo sekundarni ramokonidiji (Schubert in sod., 2007). Sekundarni ramokonidiji imajo vedno več kot eno izboklino. Imajo zoženo bazo, lahko so septirani. So krajši in širši od primarnih konidijev. Lahko se pojavljajo v verigah (Schubert in sod., 2007). Konidiji imajo lahko eno končno brazgotino, ki je del verižice (vmesni konidiji), ali pa so brez nje in se nahajajo na koncu verige (majhni končni konidiji). Vmesni konidiji so večji in bolj pigmentirani od majhnih končnih konidijev in imajo strukturirano površino (Schubert in sod., 2007).

2.2.7.2 Ekologija

Rod *Cladosporium* vključuje saprofitne, fitopatogene, endofitske glive in nenazadnje tudi človeške patogene. Vrste tega rodu vsakodnevno vplivajo na človeška življenja na različne načine. Izolirali so jih iz tal, zraka, hrane, barve, tekstila in drugih organskih materialov (Brown in sod., 1998). Saprofitne vrste rodu *Cladosporium* se pojavljajo na mrtvih listih, na steblih zelnatih in lesnatih rastlin in kot sekundarni vdiralci na nekrotskih tkivih različnih delov rastlin (Bensch in sod., 2010).

2.2.7.3 Patogeneza

Nekatere vrste so pomembne v medicini, npr. *C. herbarum*, ki je eden najpogostejših zračnih kontaminantov v kliničnih laboratorijih in lahko povzroča pljučne mikoze (Crous in sod., 2009).

Medicinsko najpomembnejše patogene glive rodu *Cladosporium* so: *C. cladosporoides*, *C. herbarum* in *C. sphaerospermum*.

2.2.7.4 Identifikacija

Za identifikacijo rodu *Cladosporium* so leta 2007 Schubert in sodelavci postavili nove standarde. Za razlikovanje med vrstami znotraj rodu so poleg regije ITS ribosomske podenote DNA, uporabili tudi druge predele genoma kot so: predele, ki kodirajo aktin (ACT), translacijski elongacijski faktor 1- α (EF), kalmodulin in histon H3 (Schubert in sod., 2007). Je eden največjih in najbolj heterogenih rodov gliv in vsebuje 772 imen (David, 1997).

2.2.7.5 Predstavniki posameznih vrst

2.2.7.5.1 Gliva *Cladosporium cladosporoides*

Vrsta *C. cladosporoides* je zelo pogosta in kozmopolitska. Pojavlja se kot sekundarni vdirelec nekrotskih tkiv različnih delov rastlin. Izolirali so jo iz tal, zraka, tekstila in drugih substratov. V preteklosti so poročali, da je bila gliva *C. cladosporoides* odgovorna za številne pljučne in kožne okužbe pri ljudeh (Bensch in sod., 2010).

Vrsto uvrščamo v rizično skupino BSL-1. Vrsta *C. cladosporoides* je zelo pogosta v zraku, povzroča okužbe pljuč, keratitis. Izolirali so jo z zob in subkutanih cist (de Hoog in sod., 2000). Najpomembnejši fenotipski znaki za ločevanje *C. cladosporoides* od drugih vrst rodu *Cladosporium* so: zelo dolgi konidiofori ter specifična oblika, širina, septiranost, površina konidijev in konidioforov (Bensch in sod., 2010).

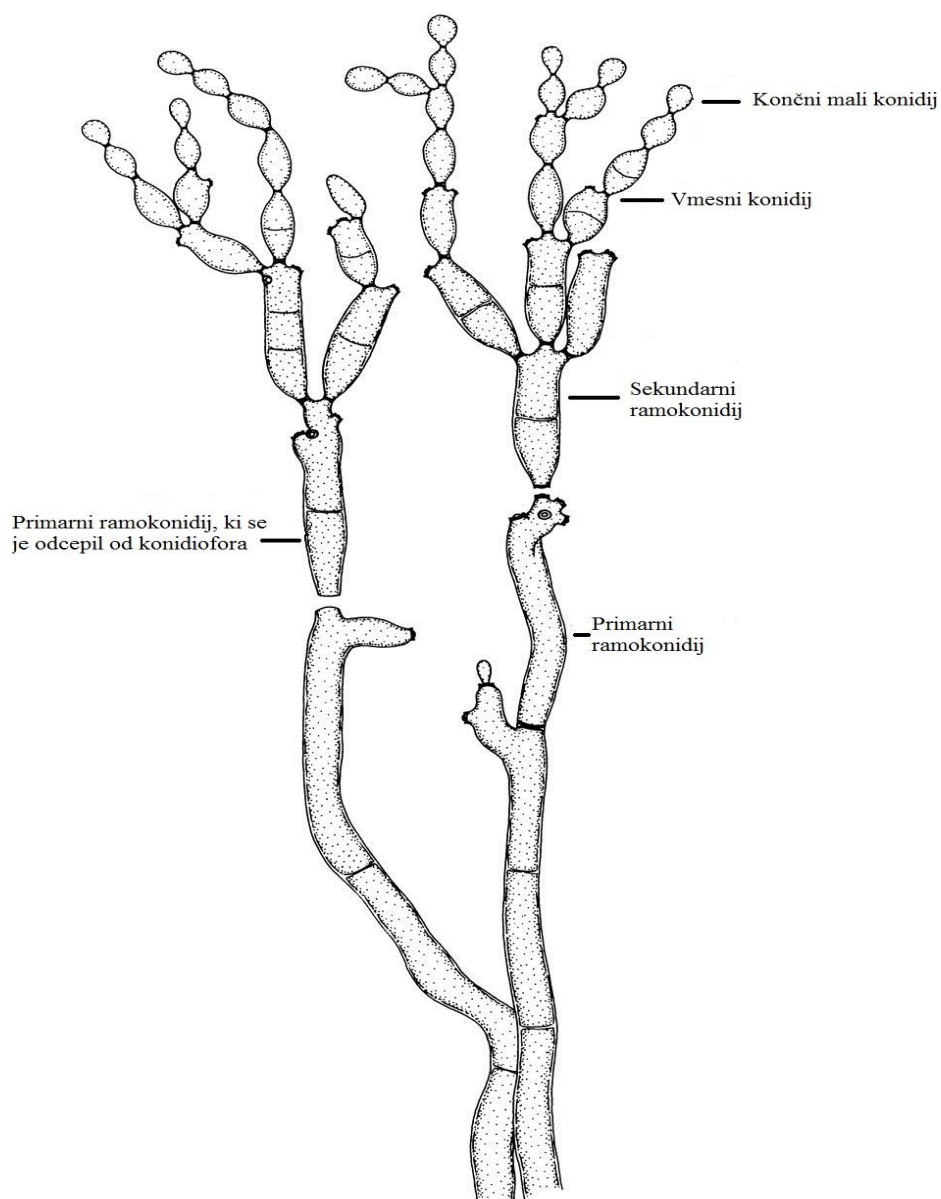
2.2.7.5.2 Gliva *Cladosporium herbarum*

Je pogosta gliva, ki okužuje rastline, redko ljudi. Izolirali so jo iz kožnih lezij. Povzročala naj bi keratitis in alergijske pljučne mikoze. Vrsto uvrščamo v rizično skupino BSL-1 (de Hoog in sod., 2000).

2.2.7.5.3 Gliva *Cladosporium sphaerospermum*

Vrsta *C. sphaerospermum* je ena izmed najpogostejših zračnih plesni znotraj rodu *Cladosporium*. Našli so jo tako znotraj bivalnih prostorov kot tudi zunaj in na rastlinskem materialu (Hamayun in sod., 2009). Vrsto uvrščamo v rizično skupino BSL-1. Izolirali so jo iz roženice, kožnih lezij in nohtov (de Hoog in sod., 2000).

Prvič jo je opisal Penzig leta 1882. Izoliral jo je iz razpadajočih citrusovih listov v Italiji. Gliva *C. sphaerospermum* je halotolerantna ali ozmotolerantna vrsta, ki naseljuje tudi okolja z znižano vodno aktivnostjo, kot so soline (Zalar s sod., 2007). Nobenih dokazov ni, da bi *C. sphaerospermum* bil človeški patogen (Zalar in sod., 2007). V primerjavi z drugimi vrstami v rodu je vrsta *C. sphaerospermum* sposobna rasti pri zelo nizki vodni aktivnosti (Hocking in sod., 1994).



Slika 1: Konidiofor rodu *Cladosporium* z ramokonidiji, sekundarnim ramokonidiji, vmesnimi konidiji in majhnimi končnimi konidiji (Schubert in sod., 2007)

2.2.8 Rod *Penicillium*

2.2.8.1 Taksonomija

Rod *Penicillium* uvrščamo v deblo *Ascomycota*, razred *Eurotiomycetes*, red *Eurotiales* družino *Trichocomaceae* (Kirk in sod., 2008).

2.2.8.2 Ekologija

Rod *Penicillium* obsega veliko število vrst in je ubkvitaren. Večina gliv rodu *Penicillium* je mezofilnih (de Hoog in sod., 2000). Vrste tega rodu so saprofiti, s pomembno ekološko vlogo razkrajanja odmrlega materiala. Izolirali so jih iz citrusov, grozdja, ličija, breskev, jabolk in hrušk (Leigh Johnston C., 2008).

2.2.8.3 Patogeneza

Najpomembnejši vrsti, ki povzročata bolezni pri človeku sta: *Penicillium chrysogenum* in *Penicillium marneffei* (de Hoog in sod., 2000).

2.2.8.4 Identifikacija

Rod *Pencillium* identificiramo s pomočjo sekveniranja predela gena, ki kodira β -tubulin in ITS rDNA regijo (Leigh Johnston C., 2008).

2.2.8.5 Predstavniki posameznih vrst

2.2.8.5.1 Gliva *Penicillium chrysogenum*

Povzročča bolezni pri človeku: keratitis, endokarditis, sistemske infekcije. Vse te bolezni povzročča pri imunsko oslabljenih ljudeh. Vrsto uvrščamo v rizično skupino BSL-2 (de Hoog in sod., 2000).

2.2.8.5.2 Gliva *Penicillium marneffe*

Največkrat okuži ljudi, ki imajo AIDS, redko okuži zdrave ljudi. Ljudje se okužijo z vdihovanjem konidijev. V pljučih se konidiji razrastejo, povzročijo intracelularno mikozo. Začnejo proizvajati majhne konidije znotraj makrofagov. Mikoze, ki jih povzroči gliva *Penicillium marneffe* so večino smrtne (de Hoog in sod., 2000). Simptomi, ki kažejo na okužbo z glivo *Penicillium marneffe* so: vročina, anemičnost, izguba telesne teže, rane na koži (Supparatipinyo in sod., 1994). Razširjena je na Tajskem, v Indiji, Gani. Vrsto uvrščamo v rizično skupino BSL-3 (de Hoog in sod., 2000).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 MATERIALI

GOJIŠČA, RAZTOPINE, ZMESI IN REAGENTI

3.1.1 Gojišča

MEA (trdno gojišče s sladnim ekstraktom) (Samson in sod., 2004) (po Blakeslee-ju)

sladni ekstrakt	20 g
pepton	1,0 g
glukoza	20 g
agar	20 g
destilirana voda	do 1000 ml
pH	5,0-5,5

V primeru uporabe tega gojišča za izolacijo smo gojišču pred avtoklaviranjem dodali antibiotik kloramfenikol (Cm), in sicer 0,05 g/L.

Tekoče gojišče za izolacijo DNA (Raper in sod., 1972)

glukoza	10 g
pepton	2,0 g
kvasni ekstrakt	2,0 g
MgSO ₄ x7H ₂ O	0,5 g

KH_2PO_4 0,46 g

K_2HPO_4 1,0 g

PDA gojišče (trdno gojišče s krompirjevim ekstraktom in glukozo)

OA gojišče (ekstrakt ovsenih kosmičev)

3.1.2 Raztopine

CTAB pufer

Tris 2,42 g

NaCl 8,2 g

Na-EDTA 0,74 g

Bidestilirana voda do 100 ml

pH 7,5; uravnavamo z 1M HCl

TE pufer:

Tris 0,12 g

Na-EDTA 0,04 g

Bidestilirana voda do 100 ml

pH 8,0; uravnavamo z 1M HCl

Pufer 1x TAE:

Tris baza 242,0 g

Ocetna kislina 57,1 g

0,5 M EDTA (pH) 100 ml

Destilirana voda do 1000 ml

50X TBE pufer smo 50x redčili z destilirano vodo in dobili 1x TAE pufer.

5X nanšalni pufer:

Bromtimol modro 0,25 g

Ksilen cianol 0,25 g

Glicerol 30 g

Destilirana voda do 100 ml

Mešanica silikagela in celita:

Silikagel 30 g

Celit 15 g

Nanašalni gel:

Agarozna 0,3 g

1x TAE pufer 30 ml

SSS (Raztopina za pripravo suspenzije spor) (CBS katalog, 2001):

Tween 80 0,5 g

Agar 0,5 g

Fiziološka raztopina NaCl:

NaCl 9 g

Destilirana voda do 1000 ml

3.1.3 Laboratorijska oprema

Laboratorijska oprema, uporabljena v raziskavi, je podana v preglednicah 1 in 2.

Preglednica 1: Seznam uporabljenih naprav in njihov proizvajalec v laboratorijih Katedre za molekularno genetiko in biologijo mikroorganizmov na Oddelku za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani

NAPRAVA	PROIZVAJALEC
Avtoklav A-63C	Kambič, Slovenija
Bunsenov gorilnik	TLOS, Zagreb, Hrvaška
Centrifuga	Eppendorf, Hamburg, Nemčija
Digestorij Variolab Molibien W90	Waldner, Wangen, Nemčija
Digitalna kamera DP12	Olympus, Tokyo, Japonska
Električni transformator za elektroforezo	
Consort E143	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, ZDA
Elektroforezna banjica E33	Hofer, San Francisco, CA, ZDA
Laminarij IBK 1 V2	Iskra, Šentjernej, Slovenija
Magnetno mešalo Rotamix 550MMH	Tehtnica, Železniki, Slovenija
Mikroskop Olympus BX51	Olympus, Tokyo, Japonska
Mikrovalovna pečica	Gorenje, Velenje, Slovenija
PCR sistem	Eppendorf, Hamburg, Nemčija
pH meter Metrom 713	Tehtnica, Železniki, Slovenija
Stereomikroskop Steri SV11 z virom svetlobe	
KL1500 LCD	Zeiss, Oberkochen, Nemčija
Tehtnica Et-1111	Tehtnica, Železniki, Slovenija
Transluminator	SYNGENE; a division of synoptics Limited
Vodna kopel	Pharmacia Biotech, Uppsala, Švedska
Vrtinčasto mešalo (vortex)	Tehtnica, Železniki, Slovenija

Preglednica 2: Seznam uporabljenih naprav in njihov proizvajalec v laboratorijih za Respiratorno mikrobiologijo v bolnišnici za pljučne bolezni in alergijo Golnik

NAPRAVA	PROIZVAJALEC
Hladilna omara HO - 1200 GB SV-A	LTH, Škofja Loka, Slovenija
Inkubator tip I - 190 sušilnik s	Kambič, Ljubljana, Slovenija
Inkubator tip I - 590 VPC	Kambič, Ljubljana, Slovenija
Mikroskop Nikon Eclipse E.600	Nikon, Japonska
Neavtomatska tehtnica WPX 1500	Lotrič, Slovenija
Zaščitna komora SMBC 183 AV	Iskra Pio d.o.o. , Šentjernej Slovenija
Gorilnik (Schuett Phoenix II)	Schuett - Biotech GmbH, Nemčija
Vibromix glive 114 EV	Tehtnica Železniki, Slovenija

3.2 METODE

3.2.1 Vzorčenje

Vzorčenje smo izvedli v času od 18. 10. 2010 do 26. 09. 2011.

V Kliniki Golniki smo od 18. 10. 2010 do 02. 12. 2010 vzorčili naslednje prostore in znotraj le-teh navedene mikro niše:

1. Laboratorij za respiratorno mikrobiologijo (LRM): reže klimatskih naprav v različnih prostorih, reže zračnikov, vodovodno pipo, odtok in steno pomivalnega korita, notranjost pomivalnega stroja za medicinske pripomočke.
2. Laboratorij za citologijo in patologijo (LPC): reže zračnika in reže klimatske naprave, odtoke korit.
3. Laboratorij za klinično biokemijo in hematologijo (LKBH): reže zračnikov, reže klimatskih naprav, odtok korita.
4. Čajna kuhinja: reže zračnika.
5. Urinarij (prostor za shranjevanje urinskih steklenic, vrčev za zbiranje urina, pripomočkov za zbiranje urina): reže spodnjega zračnika.
6. Hodniki: reže zračnika in reže klimatske naprave.
7. Glavna avla: reže klimatske naprave, reže vodnega avtomata, reže kavnega avtomata.
8. Bolniške sobe: reže klimatskih naprav, reže zračnika, notranjost pomivalnega korita, reže kavnega avtomata, reže vodnega avtomata, goske (posode, v katere bolniki urinirajo), izlivnike.
9. Prosektura (prostor za obdukcije): reže zračnikov.
10. Bolniške sobe: odtoki tušev, odtoki umivalnikov, reže zračnikov, reže klimatskih naprav, glave tušev, fuge v kopalnicah.

Od 19. 09. 2011 do 26. 09. 2011 smo odvzeli izmečke bolnikov v Kliniki Golnik. Bolniki so bili naključno izbrani. Zdravljeni so bili zaradi bolezni dihal.

Od 21. 07. 2011 do 26. 07. 2011 smo vzorčili domače kopalnice. Vzorčili smo odtoke umivalnikov kopalnic, odtoke v kadah in tuš kabinah, odtoke v tleh kopalnic, fuge.

3.2.2 Odvzemanje vzorcev

Brise v zgoraj navedenih prostorih Klinike Golnik smo odvzeli s pomočjo sterilnih vatenk, ki smo jih predhodno omočili v fiziološki raztopini. Odvzete brise smo nanесли na agarne plošče MEA + Cm. Plošče na katere smo nanесли vzorce iz klimatskih naprav in zračnikov smo inkubirali pri 24 °C, 30 °C in 37 °C. Plošče na katere smo nanесли vzorce iz z vodo povezanih habitatov, iz bolnišničnih in domačih kopalnic in vzorce izmečkov bolnikov smo inkubirali pri 37 °C. Opazovali smo jih 14 dni ter iz njih izolirali glive.

3.2.3 Izolacija čistih kultur gliv

3.2.3.1 Kvasovke

Na gojišču z mešano kulturo smo izbrali kolonijo, ki smo jo nacepili do posameznih kolonij na sveže MEA gojišče.

3.2.3.2 Filamentozne glive

Na gojišču z mešano kulturo smo izbrali kolonijo, ki smo jo z metodo agarne iglice prenesli na sveže gojišče v liniji.

3.2.4 Fenotipska opredelitev gliv

a) makromorfologija

Za opazovanje kolonij rodov *Cladosporium* smo pripravili suspenzijo spor z raztopino SSS. SSS raztopino uporabljamo za suspendiranje spor. Ostale glive in kvasovke smo določili na podlagi barve in oblike micelija ter razmnoževalnih struktur.

b) mikromorfologija

Znaki, ki smo jih opazovali pod mikroskopom so bili barva, oblika, velikost spor in hif ter druge mikroskopske strukture. Za opazovanje kvasovk smo pripravili poltrajne mikroskopske preparate v 60 % mlečni kislini ali v fiziološki raztopini. Opazovali smo pod 1000 x povečavo. Preparate smo fotografirali z digitalno kamero Olympus DP12.

3.2.5 Genotipska opredelitev gliv

3.2.5.1 Izolacija genomske DNA

3.2.5.1.1 Kvasovke

Kvasovke smo inokulirali na MEA gojišče in jih inkubirali pri sobni temperature od 3 - 8 dni. Izolacija DNA: v sterilno mikrocentrifugirko (2 ml) smo odpipetirali 40 μ l kita DNA Prepman Ultra. S sterilno cepilno zanko smo prenesli eno ali več kolonij kvasnih celic v mikrocentrifugirko. Mikrocentrifugirko smo skupaj s pripravljenimi vzorci inkubirali v vodni kopeli 10 minut pri 100 °C. Vzorce smo centrifugirali 3 minute pri 14000 obratih na minuto. Odpipetirali smo 35 μ l supernatanta v 1,5 ml mikrocentrifugirko. Izolirano genomsko DNA kvasnih celic smo shranili pri -20 °C.

3.2.5.1.2 Filamentozne glive

V 10 ml epruveh smo v 5 ml tekočega gojišča za izolacijo DNA vzgojili glivni micelij po inkubaciji pri 25 °C 5 - 10 dni. Izolacija DNA z mehansko lizo s CTAB pufrom: V sterilne mikrocentrifugirke (2 ml) smo dodali s 0,4 M HCl očiščeno in sterilizirano kovinsko kroglico in silikagelno mešanico (celit in silikagel v razmerju 1 : 2). Mikrocentrifugirke smo znova

sterilizirali. V sterilno mikrocentrifugirko smo dodali 300 µl CTAB pufru. S sterilno spatulo smo prenesli zrased glivni micelij v pufer. Celice smo strli s pomočjo homogenizatorja 1 minuto s frekvenco 30 tresljajev na sekundo. Odpipetirali smo še dodatnih 200 µl CTAB pufru in dodali v mikrocentrifugirko. Homogenat smo inkubirali v vodni kopeli pri 65 °C 30 - 120 minut. V digestoriju smo v mikrocentrifugirko dodali 500 µl kloroforma (pride do precipitacije proteinov in celičnih ostankov). Zmes smo premešali na vibracijskem mešalniku 1 - 2 sekundi in jo centrifugirali 5 minut pri 14000 obratih na minuto. V drugo sterilno mikrocentrifugirko (1,5 ml) smo odpipetirali supernatant in dodali dvakratni volumen ledenega 96 % etanola. Mikrocentrifugirko smo pazljivo premešali in inkubirali pri -20 °C čez noč (precipitacija DNA). Naslednji dan smo vzorec centrifugirali 5 minut pri 14000 obratih na minuto. Pazljivo smo odstranili supernatant. Pelet smo sprali s 500 µl 70 % ledenega etanola. Centrifugirali smo 5 minut pri 14000 obratih na minuto in pazljivo odpipetirali etanol. Pelet smo posušili na zraku do suhega. Po sušenju smo pelet resuspendirali v 49 µl TE pufru in dodali 1 µl RNA-ze in inkubirali 5 - 30 minut v vodni kopeli pri temperaturi 37 °C.

3.2.5.2 Verižna reakcija s polimerazo («polimerase chain reaction» PCR)

Izolirano DNA smo uporabili v nadaljni molekularni analizi. Fragmente DNA smo pomnožili s pomočjo PCR reakcije. V 1,5 ml mikrocentrifugirki smo si pripravili mešanico reagentov za vzorce in negativno kontrolo. 34 µl mešanice smo odpipetirali v 0,5 ml mikrocentrifugirke in dodali 1 µl vzorčne DNA (Preglednica 3). Pri negativni kontroli smo namesto DNA dodali sterilno bidestilirano vodo. V omenjenih mešanicah smo izvedli PCR reakcijo, kot je opisano v Preglednici 4.

Preglednica 3: Priprava PCR mešanice za 1 vzorec za ITS in LSU

Reagent	Volumen
bidestilirana H ₂ O	24,72 µl
MgCl ₂ (25mM)	2,10 µl
10x pufer	3,50 µl
dNTP (10mM)	0,70 µl
Oligonukleotidni začetnik 1 (10 pmol/µl)	1,40 µl
Oligonukleotidni začetnik 2 (10 pmol/µl)	1,40 µl
DreamTaq polimeraza	0,18 µl
DNA	1,00 µl

Preglednica 4: Program za pomnoževanje predela ITS rDNA, LSU rDNA in ACT

Začetna denaturacija: 95 °C	2 minuti
Denaturacija: 95 °C	45 sekund
Vezava začetnih oligonukleotidov: 54 °C	30 sekund
Elongacija: 72 °C	30 sekund
Končna elongacija: 72 °C	4 minute

Rod *Cladosporium* smo določili na podlagi morfologije in ITS zaporedja. Pomnožili smo odsek regije notranjih distančnikov 1 in 2 (ITS 1 in ITS 2) vključno s 5,8S rDNA (ITS rDNA), za kar smo uporabili nukleotidna začetnika ITS4 in ITS5 (Preglednica 5) (White in sod., 1990).

Za identifikacijo rodu *Cladosporium* do vrste smo pomnožili še predel, ki kodira gen za aktin, z nukleotidnima začetnikoma ACT-512F in ACT-738R (Preglednica 5) (Carbone in Kohn, 1999).

Preglednica 5: Oligonukleotidni začetniki, ki smo jih uporabili za pomnožitev izbranih predelov genoma za identifikacijo

OLIGONUKLEOTIDNI ZAČETNIKI	DOLŽINA FRAGMENTOV PCR
ITS 4: TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC ITS 5: GGA AGTAAA AGT CGT AAC AAGG	600
ACT-512F: ATG TGC AAG GCC GGT TTC GC ACT-738R: TAC GAG TCC TTC TGG CCC AT	300
NL1: 5`- GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3` NL4: 5`-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3`	600

Za identifikacijo kvasovk smo pomnožili odsek variabilnih domen D1/D2 velike ribosomske podenote LSU. Uporabili smo nukleotidna začetnika NL1 in NL4 (preglednica 5) (Boekhout in sod. 1995).

3.2.5.3 Gelska elektroforeza

Z gelsko elektroforezo smo preverili prisotnost oz. dolžino fragmentov, ki smo jih pomnožili s PCR reakcijo. Pripravili smo 30 ml 1 % gela z agarozo. Za barvanje fragmentov smo v tekoč, ohlajen gel dodali 3 µl barvila SYBR Safe. Elektroforeza je potekala v 0,5 x TAE pufri. V levo luknjico gela smo nanесли 2 µl lestvice, v ostale luknjice pa vzorce zmešane s 5x nanašalnim pufrom. Negativno kontrolo smo odpipetirali v zadnjo luknjico. Elektroforeza je trajala približno 30 minut. Po končani elektroforezi smo gel slikali. Sliko smo na transluminatorju obdelali z računalniškim programom UV1.

3.2.5.4 Določevanje nukleotidnih zaporedij

Nukleotidna zaporedja pomnoženega dela DNA so določili v podjetju Macrogen INC z DNA sekvenatorjem 3730 xl, ki temelji na Sangerjevi metodi in kapilarni elektroforezi.

3.2.6 Shranjevanje sevov

Vse izolirane seve smo shranili v Zbirki genske banke mikroorganizmov EX infrastrukturnega centra Mycosmo Biotehniške fakultete, ki deluje v okviru mreže infrastrukturnih centrov

Univerze v Ljubljani (MRICUL). Izolate smo shranili na poševna MEA gojišča pri temperaturi 4 °C, v skrinji pri -80 °C (Microbank sistem) oz. v tekočem dušiku (suspenzija celic v 10 % glicerolu) pri temperaturi -196 °C.

4 REZULTATI

4.1 IZOLACIJA GLIV S/IZ PREZRAČEVALNIH NAPRAV V PROSTORIH KLINIKE GOLNIK

Mesto vzorčenja, T izolacije in vrste izolatov iz različnih klimatskih naprav in rež po prostorih so zbrani v Preglednici 6. Med plesnimi so prevladovale glive rodu *Cladosporium* in *Aspergillus*. Rasle so pri 24 °C ali 30 °C.

Preglednica 6: Glive, ki smo jih izolirali iz rež klimatskih naprav (K) in zračnikov (Z) v prostorih Klinike Golnik. Izolate označene z * smo identificirali na podlagi morfologije in mikroskopskih znakov, ostale pa na podlagi nukleotidnih zaporedij izbrane DNA regije

MESTO IZOLACIJE	T izolacije	VRSTE (SEVI)
Laboratorij za respiratorno mikrobiologijo (LRM)		
LRM 286 (K)	24 °C	<i>C. bruhnei</i> (EXF-6923)
LRM 288 (K)	24 °C	<i>C. halotolerans</i> (EXF-6924)
Laboratorij za patologijo in citologijo (LPC)		
LPC hodnik (Z)	30 °C	<i>Cladosporium</i> sp.
LPC (K)	30 °C	<i>Cladosporium</i> sp.
PROSEKTURA (Z)	30 °C	<i>Alternaria</i> sp.
	30 °C	<i>Cladosporium</i> sp.
	30 °C	<i>C. halotolerans</i> (EXF-6926)
	24 °C	<i>Epicoccum nigrum</i> (EXF-6927)
Laboratorij za klinično biokemijo in histologijo		
LKBH: hodnik (Z)	30 °C	<i>Alternaria</i> sp.
	24 °C	<i>C. cladosporoides</i> (EXF-6929)
		<i>C. pseudocladosporoides</i> (EXF-6928)
LKBH: (K)	30 °C	
	37 °C	<i>A. fumigatus</i> *
LKBH: hodnik 2. (Z)	30 °C	<i>C. sphaerospermum</i> (EXF-6930)
	37 °C	<i>C. tenuissimum</i> (EXF-6931)
		<i>C. pseudocladosporoides</i> (EXF-6932)
LKBH: pomivalnica (K)	24 °C	
	30 °C	<i>A. fumigatus</i> *

se nadaljuje

Nadaljevanje

Preglednica 6: Glive, ki smo jih izolirali iz rež klimatskih naprav (K) in zračnikov (Z) v prostorih Klinike Golnik. Izolate označene z * smo identificirali na podlagi morfologije in mikroskopskih znakov, ostale pa na podlagi nukleotidnih zaporedij izbrane DNA regije

MESTO IZOLACIJE	T izolacije	VRSTE (SEVI)
LKBH: soba z reagenti (K)	24 °C	<i>C. pseudocladosporoides</i> (EXF-6933)
LKBH: reže klimatske naprave v pomivalnici		
Ostali bolnišnični prostori		
Hodnik pred ambulanto 103 (K)	24 °C	<i>Alternaria</i> sp.*
	24 °C	<i>A. versicolor</i> *
Prostor za testiranje (K)	24 °C, 37 °C	2x <i>A. Fumigatu</i> *
103 čajna kuhinja (Z)	30 °C	<i>Aureobasidium</i> sp. (EXF-6934)
112 urinarij (Z)	30 °C, 24 °C	2x <i>A. Flavus</i> *
Glavna avla (K)	37 °C	<i>A. fumigatus</i> *
WC v 1. Nadstropju (Z)	37 °C	<i>A. fumigatus</i> *
Bolniška soba 204 (K)	37 °C	<i>A. fumigatus</i> (EXF-6939)

Iz z vodo povezanih habitatov smo poleg plesni izolirali tudi kvasovke rodu *Candida* in *Exophiala* (Preglednica 7). Kvasovke so rasle pri 37 °C.

Preglednica 7: Plesni in kvasovke, ki smo jih izolirali iz z vodo povezanih habitatov v Kliniki Golnik, in identificirali na podlagi nukleotidnih zaporedij izbrane DNA regije oz. Na podlagi morfologije (označeni z *)

MESTO IZOLACIJE	T izolacije	VRSTA GLIV
Pomivalno korito (PK) (pomivalnica LRM)	30 °C	<i>Fusarium</i> sp.*
Pomivalno korito (PK) odtok (soba z reagenti LKBH)	30 °C	<i>Aspergillus fumigatus</i> *
Reže vodnega avtomata (endoskopija)	37 °C	<i>Aspergillus fumigatus</i> *
Stene pomivalnega stroja (dezinfekcija)	37 °C	<i>Aspergillus fumigatus</i> *
Reže kavnega avtomata (mala predavalnica)	37 °C	<i>Aspergillus fumigatus</i> *
	37 °C	<i>Candida albicans</i>
Reže kavnega avtomata (glavna avla)	37 °C	<i>Candida inconspicua</i>
Izlivnik (sanitarni izliv odd. 100)	37 °C	<i>E.dermatitidis</i> (EXF-6942)
Pomivalni stroj (čajna kuhinja odd.100)	/	/
Goske (sanitarni izliv odd.100)	/	/

4.2 IZOLACIJA GLIV IZ BOLNIŠNIČNIH KOPALNIC

Kvasovke smo izolirali iz bolnišničnih kopalnic, in sicer iz odtokov umivalnikov in tuša (Preglednica 8). Izolirali smo kvasovko *Candida albicans*.

V glavni avli smo iz kavnega avtomata izolirali vrsto *Candida inconspicua*.

Iz izlivnika v sanitarnem izlivu smo izolirali vrsto *Exophiala dermatitidis*.

Preglednica 8: Glive, ki smo jih izolirali iz bolnišničnih kopalnic, in identificirali na podlagi nukleotidnih zaporedij izbrane DNA regije oz. Na podlagi morfologije (označeni z *)

MESTO IZOLACIJE	T izolacije	VRSTA GLIV
Kopalnica 1 odtok umivalnika	37 °C	<i>C. albicans</i> (EXF-6936) <i>C. albicans</i> (EXF-6981)
Kopalnica 2 glava tuša	37 °C	<i>A. fumigatus</i> *
odtok v tuš kabini	37 °C	<i>C. albicans</i> (EXF-6940)
Kopalnica 3 odtok v tuš kabini	37 °C	<i>C. albicans</i> , <i>A. fumigatus</i> *
Kopalnica 4 odtok tuša (bolniška soba 204)	37 °C	<i>A. fumigatus</i> *
odtok umivalnika	37 °C	/
fuge	37 °C	/

4.3 IZOLACIJA GLIV IZ DOMAČIH KOPALNIC

Z namenom primerjave smo vzorčili tudi kopalnice v blokih v Kranju. Izolirali smo: *C. Parapsilosis* (2x), *E. Dermatitidis* (1x), predstavnika rodu *Fusarium*. (1x). Vsi izolati so rasli pri 37 °C (Preglednica 9).

Preglednica 9: Plesni in kvasovke, ki smo jih izolirali iz domačih kopalnic

MESTO IZOLACIJE	T izolacije	VRSTA PLESNI
Kopalnica 1 odtok v kopalnici na tleh	37 °C	<i>Fusarium sp.</i> (EXF-6997)
odtok v kadi	37 °C	<i>Candida parapsilosis</i> (EXF-6998)
odtok umivalnika	37 °C	<i>Exophiala dermatitidis</i> (EXF-7000)

se nadaljuje

Nadaljevanje

Preglednica 9: Plesni in kvasovke, ki smo jih izolirali iz domačih kopalnic

MESTO IZOLACIJE	T izolacije	VRSTA PLESNI
Kopalnica 2		
odtok v kopalnici na tleh	37 °C	/
odtok v tuš kabini	37 °C	<i>Candida parapsilosis</i> (EXF-7001)
fuge v tuš kabini	37 °C	/
odtok umivalnika v kopalnici	37 °C	/
Kopalnica 3		
odtok v kadi v kopalnici	37 °C	/
odtok umivalnika v kopalnici	37 °C	/
odtok v kopalnici na tleh	37 °C	/
Kopalnica 4		
odtok v tuš kabini	37 °C	/
odtok umivalnika v kopalnici	37 °C	/

4.4 IZOLACIJA GLIV IZ IZMEČKOV BOLNIKOV

4.4.1 Kvasovke

Vzorčili smo izmečke 36 bolnikov (Preglednica 11). Najpogosteje smo izolirali: *C. albicans* (14x), *C. glabrata* (1x), *Kazachstania bovina* (1x).

Preglednica 10: Kvasovke, ki smo jih po inkubaciji na 37 °C izolirali iz izmečkov bolnikov z različnimi boleznimi dihal. Bolniki so označeni s številkami

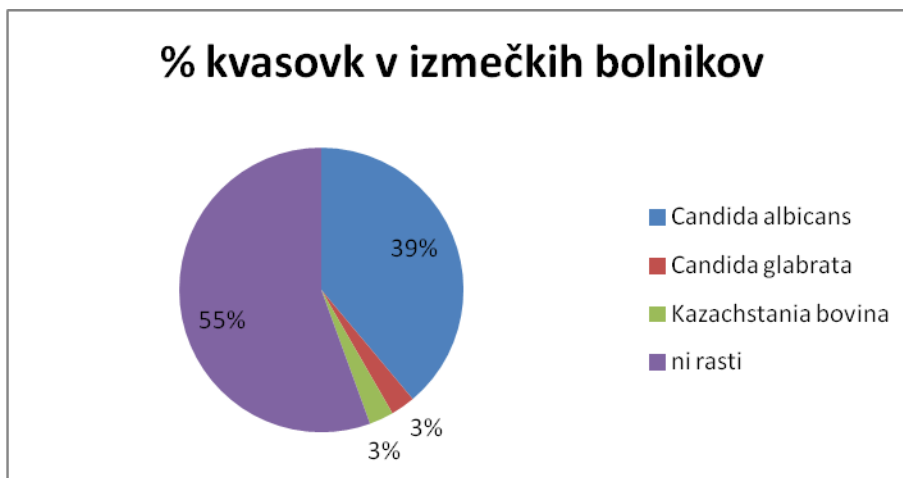
ŠT.BOLNIKA	VRSTA KVASOVKE
7621	<i>Candida albicans</i>
7622	<i>Candida albicans</i>
7623	/
7626	/
7635	<i>Candida albicans</i>
7650	<i>Candida albicans</i>
7651	/
7657	<i>Candida albicans</i>
7658	/
7694	<i>Candida albicans</i>

se nadaljuje

Nadaljevanje

Preglednica 10: Kvasovke, ki smo jih po inkubaciji na 37 °C izolirali iz izmečkov bolnikov z različnimi boleznimi dihal. Bolniki so označeni s številkami

ŠT.BOLNIKA	VRSTA KVASOVKE
7695	<i>Candida albicans</i>
7696	/
7697	/
7712	<i>Kazachstania bovina</i>
77122	<i>Candida albicans</i>
7734	/
7735	/
7742	/
7743	<i>Candida albicans</i>
7744	<i>Candida albicans</i>
7745	/
7750	/
7751	<i>Candida albicans</i>
7775	/
7800	<i>Candida albicans</i>
7801	/
7802	/
7807	/
7808	/
7813	/
7860	/
7861	<i>Candida albicans</i>
7862	<i>Candida glabrata</i>
7863	<i>Candida albicans</i>
7865	/
7875	/

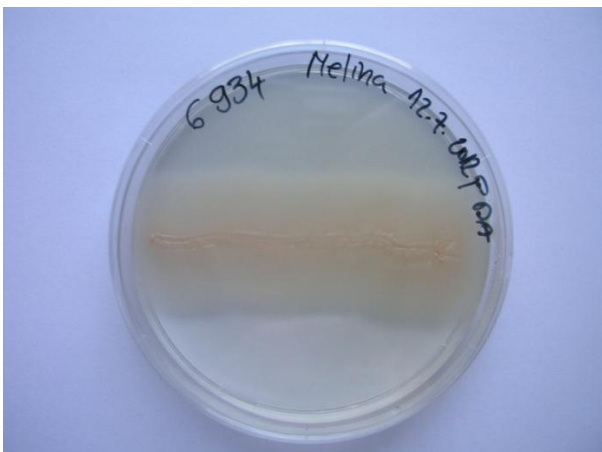


Slika 2: Delež posameznih vrst kvasovk, ki smo jih izolirali iz izmečkov bolnikov

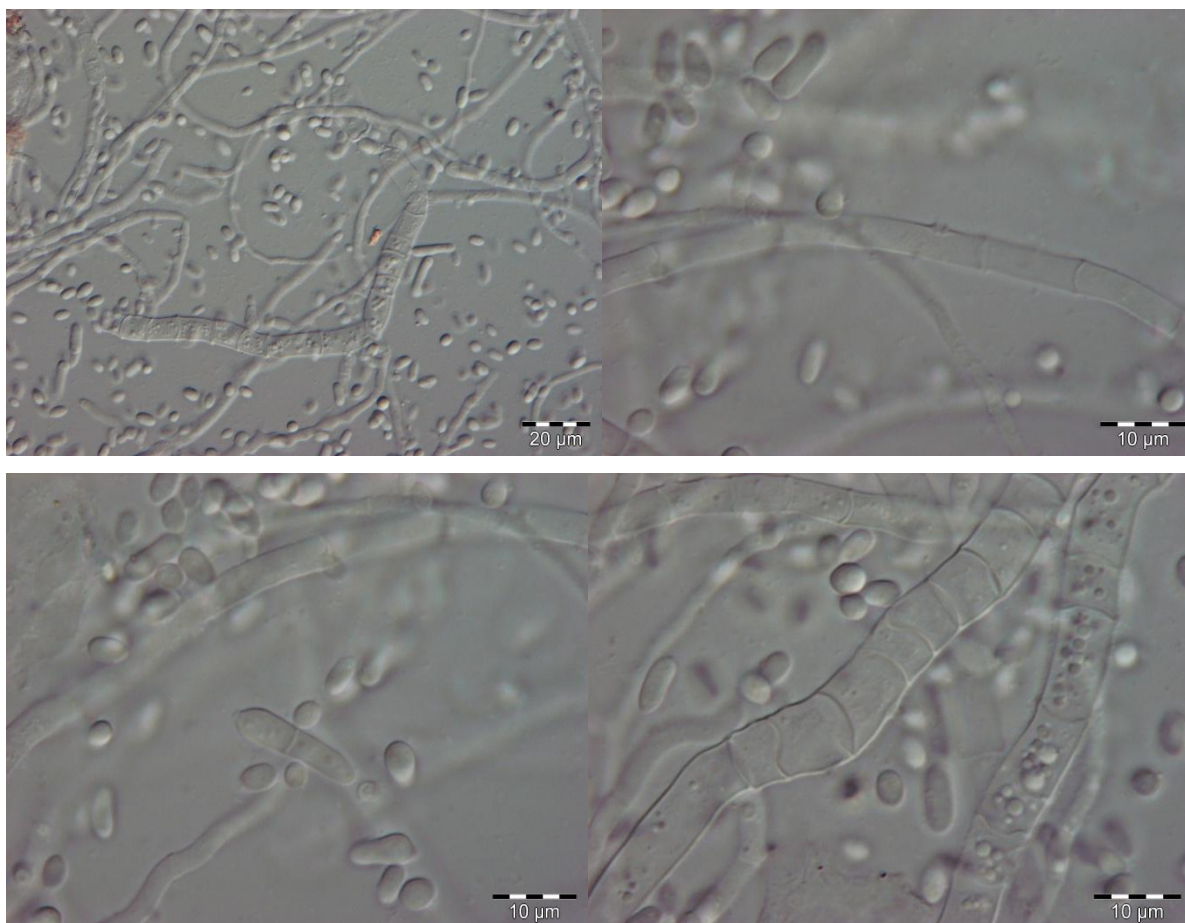
4.5 IDENTIFIKACIJA PLESNI IN KVASOVK

4.5.1 Rod *Aureobasidium*

Dimorfno glivo *Aureobasidium pullulans* smo določili makroskopsko in na podlagi ITS rDNA zaporedja. Izolirali smo jo iz rež zračnikov v čajni kuhinji 103.



Slika 3: Makromorfološki posnetek glive *Aureobasidium pullulans* (EXF-6934) na gojišču PDA

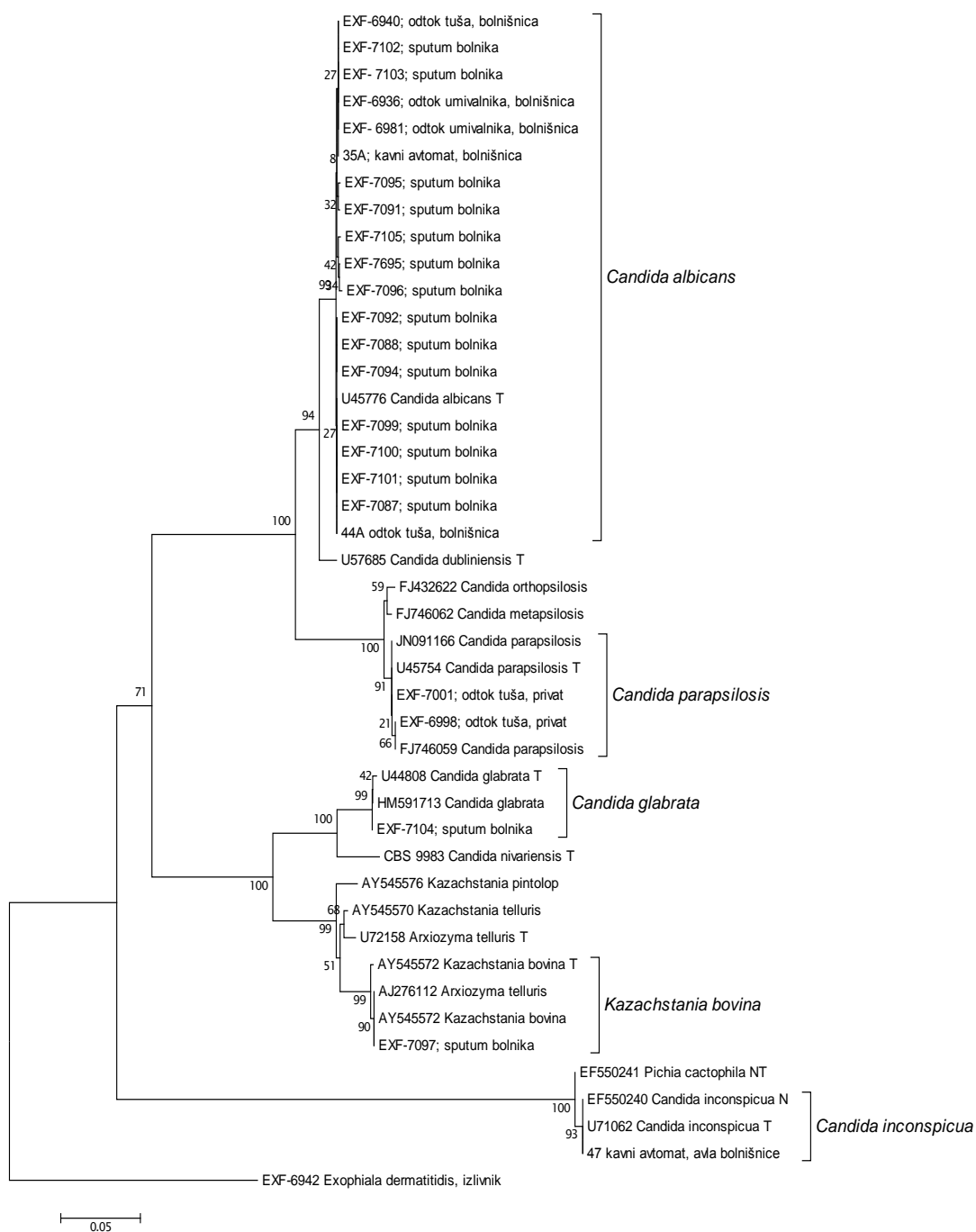


Slika 4: Mikromorfološki posnetki glive *Aureobasidium pullulans* (EXF-6934) na gojišču PDA

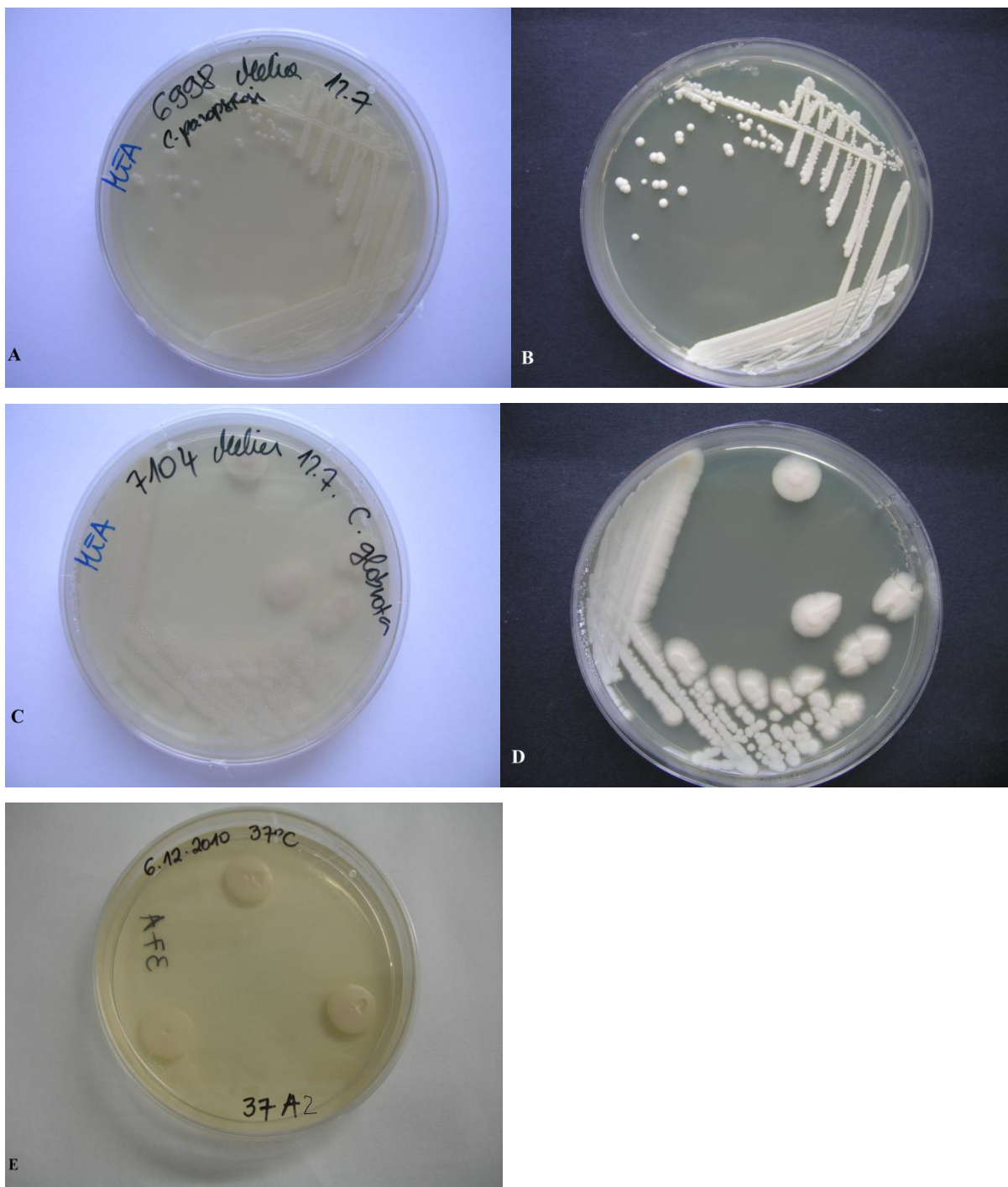
4.5.2 Rod *Candida*

Vrste rodu *Candida* smo identificirali makroskopsko na podlagi barve in oblike kolonij ter na podlagi LSU zaporedja.

Na podlagi LSU zaporedja (600 nukleotidov) smo seve rodu *Candida* uvrstili v 5 vrst: *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. inconspicua*, *K. bovina*.



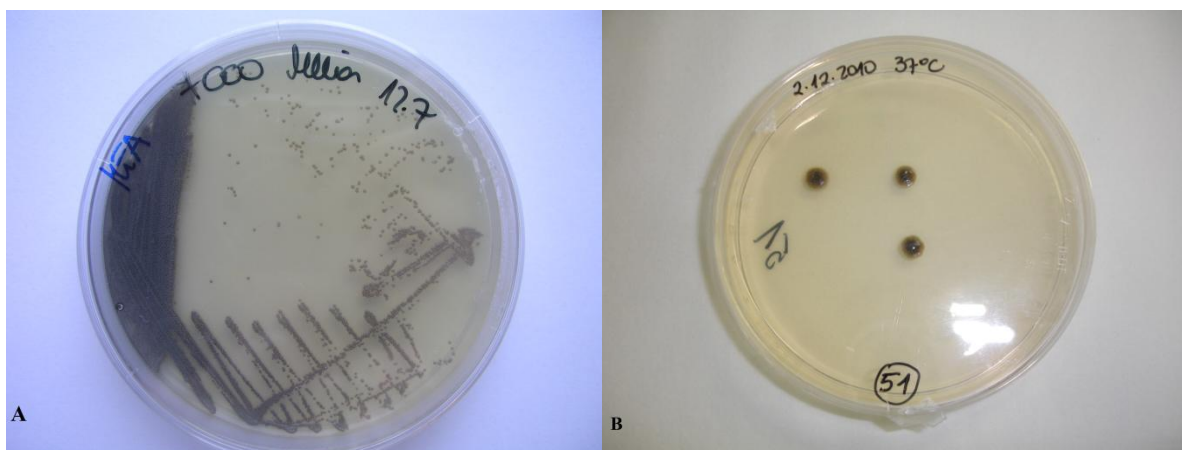
Slika 5: Koreninjeno sosedsko-pridružitveno filogenetsko drevo na osnovi poravnanih zaporedij LSU rDNA (D1/D2 domeni) izbranih askomicetnih kvasovk in referenčnih sevov z izračunano evolucijsko oddaljenostjo. Kot korenina je uporabljeno zaporedje črne kvasovke *Exophiala dermatitidis*



Slika 6: Makromorfološki posnetki kvasovk rodu *Candida* na gojiščih MEA. A-B: *C. parapsilosis* (EXF-6998); C-D: *C. glabrata* (EXF-7104); E: *C. albicans* (EXF-6936)

4.5.3 Rod *Exophiala*

Na osnovi morfologije in LSU zaporedja smo identificirali vrsto *E. dermatitidis*. Izolirali smo jo na dveh mestih: na oddelku 100 iz izlivnika v sanitarnem izlivu in iz odtoka umivalnika v domači kopalnici. Rod smo najprej določili makroskopsko, nato pa smo na podlagi nukleotidnega zaporedja določili vrsto kvasovke.

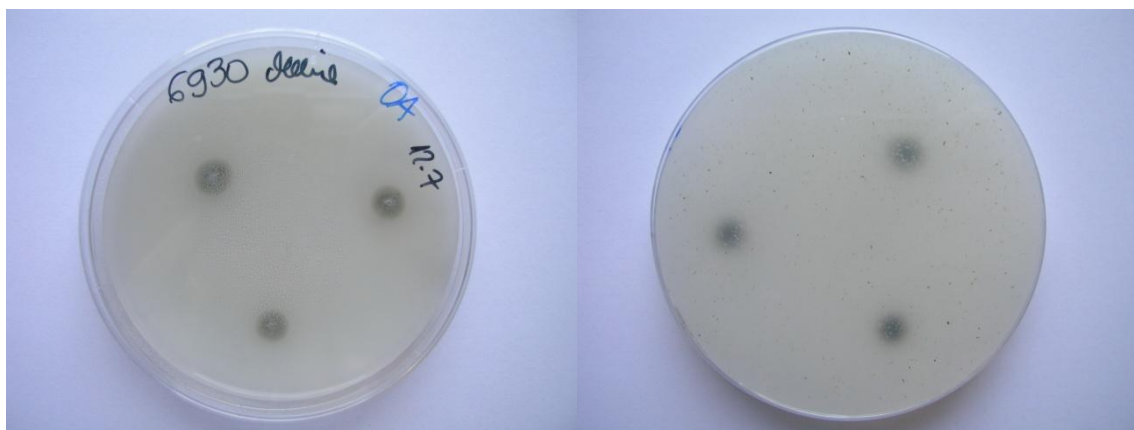


Slika 7: Makromorfološki posnetek kvasovke *E. dermatitidis* na gojišču MEA. A: *E. dermatitidis* (EXF-7000); B: *E. dermatitidis* (EXF-6942)

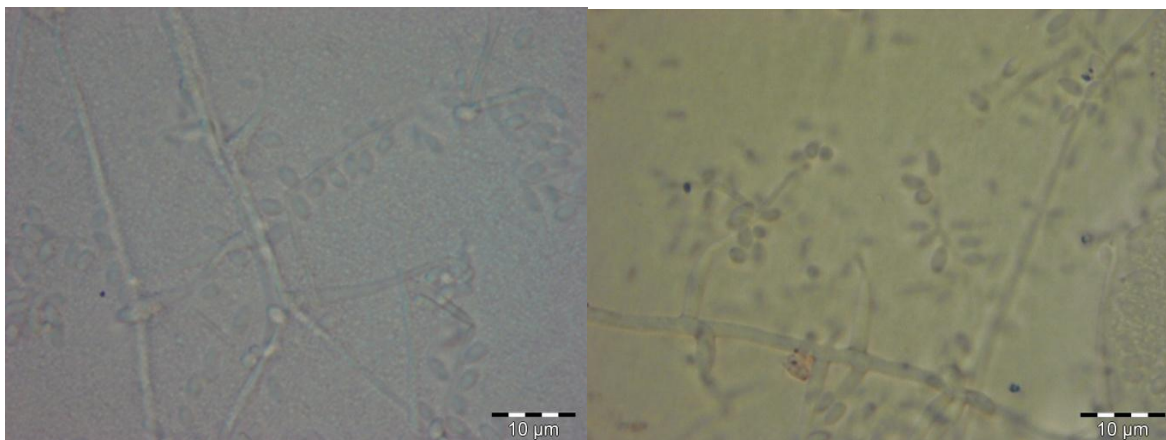
E. dermatitidis (EXF-6942) smo določili na podlagi LSU rDNA zaporedja.

4.5.4 Rod *Acrodontium*

Glivo *Acrodontium* sp. smo izolirali v LKBH iz rež zračnika na hodniku. Rasla je pri 24 °C.



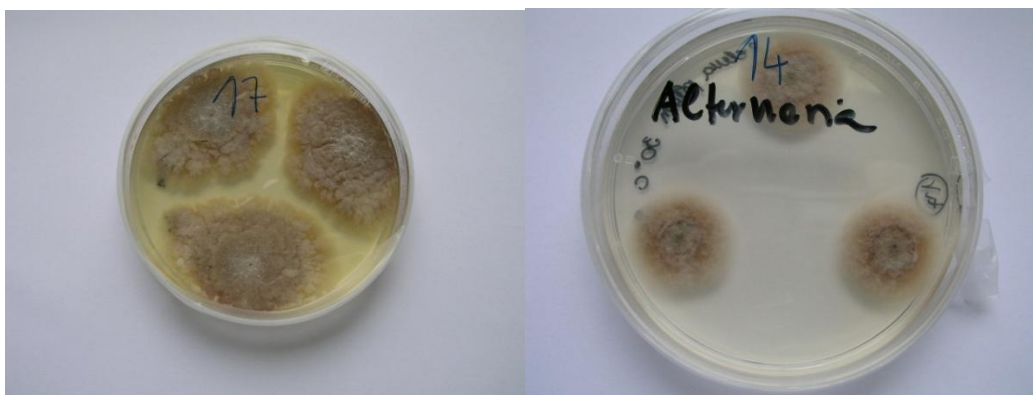
Slika 8: Makromorfološki posnetek glive *Acrodontium* sp. (EXF-6930) na gojišču OA



Slika 9: Mikromorfološki posnetek glive *Acrodontium* sp. (EXF-6930)

4.5.5 Rod *Alternaria*

Glive rodu *Alternaria* smo določili makroskopsko. Izolirali smo jih iz rež zračnikov v prosekuri, iz rež zračnikov na hodniku v LKBH ter iz rež klimatskih naprav na oddelku 103 na hodniku pred ambulanto. Identificirali smo jih na osnovi značilnih konidijev, ki so prečno iz vzdolžno septirani.



Slika 10: Makromorfološka posnetka gliv iz rodu *Alternaria* na gojišču MEA. Prvo (levo) smo izolirali iz rež klimatske naprave v LKBH, drugo (desno) pa iz rež zračnikov v prosekuri

4.5.6 Rod *Aspergillus*

Rod *Aspergillus* smo določili makroskopsko, na podlagi oblike, strukture in barve kolonij. Predstavniki, ki so se pojavili so *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus versicolor*. Skupaj smo identificirali 16 predstavnikov rodu *Aspergillus*. Identificirali smo 13 sevov vrste *A. fumigatus*. 3 seve smo izolirali iz rež klimatskih naprav v prostorih, kjer se giblje zaposleno osebje: laboratoriji, čajna kuhinja. Ostalih 10 sevov smo izolirali iz sob, kjer ležijo bolniki in kjer se gibljejo obiskovalci. 2 seva *Aspergillus flavus* smo izolirali iz zračnika v urinariju. Glivo *Aspergillus versicolor* smo izolirali iz rež klimatske naprave na hodniku 103 pred ambulantno.



Slika 11: Makromorfološki posnetek glive *A. fumigatus* na gojišču MEA

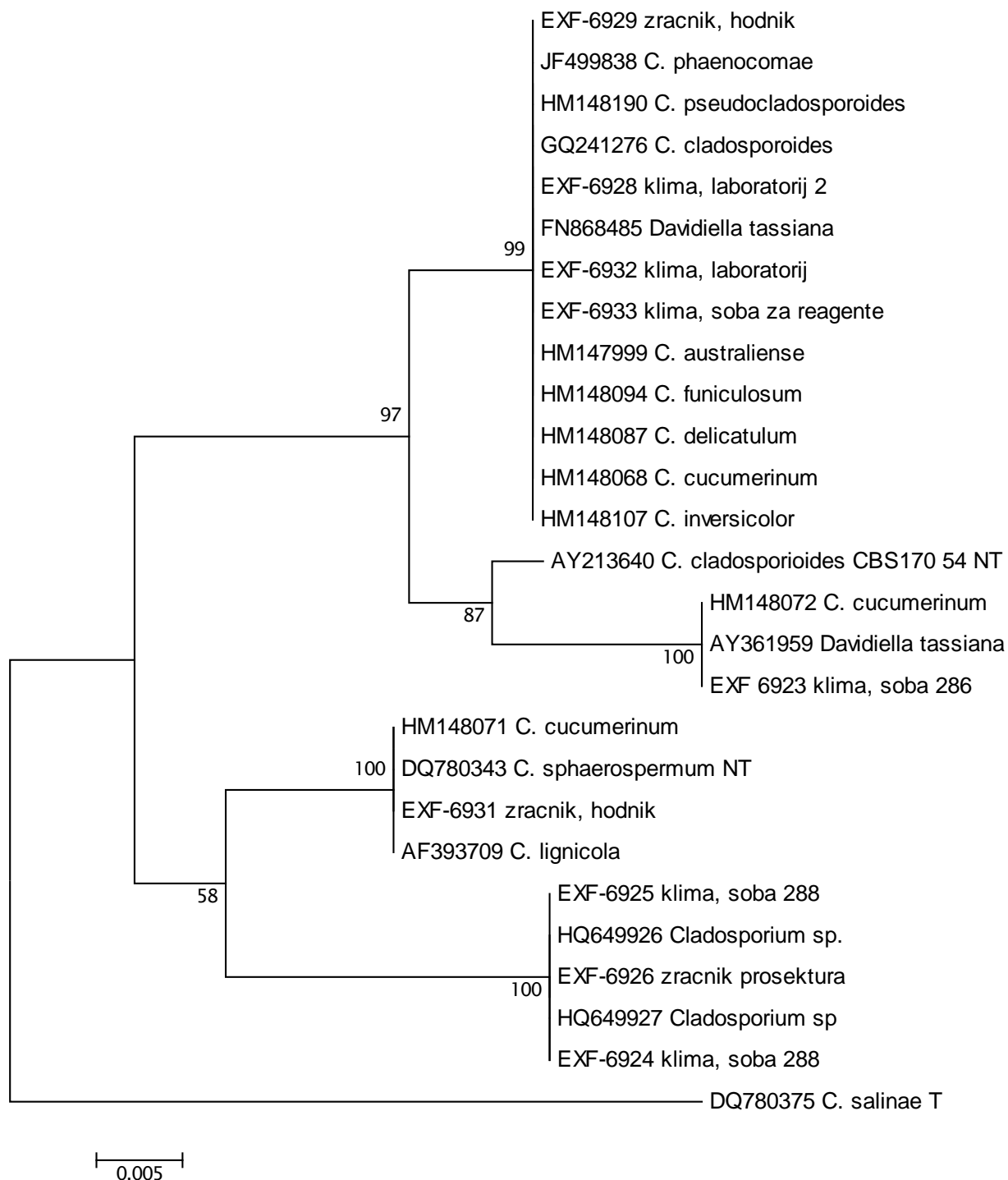
4.5.7 Rod *Cladosporium*

V naši raziskavi smo izolirali 9 sevov iz rodu *Cladosporium*. 3 seve smo izolirali iz klimatskih naprav v sobah 286 in 288 v LRM: *C. bruhnei* (1x), *C. halotolerans* (2x). Iz rež zračnikov v prosekuri smo izolirali *C. halotolerans* (1x).

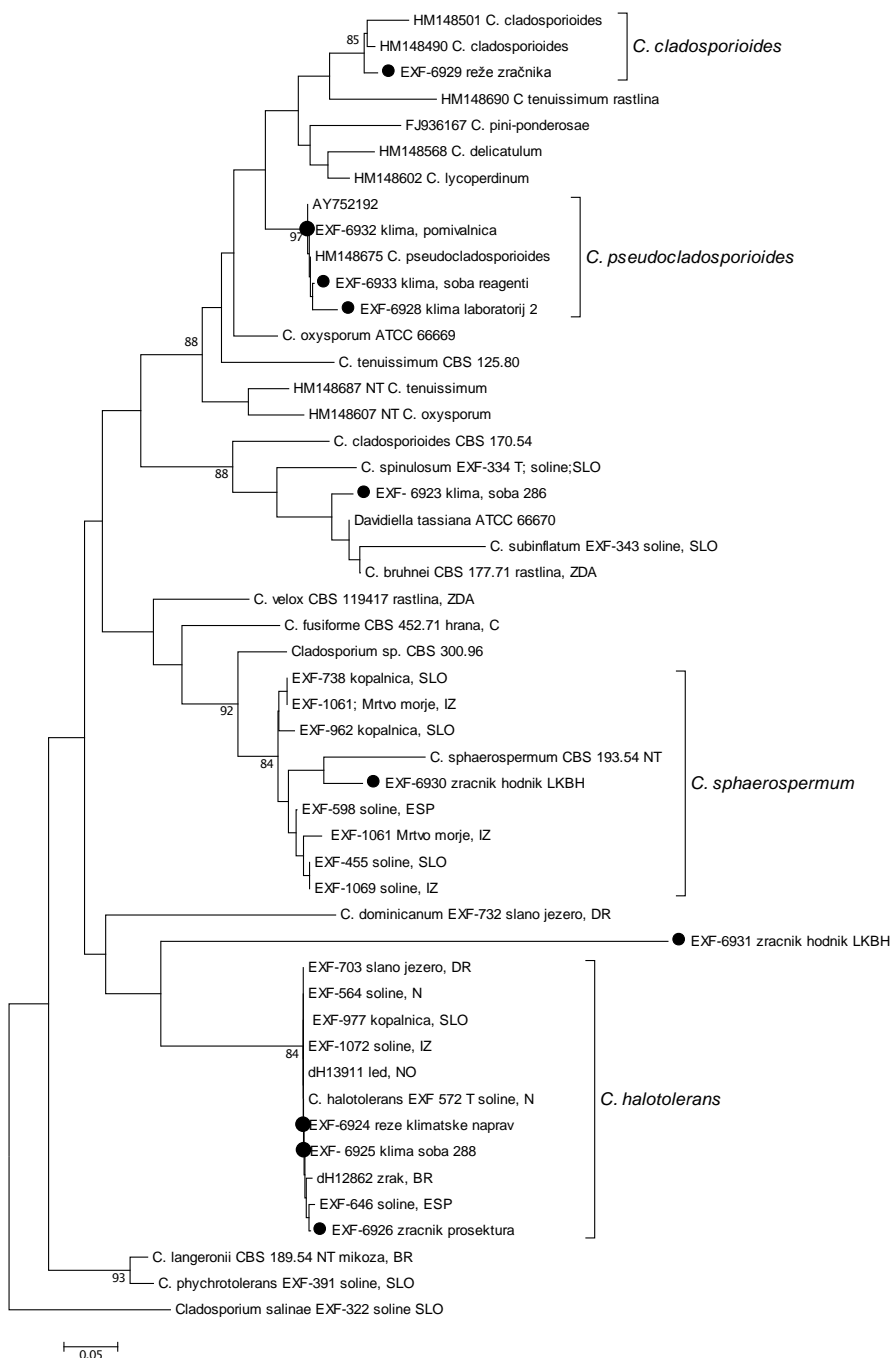
Izolirali smo 3 seve iz klimatskih naprav v LKBH: *C. pseudocladosporoides* (1x), *C. cladosporoides* (1x), *C. tenuissimum* (1x). Iz rež klimatskih naprav v pomivalnici v LKBH: *C. pseudocladosporoides* (1x). Iz rež klimatskih naprav v sobi, kjer se pripravljajo reagenti: *C. pseudocladosporoides* (1x).

Rod *Cladosporium* smo določili na podlagi morfologije in ITS zaporedja dolžine približno 600 nukleotidov (slika 12) Do nivoja vrst smo seve določili na podlagi zaporedja, ki kodira aktin (slika 13). Zaporedje, ki kodira aktin je krajše (300 nukleotidov) in loči med vrstami.

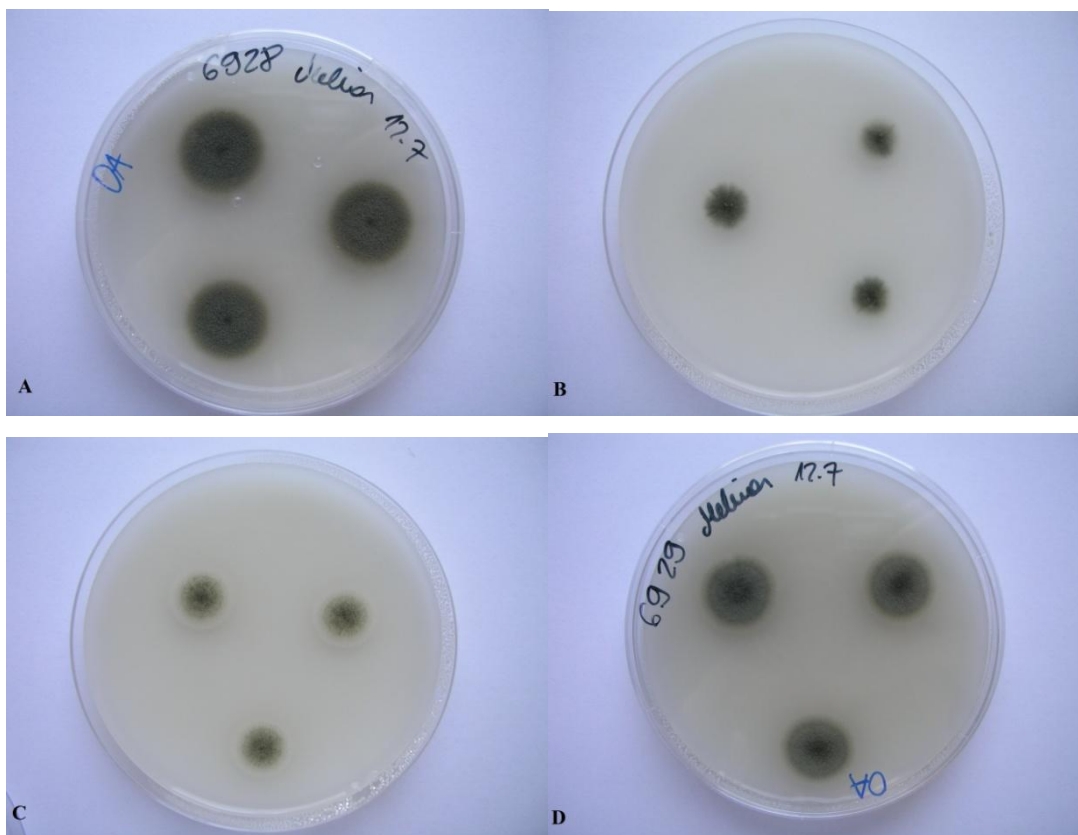
Na podlagi ITS zaporedja jih je težko določiti, ker imajo določeni sevi podobno ali identično nukleotidno zaporedje, zato je potrebno za identifikacijo do nivoja vrste določiti tudi druge dele genoma. Na podlagi zaporedja, ki ga kodira aktin smo seve rodu *Cladosporium* razporedili v 4 vrste: *C. cladosporoides*, *C. bruhnei*, *C. pseudocladosporoides*, *C. tenuissimum*.



Slika 12: Koreninjeno sosedsko-pridružitveno filogenetsko drevo nukleotidnih zaporedij ITS rDNA sevov rodu *Cladosporium* z izračunano evolucijsko oddaljenostjo. Kot korenina je uporabljeno zaporedje vrste *C. salinae*

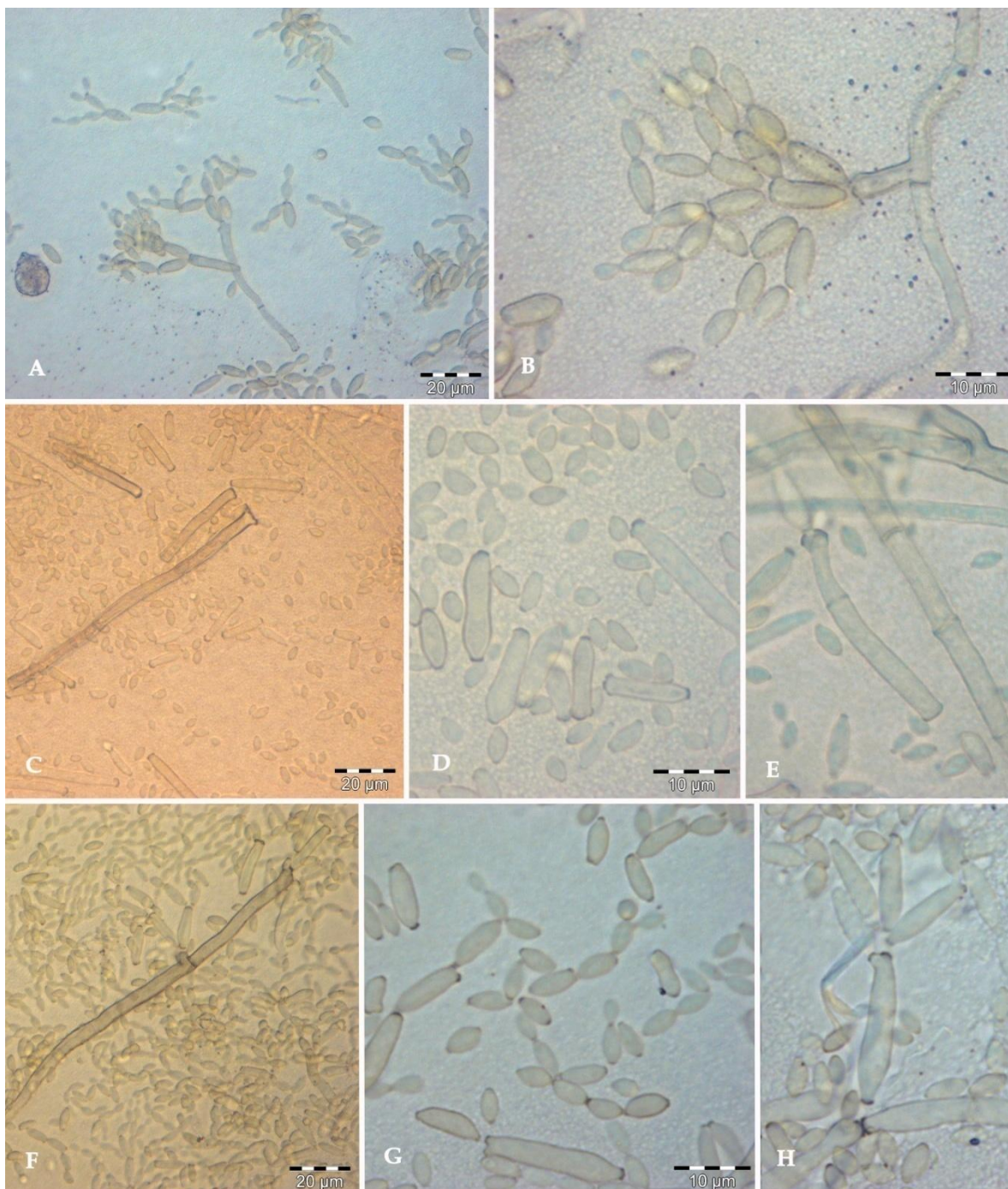


Slika 13: Koreninjeno sosedsko-pridružitveno filogenetsko drevo na osnovi poravnanih zaporedij dela gena, ki kodira aktin (ACT) sevov rodu *Cladosporium* z izračunano evolucijsko oddaljenostjo. Kot korenina je uporabljeno zaporedje vrste *C. salinae*. S piko označeni sevi so bili izolirani v Kliniki Golnik



Slika 14: Makromorfološki posnetki gliv rodu *Cladosporium* na gojiščih OA: A: *C. pseudocladosporoides* (EXF-6928); B: *C. tenuissimum* (EXF-6931); C: *C. bruhnei* (EXF-6923); D: *C. cladosporoides* (EXF-6929)

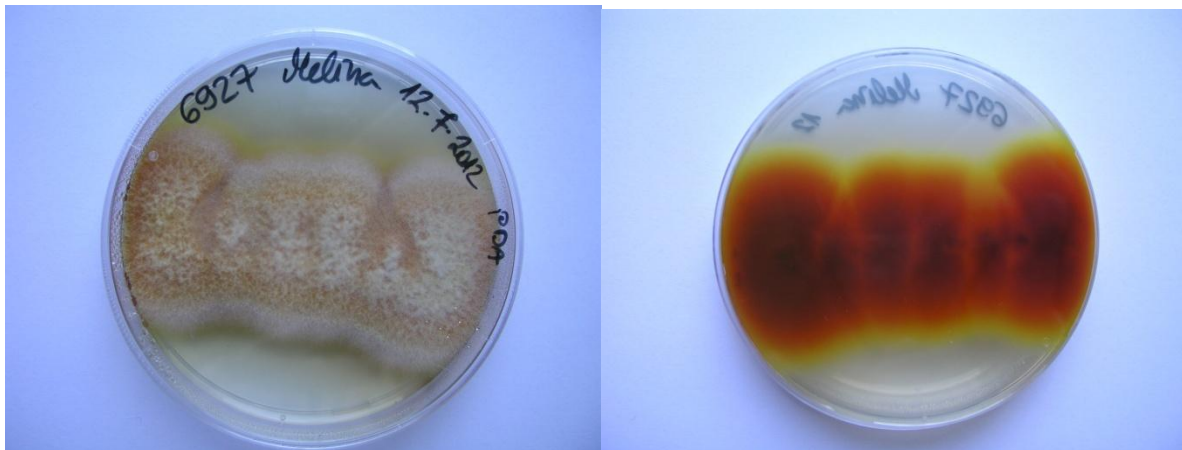
Na sliki se jasno vidi razlika v barvi in strukturi kolonij pri glivah rodu *Cladosporium*.



Slika 15: Mikromorfološki posnetki gliv rodu *Cladosporium*. A-B: *C. bruhnei* (EXF-6923); C-E: *C. cladosporoides* (EXF-6929); F-H: *C. pseudocldosporoides* (EXF-6928)

4.5.8 Rod *Epicoccum*

Identificirali smo 1 sev rodu *Epicoccum*, in sicer vrsto *Epicoccum nigrum*. Izolirali smo ga iz rež zračnika v prosepturi. Določili smo ga na podlagi barve in oblike kolonij ter na podlagi nukleotidnega zaporedja ITS.



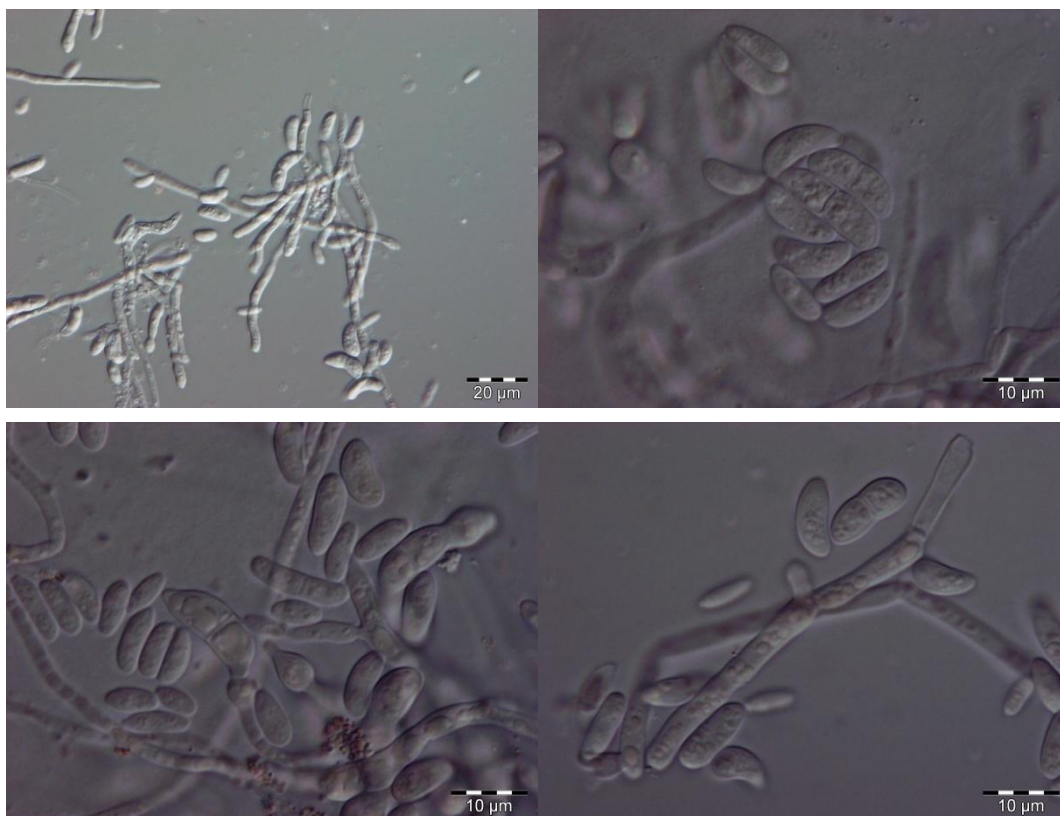
Slika 16: Makromorfološki posnetek glive *Epicoccum nigrum* (EXF-6927) na gojišču PDA. Levo: oblika in barva kolonij; deno: reverz

4.5.9 Rod *Fusarium*

Izolirali smo 3 seve rodu *Fusarium*: iz pomivalnega korita v pomivalnici LRM, iz rež zračnikov v čajni kuhinji oddelka 103 in iz odtoka v kopalnici na tleh. Glivo smo identificirali na podlagi morfoloških značilnosti in nukleotidnega zaporedja LSU.



Slika 17: Makromorfološki posnetek glive *Fusarium dimerum* (EXF-6997) na gojišču PDA, ki smo jo izolirali iz odtoka v kopalnici v tleh



Slika 18: Mikromorfološki posnetki glive *Fusarium dimerum* (EXF-6997) na gojišču PDA

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Klinika Golnik ali Univerzitetna klinika za pljučne bolezni in alergijo Golnik je bila ustanovljena leta 1921 kot osrednja protituberkulozna bolnišnica. Klinika Golnik je tudi univerzitetno pedagoška ustanova od leta 1971, ko se je pridružila Kliničnemu centru v Ljubljani. To ni samo bolnišnica namenjena diagnostiki, zdravljenju in rehabilitaciji bolnikov, ampak je univerzitetno pedagoška ustanova za do- in podiplomsko izobraževanje (Zupančič Slavec, 2008). Na sekundarnem nivoju, poleg diagnostike in zdravljenja bolnikov s pljučnimi in alergijskimi boleznimi, izvajajo tudi diagnostiko in zdravljenje pri drugih bolnikih z boleznimi notranjih organov, prvenstveno boleznih srca in zgornjih prebavil (Klinika Golnik). Klinika Golnik je razdeljena na več oddelkov, kjer zdravijo bolnike z boleznimi dihal kot so rak pljuč in plevre, okužbe dihal, intersticijske pljučne bolezni, sarkoidoza, vaskulitisi, cistična fibroza, azbestne bolezni, ki kasneje privedejo do nastanka pljučnega raka. Drugi oddelki obravnavajo astme, bolezni alergijskega izvora (alergija na pike žuželk, zdravila). Zdravijo kronično obstruktivno pljučno bolezen in kronično respiratorno influenco. Imajo tudi zaprt in ločen oddelek od ostalih, t.i. oddelek 700, kjer zdravijo tuberkulozo (Zupančič Slavec, 2008).

V Kliniki Golnik izvajajo tudi funkcionalne preiskave: na endoskopskem oddeleku izvajajo bronhoskopijo, gastroskopijo in kolonoskopijo. Imajo tudi oddelek za kardiovaskularno funkcijsko diagnostiko in ultrazvočno diagnostiko in oddelek za respiratorno funkcijsko diagnostiko. Poleg teh imajo tudi laboratorij za motnje dihanja v spanju in rentgenski oddelek. V okviru oddelka za intenzivno nego in terapijo pa izvajajo tudi holterjevo monitorizacijo, intrakardialno elektrokardiografijo ter desnostransko srčno kateterizacijo. Klinika Golnik ima tudi popolno laboratorijsko dejavnost (laboratorij za klinično biokemijo in hematologijo, laboratorij za respiratorno mikrobiologijo, laboratorij za mikobakterije, laboratorij za citologijo in patologijo, laboratorij za imunologijo in molekularno biologijo) (Klinika Golnik).

Glive povzročajo okužbe zlasti pri imunsko oslabljenih, težko bolnih in hospitaliziranih bolnikih z resnimi osnovnimi okužbami. V bolnišničnem okolju je zaradi vse večjega števila imunsko oslabljenih bolnikov tudi večje tveganje za nastanek glivnih okužb.

Incidenca glivičnih okužb v bolnišnicah se je v zadnjem desetletju povečala, predvsem zaradi povečanja in dolgotrajne uporabe širokospektralnih antibiotikov, povečanja števila bolnikov v intenzivnih enotah, bolnikov s hematološkimi boleznimi ter zdravljenja z visokimi odmerki kortikosteroidov. Največje tveganje za glivne okužbe, imajo bolniki po presaditvi krvotvornih matičnih celic in notranjih organov, po zapletenih operacijah trebušne votline in tisti z vstavljenimi katetri (Snaydman, 2003).

Glive najpogosteje vstopijo v objekte skozi prezračevalne sisteme, vrata, okna in s pomočjo okuženega gradbenega materiala (Shelton in sod., 2002). V zaprtih prostorih je lahko večja koncentracija teh gliv, kar je za imunsko oslABLJENE ljudi nevarno. Na koncentracijo spor gliv v bolniških sobah vpliva zračenje. Zračniki v bolnišnici so povezani s centralno klimatsko napravo. Zrak neprestano kroži, posledično se vse spore prenašajo po celotni bolnišnici. Spore lahko skozi klimatske naprave ali zračnike pridejo v bolniške sobe in do bolnikov, ki jih vdihnejo in posledično lahko pride do okužbe.

V Kliniki Golnik, kjer je potekala naša raziskava, smo želeli ugotoviti, katere glive se pojavljajo v bolnišničnih prostorih. Vzorčili smo klimatske naprave, zračnike, odtoke, vodovodne pipe, reže vodnega in kavnega avtomata, izlivnike, goske, pomivalne stroje, glave tušev. Vzorčili smo tudi izmečke bolnikov ter poskušali ugotoviti povezanost med glivami znotraj teh habitatov.

V času vzorčenja v bolnišnici in njeni okolici niso potekala gradbena dela, kar bi lahko sicer vplivalo na frekvenco pojavnosti gliv. V bolnišničnih sobah in laboratorijih, kjer smo odvezemali vzorce, so bila okna v času vzorčenja pogosto odprta zaradi zračenja.

Domnevo, da se oportuno patogene glive nahajajo na/v rutinsko nekontroliranih bolnišničnih prostorih smo potrdili. Izolirali smo filamentozne in dimorfne glive ter kvasovke in s tem potrdili domnevo glede pojavnosti teh gliv v bolnišnicah. Najpogosteje izolirane glive v naši raziskavi so bile glive iz rodov *Aspergillus*, *Alternaria* in *Cladosporium*. Med kvasovkami pa smo najpogosteje izolirali vrsto *Candida albicans*. Tudi v raziskavi, ki je potekala v Združenih državah Amerike, Shelton in sod., 2002 poročajo o podobnem spektru osamljenih gliv iz notranjih prostorov stavb. Najpogosteje so izolirali glive rodu *Cladosporium*, *Penicillium* in *Aspergillus*.

Vzorčili smo različne habitate: zračne habitate (Preglednica 6): klimatske naprave in zračnike; vodne habitate (Preglednica 7): odtoke, vodovodne pipe, reže vodnega in kavnega avtomata, izlivnike, goske, pomivalne stroje, glave tušev; bolnišnične kopalnice (Preglednica 8); domače kopalnice (Preglednica 9); izmečke bolnikov (Preglednica 10).

V laboratorijih smo zaznali raznolike glive kot v ostalih vzorčenih prostorih bolnišnice (Preglednica 6). Največja raznolikost gliv je bila razvidna v klimatskih napravah in zračnikih. Izolirali smo glive rodov *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Acrodontium*, *Aureobasidium*, *Alternaria* in *Epicoccum*. Kvasovk iz klimatskih naprav in zračnikov nismo izolirali.

Iz prezračevalnih naprav smo najpogosteje osamili glive iz rodu *Cladosporium* in *Aspergillus*. Največja frekvenca pojavnosti rodu *Cladosporium* je bila v laboratorijih LRM, LKBH in LPC. Tu smo izolirali vrste rodu *Cladosporium*, ki sicer niso običajne za bolnišnične prostore: *C. bruhnei*, *C. halotolerans*, *C. pseudocladosporoides*, *C. tenuissimum* (Slika 14).

Vrsto *C. bruhnei* so sicer izolirali iz razpadajočega rastlinskega materiala, zraka, človeka, iz izjemno slanah okolij, industrijskih voda. Morfološko zelo spominja na *C. herbarum*, vendar ima ožje konidije od 2.5 do 5µm široke in običajno tvorijo konidiofori samo eno apikalno izboklino. Vrsto uvrščamo v rizično skupino BSL-1 (CBS - KNAW Biodiversity Fungal Centre).

Vrsto *C. halotolerans* so izolirali iz solin ter drugih slanah okolij, tkivnih kultur, arašidovih celičnih suspenzij, sten kopalnic, kože delfina. Zaradi možnosti rasti na tako heterogenih substratih menijo, da se *C. halotolerans* razširja po zraku in da je zmožna kolonizacije na katerem koli substratu, ki je na voljo, čeprav ima ekološko nišo drugje. Zelo malo podatkov je o tem, da ta vrsta naseljuje rastline. Vrsta *C. halotolerans* je tesno povezana s slanimi okolji (Bensch in sod., 2010).

Vrsta *C. pseudocladosporoides* je razširjena po celem svetu in je morfološko zelo podobna vrsti *C. cladosporoides*, vendar ima širše in manj septirane sekundarne ramokonidije (Bensch in sod., 2010).

Vrsto *C. tenuissimum* so izolirali iz zraka, hrane in tal. Razširjena je tudi v tropih. *C. tenuissimum* in *C. cladosporoides* sta si morfološko zelo podobni. *C. tenuissimum* tvori zelo dolge, ravne, temne konidiofore z nekoliko odebeljenimi stenami. Ima razvejane hife, ki so septirane (Bensch in sod., 2010).

Vse izolate rodu *Cladosporium* smo izolirali v prostorih v bolnišnici iz klimatskih naprav in zračnikov v laboratorijih. Vrste rodu *Cladosporium* se prenašajo po zraku, saj jih najdemo na/v sistemih povezanih s prezračevanjem in filtriranjem zraka.

Poleg rodu *Cladosporium* smo iz zračnih habitatov izolirali še glive rodu *Acrodontium* (Slika 8 in 9), *Alternaria* (Slika 10), *Aureobasidium* (Slika 3 in 4) in *Epicoccum* (Slika 16). Te glive niso značilne za bolnišnična okolja.

Rod *Acrodontium* uvrščamo v deblo *Ascomycota*, razred *Ascomycetes* (Kirk in sod., 2008). Poznan je iz gozdnih tal (Kushwaha in Agrawal, 2009) in ne predstavlja nevarnosti bolnikom. Uvrščamo ga v rizično skupino BSL-1 (de Hoog in sod., 2000).

Rod *Alternaria*, ki ga uvrščamo v deblo *Ascomycota*, razred *Dothideomycetes*, podrazred *Pleosporomycetidae*, red *Pleosporales*, družino *Pleosporaceae* (Kirk in sod., 2008), je prav tako zračnega izvora. Glive rodu *Alternaria* so večinoma rastlinski patogeni. Pri človeku lahko povzročajo astmo (Murai in sod., 2012). Največkrat okužijo ljudi, ki imajo AIDS. So ubikvitarni organizmi in so prisotni povsod. Izolirali so jih iz vode, tal, v gospodinjstvih (Kirk in sod., 2008). Rod uvrščamo v rizično skupino BSL-1 (de Hoog in sod., 2000).

Rod *Aureobasidium* uvrščamo v deblo *Ascomycota*, razred *Dothideomycetes*, podrazred *Dothideomycetidae*, red *Dothideales*, družino *Dothioraceae* (Kirk in sod., 2008). Dimorfno glivo *Aureobasidium pullulans* so izolirali iz tal, vode in rastlinskih površin. Je rastlinski patogen, napada jabolka, grozdje, kumare, zelje. Pri imunsko oslabljenih bolnikih povzroča pnevmonitis (Chi in sod., 2009). Glivo uvrščamo v rizično skupino BSL-1 (de Hoog in sod., 2000).

Rod *Epicoccum* uvrščamo v deblo *Ascomycota*, razred *Ascomycetes* (Kirk in sod., 2008). Vrsta *E. nigrum* je rastlinski patogen. Izolirali so jo iz tal, vode in rastlin. Ne povzroča bolezni pri človeku (Pritchard in Muir, 1987) in jo zato uvrščamo v BSL-1 (de Hoog in sod., 2000).

Z namenom primerjave z zračnimi habitatami smo v bolnišnici vzorčili tudi z vodo povezane habitate, saj je aktivna rast gliv načeloma pogojena s prisotnostjo visoke vlage. Izolirali smo

druge glive, kot iz zraka, in sicer filamentozne, npr. *Aspergillus fumigatus* ter kvasovke *C. albicans*, *C. inconspicua* in črno polimorfno kvasovko *Exophiala dermatitidis*, katere prisotnost v bolnišničnem okolju nas je tudi najbolj zanimala.

Iz vseh 9 vzorcev v z vodo povezanih habitatih smo izolirali le en izolat vrste *E. dermatitidis* (Slika 7), in sicer iz izlivnika na oddelku 100. V Kliniki Golnik se zdravijo bolniki, ki imajo cistično fibrozo, vendar se le-ti ne zdravijo na oddelku 100, kjer smo izolirali glivo *E. dermatitidis*, zato le-ti bolniki ne bodo pršli v stik z izolirano glivo.

Črno pigmentirana kvasovka *E. dermatitidis* je nizko virulenčna in se šteje za neškodljivo prebivalco pljuč bolnikov s cistično fibrozo (Kondori in sod., 2011). Bakterija *Pseudomonas aeruginosa* ter glive *C. albicans*, *A. fumigatus* in *E. dermatitidis* so pogosti kolonizatorji izmečkov bolnikov s cistično fibrozo (Horré in sod., 2004).

Kvasovka *E. dermatitidis* se pojavlja v neposredni bližini ljudi (kopalnicah in parnih kopelih) (Horré in sod., 2004).

V nasprotju z glivo *A. fumigatus* se *E. dermatitidis* pojavlja izključno v vlažnih okoljih (Horré in sod., 2004). Fakultativne patogene glive *C. albicans* in *A. fumigatus* so pogosto prisotne v respiratornem traktu, vendar pri zdravih ljudeh ne povzročajo glivnih okužb, medtem ko so v primeru zmanjšane imunske odpornosti okužbe možne. Okužbe s kvasovko *C. albicans* so endogene, saj je le-ta prisotna v respiratornem traktu. Okužbe z glivo *A. fumigatus* so eksogene - ljudje se okužijo z vdihovanjem konidijev iz zraka. S tema dvema glivama so bolniki neprestano v stiku. Okužba s črno kvasovko *E. dermatitidis* je neobičajna, saj te kvasovke niso povsod prisotne, v primerjavi s *C. albicans* in *A. fumigatus*, ki sta bodisi v bolniku ali v okolju. Poleg imunološkega stanja bolnika, je tveganje za nastanek okužbe lahko odvisno tudi od vrste stika med bolnikom in glivo ter od glivne mase (Horré in sod., 2004).

Eden od habitatov z ustreznimi ekološkimi parametri, kot so visoka vlaga in primerna temperatura, so kopalnice. Vzorčili smo 4 bolnišnične kopalnice in jih primerjali z izsledki vzorčenja 4 domačih kopalnic. V bolnišničnih kopalnicah smo izolirali glivo *A. fumigatus* in kvasovko *C. albicans* (Preglednica 8). V domačih kopalnicah ju nismo našli, izolirali pa smo glivo *Fusarium dimerum* (Sliki 17 in 18), ter kvasovki *C. parapsilosis* in *E. dermatitidis* (Preglednica 9). Bolnišnične kopalnice so najverjetneje bolj intenzivno očiščene, saj se uporabljajo drugačna čistila, kot v domačih okoljih. Bolnišnične kopalnice naj bi bile manj izpostavljene vnosu različnih gliv, ohranijo pa se le tiste najbolj rezistentne na čistila oz. bolnišnični sevi.

Izolirana gliva *Fusarium dimerum*, je pomemben človeški patogen. Vrsto *F. dimerum* uvrščamo v deblo *Ascomycota*, razred *Sordariomycetes*, podrazred *Hypocreomycetidae*, red *Hypocreales*, družino *Nectriaceae*, rod *Fusarium*. Poznana je iz tal in iz rastlinskih površin, citrusov, iz človeške roženice. Prav tako so jo izolirali pri imunsko oslabljenih bolnikih in iz vodovodne vode v bolnišnicah. Povzroča mikoze in keratitis pri ljudeh in je pomemben človeški patogen (Schroers in sod., 2009). Uvrščamo jo v rizično skupino BSL-1 (CBS - KNAW Biodiversity Fungal Centre).

Posebno pozornost je potrebno nameniti glivam rodu *Aspergillus* (Slika 11). Veliko izolatov tega rodu smo izolirali iz zračnih in vodnih habitatov v prostorih Klinike Golnik. Treba je ukrepati, da bi se frekvenca pojavnosti gliv *A. fumigatus* zmanjšala. Večjo pozornost bi morali posvečati čiščenju klimatskih naprav, vodnih in kavnih avtomatov, tušev, odtokov v bolniških sobah. Vrsti *A. flavus* in *A. versicolor* sta bili prisotni samo v zračnih habitatih.

Glivo *Aspergillus fumigatus* smo detektirali tudi na javno dostopnih avtomatih, kot sta kavni in vodni avtomat, osamili pa smo tudi en izolat iz pomivalnega stroja za dezinfekcijo. Iz kavnega avtomata smo osamili tudi kvasovko *C. albicans*.

Predvsem glive rodu *Aspergillus* ogrožajo imunsko oslABLJENE bolnike, saj povzročajo aspergiloze, ki so lahko smrtno nevarne. Imunsko oslABLJENI bolniki lahko pridobijo aspergilozo kot eksogeno okužbo v domačem ali bolnišničnem okolju, kar nakazuje, da je zelo pomemben dejavnik za razvoj invazivne aspergiloze bolnikovo okolje (Morris in sod., 2000). Za glivnimi okužbami pljuč, ki jih povzročajo vrste rodu *Aspergillus*, pogosto zbole vajo bolniki po presaditvi organov. Smrtnost je v tem primeru lahko zelo visoka, kar 95 - 100 % (Rainer in sod., 2001). Najpogostejši povzročitelj aspergiloz je *A. fumigatus* (Rainer in sod., 2001). Meril ali normativov za najvišje dovoljene vrednosti spor v bolnišnične okolju *Aspergillus* spp. ni (Matos in Kavčič, 2010).

Prisotnost glive *A. fumigatus* v bolniških kopalnicah in v rutinsko nekontroliranih prostorih Klinike Golnik je očitna. Večjo pozornost je potrebno nameniti potencialnim virom glive *A. fumigatus*. To so klimatske naprave, zračniki, vlaga, prah, bolnišnična oprema. Bolniki lahko pridejo v bolnišnico s sporami *A. fumigatus*, saj je lahko vir teh spor bolnikovo domače okolje. Ključnega pomena je zagotavljanje ustreznega bivalnega okolja za bolnike in preprečiti možnost nastanka okužb (Morris in sod., 2000).

Zanimala nas je tudi povezava med glivami, ki se nahajajo v različnih delih bolnišnice in med izmečki bolnikov, zato smo vzorčili izmečke 36-ih bolnikov (Preglednica 10). Bolniki so bili naključno izbrani, podatkov o boleznih, za katerimi so se zdravili, nimamo. Označeni so bili s številkami. Iz izmečkov, ki smo jih inkubirali na ploščah z antibiotikom pri 37 °C, smo izolirali izključno kvasovke rodu *Candida*. Izmed izmečkov 36-ih bolnikov smo izolirali kvasovke rodu *Candida* samo pri 16 bolnikih, in sicer pri 14 bolnikih vrsto *C. albicans*, pri enem bolniku vrsto *C. glabrata* in enem bolniku vrsto *K. bovina* (Slika 2). Najverjetneje je prisotnost kvasovk rodu *Candida* pri bolnikih posledica zdravljenja s širokospektralnimi antibiotiki, nesaniiranega zobovja, prisotnost zobnih protez in pomankljive ustne higijene.

Kvasovka *C. albicans* je normalni komezal človeka, in sicer jo najdemo na koži, v izmečku, na sluznici prebavil, ženskih spolovilih (Pfaller, 1996). Kvasovke iz rodu *Candida* so pomembni bolnišnični patogeni, vendar je o epidemiologiji le-teh malo znanega (Vazquez in sod., 1998). Največkrat povzročajo kandidoze pri imunsko oslABLJENIH bolnikih. Domneve, da

obstaja povezanost med glivami v prostorih bolnišnice in med izmečki bolnikov, nismo potrdili. Poleg kvasovke *C. albicans*, smo izolirali tudi kvasovko *K. bovina*, ki jo prav tako uvrščamo v deblo *Ascomycota*, poddeblo *Saccharomycotina*, razred *Saccharomycetes*, red *Saccharomycetales*, družino *Saccharomycetaceae* (Kirk in sod., 2008). Vrsta *K. bovina* je najverjetneje obligatni saprofit toplokrvnih živali. Producira psevdomicelij. Izolirali so jo iz nosu in trebušne votline ptic (golobov) in sesalcev (konjev in glodalcev). Raste pri 37 °C. Zelo pogosta je v ZDA in Evropi. Med vsemi vrstami rodu *Kazachstania* je samo *K. bovina* je izolirana iz človeka, kot človeški patogen (Kurtzman in sod., 2011).

Rezultati naloge nakazujejo, da bolnišnično okolje favorizira obstoj oportuno patogenih gliv, predvsem vrste plesni *Aspergillus fumigatus* ter kvasovke *Candida albicans*.

5.2 SKLEPI

Z diplomsko nalogo smo dokazali prisotnost glivnih vrst, tako filamentoznih gliv kot kvasovk. Iz rutinsko nekontroliranih prostorov bolnišnice smo izolirali in identificirali 45 glivnih vrst, od tega 7 kvasovk in 38 filamentoznih gliv.

V rutinsko nekontroliranih prostorih Klinike Golnik smo evidentirali medicinsko pomembne glive iz rodov: *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Candida* in *Exophiala* so se nahajale v rutinsko nekontroliranih prostorih Klinike Golnik. Predstavnikov rodov *Penicillium* in *Cladophialophora* nismo izolirali.

Predvsem iz klimatskih naprav in zračnikov, pa tudi iz bolnišničnih kopalnic, smo izolirali 17 sevov rodu *Aspergillus*, od tega smo 13 sevov identificirali kot vrsto *A. fumigatus*, 2 seva kot vrsto *A. flavus* ter 1 sev kot vrsto *A. versicolor*. Vse tri vrste so potencialno nevarne, saj jih uvrščamo v rizično skupino BSL-2.

Iz klimatskih naprav smo identificirali 9 sevov rodu *Cladosporium*, ki smo jih na podlagi dela zaporedja gena, ki kodira akin, uvrstili v naslednje vrste: *C. pseudocladosporoides* (3x), *C. halotolerans* (3x), *C. cladosporoides* (1x), *C. tenuissimum* (1x) in *C. bruhnei* (1x). Izmed njih sta le vrsti *C. cladosporioides* in *C. bruhnei* medicinsko pomembni.

Pojavljale so se tudi glive rodov: *Acrodontium* (1x), *Alternaria* (3x), *Aureobasidium* (1x), *Epicoccum* (1x) in *Fusarium* (1x).

Iz bolnišničnih kopalnic smo izolirali druge vrste gliv, kot iz domačih kopalnic.

Hipoteze, da obstaja povezava med glivami, ki se nahajajo na različnih mestih v bolnišnici in v izmečkih bolnikov, nismo potrdili.

Iz izmečkov 36 bolnikov z različnimi respiratornimi boleznimi smo pri 45 % bolnikov izolirali kvasovke rodu *Candida*, vrsto *C. albicans*, *C. glabrata*, *K. bovina*. Vrsto *C. albicans* smo izolirali tudi iz treh od štirih bolnišničnih kopalnic. Iste vrste kvasovk smo detektirali tudi v bolnišničnih sobah in domačih kopalnicah.

Dokazali smo prisotnost glive vrste *Exophiala dermatitidis*, vendar smo jo iz bolnišničnega okolja v nasprotju s pričakovanji izolirali le enkrat, in sicer iz sanitarnega izlivnika.

6 POVZETEK

Okužbe, ki jih povzročajo glive so oportunistične in za njimi zbolevajo zlasti imunsko oslabljeni, težko bolni in hospitalizirani bolniki z resnimi osnovnimi okužbami. Glavni razlogi za povečanje števila glivičnih okužb v bolnišnicah so vse večja populacija bolnikov z večjim tveganjem za nastanek teh okužb.

V medicini so najpomembnejše kvasovke iz rodu *Candida* in veljajo za najpogostejše povzročitelje oportunističnih okužb. Najpogostejša med njimi je *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*. Kvasovke skupaj z drugimi mikroorganizmi sestavljajo normalno človeško floro, vendar ob porušitvi ravnovesja z glivami znotraj človeškega organizma lahko pride do obolenja.

Vrsta *A. fumigatus* je postala v zadnjem desetletju najpogostejši povzročitelj invazivne aspergiloze pri imunsko oslabljenih bolnikih. Povzroča širok spekter bolezenskih stanj, ki jih skupno imenujemo aspergiloze. Aspergiloze so vzrok za visoko stopnjo smrtnosti pri imunsko oslabljenih bolnikih. Bolniki se največkrat okužijo z vdihovanjem spor.

V Kliniki Golnik ležijo imunsko oslabljeni bolniki. V bolnišnicah, kjer se zdravijo bolniki z respiratornimi boleznimi, predstavljajo glive z zračnimi spori enega od ključnih dejavnikov tveganja. Večina gliv je ubikvitarnih, naselijo se lahko že na neznatnem organskem materialu oz. so oligotrofne. Cilj naloge je bil preveriti prisotnost gliv (plesni in kvasovk) v Kliniki Golnik. V okviru diplomske naloge je potekalo vzorčenje naslednjih habitatov, kjer so se pojavljale glive, izbranih večinoma na račun visoke zračne vlage, oz. koncentriranja zračnih delcev: klimatske naprave, zračniki, vodne armature, pomivalna korita, vodni ter kavni avtomati, odtoki tušev in umivalnikov, fuge med ploščicami, notranjost pomivalnih strojev. Tovrstni habitatni sicer niso rutinsko testirani na prisotnost gliv. V namen primerjave bolnišničnega okolja z domačim smo preverili prisotnost gliv v domačih kopalnicah. Obenem pa smo povzorčili izmečke imunsko oslabljenih bolnikov v Kliniki Golnik.

Pri izolaciji smo se osredotočili na temno pigmentirane glive. Tu uvrščamo tudi enega največjih in najbolj heterogenih askomicetnih rodov, rod *Cladosporium*. Prav tako smo se osredotočili na črne kvasovke rodu *Exophiala*. Črne kvasovke se pred neprijetnimi vplivi okolja zaščitijo s pomočjo sinteze zaščitnega faktorja melanina, ki je njihova najpomembnejša zaščitna snov.

Brise smo nanesti na gojišče MEA s kloramfenikolom in inkubirali pri 37 °C. Po 7 dneh smo izolirali čiste kulture in jih nanesti na nove plošče z gojiščem MEA in jih inkubirali pri 37°C. Nato smo morfološko opisali kolonije, izolirali genomsko DNA, pomnožili odsek regije notranjih distančnikov 1 in 2 (ITS rDNA) in določili rod *Cladosporium*. Vrste rodu *Cladosporium* smo določili na podlagi zaporedja, ki kodira aktin. Za identifikacijo kvasovk do vrste smo pomnožili odsek regije notranjih distančnikov 1 in 2 (LSU rDNA).

V celotni raziskavi smo izolirali 45 sevov. Devet sevov smo uvrstili v rod *Cladosporium*. Vse seve rodu *Cladosporium* smo izolirali iz prostorov Klinike Golnik. Iz bolnišničnih sob, bolnišničnih kopalnic, domačih kopalnic, izmečkov bolnikov gliv rodu *Cladosporium* nismo izolirali.

Izolirali smo 23 sevov rodu *Candida*, ki smo jih določili na podlagi LSU rDNA v naslednje: *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. inconspicua*. Izolirali smo jih v bolnišničnih sobah, domačih kopalnicah ter iz izmečkov bolnikov.

Dva izolata smo identificirali kot vrsto *E. dermatitidis*.

Na podlagi LSU rDNA zaporedja smo identificirali 1 izolat kot vrsto *E. dermatitidis* (EXF-6942). Izolirali smo jo iz sanitarnega izlivnika. Drugi izolat smo identificirali na podlagi ITS rDNA zaporedja kot kvasovko *E. dermatitidis* (EXF-7000), ki smo jo izolirali iz domače kopalnice.

Identificirali smo 17 izolatov rodu *Aspergillus*: *Aspergillus fumigatus* (13x), *Aspergillus flavus* (2x), *Aspergillus versicolor* (1x).

Iz klimatskih naprav in rež v prostorih bolnišnice smo izolirali predstavnike rodov gliv z zračnimi sporami, ki smo jih uvrstili v rodove: *Acrodonium*, *Aureobasidium*, *Alternaria*, *Epicoccum*. Iz domačih kopalnic smo identificirali: *C. parapsilosis* (2x), *E. dermatitidis* (1x), *Fusarium dimerum* (1x).

7 VIRI

- Abliz Paride, Fukushima Kazutaka, Takizawa Kayoko, Nishimura Kazuko. 2004. Specific Oligonucleotide Primers for Identification of *Cladophialophora carrionii*, a Causative Agent of Chromoblastomycosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 42, 1: 404-407
- Alberti C., Bouakline A., Ribaud P., Lacroix C., Rousselot P., Leblanc T., Derouin F. 2001. Relationship between environmental fungal contamination and the incidence of invasive aspergillosis in haematology patients. *Journal of Hospital Infections*, 48: 198-206
- Baily Guy G., Moore Caroline B., Essayag Sophia Mata, de Wit Stephane, Burnie James P., Denning David W. 1997. *Candida inconspicua*, a Fluconazole-Resistant Pathogen in Patients Infected with Human Immunodeficiency Virus. *Clinical Infectious Diseases*, 25: 161-163
- Beck-Sague Consuelo M., Jarvis William R. 1993. Secular Trends in the Epidemiology of Nosocomial Fungal Infections in United States, 1980-1990. *National Nosocomial Infections in the Surveillance System*, 167: 1247-1251
- Bensch K., Groenewald J. Z., Dijksterhuis J., Starink-Willemse M., Andersen B., Summerell B. A., Shin H.-D., Dugan F. M., Schroers H.-J., Braun U., Crous P. W. 2010. Species and ecological diversity within the *Cladosporium cladosporioides* complex (*Davidiellaceae*, *Capnodiales*). *Studies in Mycology*, 67: 1-94
- Bergman, M. M., Gagnon D., G. Doern V. 1998. *Pichia ohmeri* fungemia. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 30: 229-31
- Biedunkiewicz Anna, Schulz Łukasz. 2012. Fungi of the genus *Exophiala* in tap water potential etiological factors of phaeohyphomycoses. *Mikologia Lekarska*, 19, 1: 23-26

- Boekhout T., Fell J. W., O'Donnell K. 1995. Molecular systematics of some yeast-like anamorphs belonging to the Ustilaginales and Tilletiales. *Studies in Mycology*, 38: 175-183
- Brown K. B., Hyde K. D., Guest D. I. 1998. Preliminary studies on endophytic fungal communities of *Musa acuminata* species complex in Hong Kong and Australia. *Fungal Diversity*, 1: 27-51
- Calderone Richard A. 2002. *Candida* and Candidiasis. ASM Press: 451
- Carbone I., Kohn L. M. 1999. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia*, 91: 553-556
- Chakrabarti A., Singh K., Narang A., Singhi S., Batra R., Rao K. L. N., Ray P., Gopalan S., Das S., Gupta V., Gupta A. K., Bose S. M., McNeil M. M. 2001. Outbreak of *Pichia anomala* infection in the pediatric service of a tertiary-care center in Northern India. *Journal of Clinical Microbiology*, 39: 1702-1706
- Chang C. L., Kim D-S., Kim H. J., Lee C. H., Shin J. H., 2000. Acute cerebral phaeohyphomycosis due to *Wangiella dermatitidis* accompanied by cerebrospinal fluid eosinophilia. *Journal of Clinical Microbiology*, 38: 1965-1966
- Chi, Z., Wang, F., Yue L., Lui G., Zhang, T., 2009. Bioproducts from *Aureobasidium pullulans*, a biotechnologically important yeast. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 82: 793-804
- Choy, B. Y., Wong S. S., Chan T. M., Lai K. N. 2000. *Pichia ohmeri* peritonitis in a patient with CAPD: response to treatment with amphotericin (Letter). *Peritoneal Dialysis International*, 20: 91
- Clark, T. A., Slavinski S. A., Morgan J., Lott T., Arthington-Skaggs B. A., Brandt M. E., Webb R. M., Currier M., Flowers R. H., Fridkin S. K., Hajjeh R. A. 2004. Epidemiologic

and molecular characterization of an outbreak of *Candida parapsilosis* bloodstream infections in a community hospital. *Journal of Clinical Microbiology*, 42: 4468-4472

Coleman D. C, Rinaldi M. G, Haynes K. A, Rex J. H, Summerbell R. C, Anaissie E. J, Li A., Sullivan D. J. 1998. Importance of *Candida* species other than *Candida albicans* as opportunistic pathogens. *Medical Mycology : Official Publication of the International Society for Human and Animal Mycology*, 36: 156-165

Crous P. W., Schoch C. L. , Hyde K. D., Wood A. R., Gueidan C., de Hoog G. S., Groenewald J. Z. 2009. Phylogenetic lineages in the *Capnodiales*. *Studies in Mycology*, 64: 17-47

Curtis L., Cali S., Conroy L., Baker K., Ou C. H., Hershov R., Norlock-Cruz F., Sheff P. 2005. *Aspergillus* surveillance project at large tertiary-care hospital. *Journal of Hospital Infections*, 59, 33: 188-196

D'enfert C., Hube B. 2007. *Candida* Comparative and Functional Genomics

David J. C. 1997. A contribution to the systematics of *Cladosporium*. Revision of the fungi previously referred to *Heterosporium*. *Mycological Papers*, 172: 1-157

de Hoog G. S., Guarro J., Gené J., Figueras M. J. 2000. Atlas of clinical Fungi 2th Edition

Dixon D. M., Polak-Wyss A. 1991. The medically important dematiaceous fungi and their identification. *Mycoses*, 34: 1-18

Engelhart Steffen, Loock Annette, Skutlarek Dirk, Sagunski Helmut, Lommel Annette, Färber Harald, Exnerb Martin. 2002. Occurrence of Toxigenic *Aspergillus versicolor* Isolates and Sterigmatocystin in Carpet Dust from Damp Indoor Environments. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 3886-3890

- Epstein J. B. 2003. Diagnosis and treatment of oropharyngeal candidiasis. *Oral & Maxillofacial Surgery Clinics of North America*, 15: 91-102
- Epstein J. B., Freilich M. M., Le N. D. 1993. Risk factors for oropharyngeal candidiasis in patients who receive radiation therapy for malignant conditions of the head and neck. *Oral surgery, oral medicine, and oral pathology*, 76: 169-174
- Fell, J. W., Meyer S. A.. 1967. Systematics of yeast species in the *Candida parapsilosis* group. *Mycopathologia*, 32, 3: 177-193
- Ganter F. Philip, William T. Starmer, Lachance Marc-Andre, Phaff Herman J. 1986. Yeast communities from host plants and associated *Drosophila* in southern arizona: new isolations and analysis of the relative importance of hosts and vectors on community composition. *Oecologia*, 70, 3: 386-392
- Gibson A. M., Baranyi J., Pitt M. J., Eyles M. J., Roberts T. A. 1994. Predicting fungal growth: the effect of water activity on *Aspergillus flavus* and related species. *International Journal of Food Microbiology*, 23: 419-431
- Hamayun Muhammad, Khan Sumera Afzal, Ahmad Nadeem, Tang Dong-Sheng, Kang Sang-Mo, Na Chae-In, Sohn Eun-Young, Hwang Young-Hyun, Shin Dong-Hyunin LeeByung-Hyun. 2009. *Cladosporium sphaerospermum* as a new plant growth-promoting endophyte from the roots of *Glycine max* (L.) Merr. *World Journal of Microbiology Biotechnology*, 25: 627-632
- Hedayati M. T., Mayahi S., Aghil R., Goharimoghadam K. 2005. Airborne fungi in indoor and outdoor of asthmatic patients' home, living in the city of Sari. *Iranian Journal of Allergy, Asthma and Immunology*, 4: 189-191

- Hocking A. D., Miscamble B. F., Pitt J. 1994. Water relations of *Alternaria alternata*, *Cladosporium cladosporioides*, *Cladosporium sphaerospermum*, *Curvularia lunata* and *Curvularia pallescens*. *Mycological Research*, 98: 91-94
- Horré R., Schaala K. P., Siekmeiera R., Sterzik B., de Hoog G. S., Schnitzler N. 2004. Isolation of Fungi, Especially *Exophiala dermatitidis*, in Patients Suffering from Cystic Fibrosis. *Clinical Investigations, Respiration*, 71:360-366
- Ikeda Reiko, Sugita Takashi, Shinoda Takako. 2000. Serological Relationships of *Cryptococcus* spp.: Distribution of Antigenic Factors in *Cryptococcus* and Intraspecies Diversity. *Journal of Clinical Microbiology*, 38, 11: 4021–4025
- Kalenic, S., Jandrljic M., Vegar V., Zuech N., Sekulic A., Mlinaric-Missoni E. 2001. *Hansenula anomala* outbreak at a surgical intensive care unit: A search for risk factors. *European Journal of Epidemiology*, 17: 491-496
- Kaur R., Domergue R., Zupancic M. L., Cormack, B. P. 2005. A yeast by any other name: *Candida glabrata* and its interaction with the host. *Current Opinion in Microbiology*, 8: 378-384
- Kim J., Sudbery P. 2011. *Candida albicans*, a major human fungal pathogen. *The Journal of Microbiology*, 49: 171-177
- Kirk Paul M., Cannon Paul F., Minter David W., Stalpers Joost A. 2008. *Dictionary of the Fungi* 10th Edition.
- Klich M.A. 2007. *Aspergillus flavus*: the major producer of aflatoxin. *Molecular Plant Pathology*, 8: 713–722
- Kondori N., Gilljam M., Lindblad A., Jönsson B., Moore E. R., Wennerås C. 2011. High rate of *Exophiala dermatitidis* recovery in the airways of patients with cystic fibrosis is associated with pancreatic insufficiency. *The Journal of Microbiology*, 49:1004-1009

- Kordbacheh P., Zaini F., Kamali P., Ansari K., Safara M. 2005. Study on the Sources of Nosocomial Fungal Infections at Intensive Care Unit and Transplant Wards at a Teaching Hospital in Tehran. *Iranian Journal of Public Health*, 34: 1-8
- Kurtzman C. P., Fell J. W., Boekhout T. 1998. *The yeasts a taxonomic study* 4th Edition
- Kurtzman C. P., Fell J. W., Boekhout T. 2007. *The yeasts a taxonomic study* 5th Edition
- 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*, 5th edn. Elsevier, 87–110
- Kushwaha R. K. S., Agrawal S. C. 2009. *Mycoses*, 20, 3: 97-100
- Latgé J. P. 1999. *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 12, 2: 310-350
- Leigh Johnston C. 2008. Identification of *Penicillium* species in the South African litchi export chain. *Magister Scientiae*: 69
- Levitz S. M. 1991. The ecology of *Cryptococcus neoformans* and the epidemiology of cryptococcosis. *Reviews of Infectious Disease*, 13, 6: 1163-1169
- Majoros Laszlo, 2005; Identification *Candida inconspicua* clinical isolates and testing of fluconazole, amphotericin B, flucytosine and caspofungin susceptibility.
- Manfredini L., Garaventa A., Castagnola E., Viscoli C., Moroni C., Dini G., Gmanno Garre M. L., Manno G., Savioli C., Kotitsa Z. 1995. Fungal infections in pediatric oncology. *Pediatria Medica E Chirurgica*, 17: 435-441

- Matos T. 2002. Oportunistične glive. V: Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo. Gubina M., Ihan A. (ur.). Ljubljana: Medicinski razgledi: 481-499
- Matos Tadeja, Kavčič Tanja. 2010. Vrstna raznolikost in koncentracija plesni v zraku bolnišničnega in zunanjskega okolja. Zdravniški vestnik, 79: 117-126.
- Matos T., de Hoog G. S., de Boer A.G., de Crom I., Haase G. 2002. High prevalence of the neurotropic *Exophiala dermatitidis* and related oligotrophic black yeasts in sauna facilities. Mycoses, 45: 373–377
- Matos T., Haase G., Gerrits van den Ende A. H., de Hoog G. S. 2003. Molecular diversity of oligotrophic and neurotropic members of the black yeast genus *Exophiala*, with accent on *E. dermatitidis*. Antonie Van Leeuwenhoek, 83: 293-303
- Metwally L., Hogg G., Coyle G. P. V., Hay R. J., Hedderwick S., McCloskey B., O'Neill H. J., Ong G. M., Thompson G., Webb C. H. In McMullan R. 2007. Rapid differentiation between fluconazole-sensitive and -resistant species of *Candida* directly from positive blood-culture bottles by real-time PCR. Journal of Medical Microbiology, 56, 7: 964-970
- Morris G., Kokki M. H., Anderson K., Richardson M. D. 2000. Sampling of *Aspergillus* spores in air. Journal of Hospital Infections, 44, 2: 81-92
- Murai H., Qi H., Choudhury B., Wild J., Dharajiya N., Vaidya S., Kalita A., Basci A., Corry D., Kurosky A., Brasier A., Boldogh I., Sur S. 2012. *Alternaria* – Induced release of IL – 18 from Damaged Airway Epithelial Cells: An NF – κ B Dependent Mechanism of Th2 Differentiation?. Plos One, 7,2
- Muzyka B. C., Glick M. 1995. A review of oral fungal infections and appropriate therapy. The Journal of the American Dental Association, 126: 63-72

- Nachman S., Alpan, O., Malowitz, R., Spitzer, E. D. 1996. Catheter-associated fungemia due to *Wangiella (Exophiala) dermatitidis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 34: 1011–1013
- Naglik Julian R., Moyes David L., Wächtler Betty, Hube Bernhard. 2011. *Candida albicans* interactions with epithelial cells and mucosal immunity. *Microbes and Infection*, 13: 963-976
- Ostrosky-Zeichner L. 2004. Prophylaxis or preemptive therapy of invasive candidiasis in the intensive care unit. *Critical Care Medicine*, 32, 12: 2552-2553
- Page Brent T., Shields Christine E., Merz William G., Kurtzman Cletus P. 2006. Rapid Identification of Ascomycetous Yeasts from Clinical Specimens by a Molecular Method Based on Flow Cytometry and Comparison with Identifications from Phenotypic Assays. *Journal of Clinical Microbiology*, 44, 9: 3167-3171
- Panaccione Daniel G., Coyle Christine M. 2005. Abundant Respirable Ergot Alkaloids from the Common Airborne Fungus *Aspergillus fumigatus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 3106-3111
- Perdelli F., Cristina M. L., Sartini M., Spagnolo A. M., Dallera M., Ottria G., Lombardi R., Grimaldi M., Orlando P. 2006. Fungal Contamination in Hospital Environments. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 27: 44-47
- Pfaller M. A. 1996. Nosocomial candidiasis: Emerging species, reservoirs, and modes of transmission. *Clinical Infectious Disease* 22, 2,: 89-94
- Pfaller M. A., Diekema, D. J. 2004. Twelve years of fluconazole in clinical practice: global trends in species distribution and fluconazole susceptibility of bloodstream isolates of *Candida*. *Clinical Microbiology and Infection*, 10: 11-23

- Porteous N. B., Grooters A. M. , Redding S. W., Thompson E. H., Rinaldi M. G., de Hoog G. S., Sutton D. A. 2003. Identification of *Exophiala mesophila* Isolated from Treated Dental Unit Waterlines. *Journal Clinical Microbiology*, 41, 8: 3885-3889
- Pritchard R. C., Muir D. B. 1987. Black fungi: a survey of dematiaceous hyphomycetes from clinical specimens identified over a five year period in a reference laboratory. *Pathology*, 19: 281-284
- Puerto, J. L., Garcia-Martos P., Saldarreaga A., Ruiz-Aragon J., Garcia-Agudo R., Aoufi. S. 2002. First report of urinary tract infection due to *Pichia ohmeri*. *European Journal Clinical of Microbiology and Infectious Disease*, 21: 630-631
- Rainer J., Peintner U., Pöder R., 2001. Biodiversity and concentration of airborne fungi in a hospital environment. *Mycopathologia*, 149: 87-97
- Raper C. A., Raper J. R., Miller J. E. 1972. Genetic analysis of the life cycle of *Agraricus bisporus*. *Mycologia*, 64: 1088-1117
- Richardson M. D., Warnock D. W. 2003. *Fungal infection: Diagnosis and menagment*. 3th ed. Oxford, Blackwell Publishing: 366
- Ruchel R., Richard U. 1999. Pathogenesis and clinical presentation of aspergillosis. V: *Aspergillus fumigatus* biology, clinical aspects and molecular approaches to pathogenicity. Brakhage A. A., Jahn B., Schmidt A. (eds.). Basel, Karger: 21-43
- Rutala William A., Weber David, in the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC). 2008. *Guideline for Disinfection and Sterilization in Healthcare Facilities*, CDC: 158
- Saiman L., Ludington E., Dawson J. D., Patterson J. E., Rangel-Frausto S., Wiblin R. T., Blumberg H. M., Pfaller M., Rinaldi M., Edwards J. E., Wenzel R. P., in Jarvis W.

2001. Risk factors for *Candida* species colonization of neonatal intensive care unit patients. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 20:1119-1124

Scheidegger K. A. in Payne G. A. 2003. Unlocking the secrets behind secondary metabolism: a review of *Aspergillus flavus* from pathogenicity to functional genomics. *Journal of Toxicology*, 22: 423-459

Schroers Hans-Josef, O'Donnell Kerry, Lamprecht Sandra C., Kammeyer Patricia L., Johnson Stuart, Sutton Deanna A., Rinaldi Michael G., Geiser David M., Summerbell Richard C. 2009. Taxonomy and phylogeny of the *Fusarium dimerum* species group. *Mycologia*, 101, 1: 44-70

Schubert K., Groenewald J. Z., Braun U., Dijksterhuis J., Starink M., Hill C. F., Zalar P., de Hoog G. S., Crous P. W. 2007. Biodiversity in the *Cladosporium herbarum* complex (*Davidiellaceae*, *Capnodiales*), with standardisation of methods for *Cladosporium* taxonomy and diagnostics. *Studies in Mycology*, 58: 105-156

Shelton B. G., Kirkland K. H., Flanders W. D., Morris G. K. 2002. Profiles of airborne fungi in buildings and outdoor environments in the United States. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 4: 1743-1753

Shi C., Miller J. D. 2011. Characterization of the 41 kDa allergen Asp v 13, a subtilisin-like serine protease from *Aspergillus versicolor*. *Molecular Immunology*, 48: 1827-1834

Siegel J.D., Rhinehart E., Jackson M., Chiarello L., in the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee. 2007. Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings, CDC: 225

Silva Daiani M., Batista Luís R., Rezende Elisângela F., Fungaro Maria Helena P., Sartori Daniele, Alves Eduardo. 2011. Identification of fungi of the genus *Aspergillus* section nigri using polyphasic taxonomy. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42: 761-773

- Snaydman D. R. 2003. Shifting patterns in the epidemiology of nosocomial *Candida* infections. *Chest*, 123: 500-503
- Sodja Eva, Matos Tadeja, Simčič Saša. 2009. Mikrobiološka diagnostika invazivne kandidoze. *Zdravniški Vestnik*, 78: 321-327
- Sudhadham M. 2009. *Exophiala dermatitidis*: an opportunistic pathogen emerging from the tropical rainforest. Doctoral Thesis. Amsterdam, Faculteit der Natuurwetenschappen: 129
- Supparatipinyo K., Khamwan C., Baosoung V., Sinsanthana T., Nelson K. E. 1994. Disseminated *Penicillium marneffei* in Southeast Asia. *The Lancet*, 344: 110-113
- Trofa David, Gácsér Attilain, Nosanchuk Joshua D. 2008. *Candida parapsilosis* an Emerging fungal pathogen. *Clinical Microbiology*, 21: 606-625
- Torres-Rodriguez J. M., Madrenys-Brunet N., Siddat M., Lopez-Jodra O., Jimenez T. 1998. *Aspergillus versicolor* as cause of onychomycosis : report of 12 cases and susceptibility testing to antifungal drugs. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 11: 25-31
- Vazquez J. A., Dembry L. M., Sanchez V., Vasquez M. A., Sobel J. D., Dmuchowski C., Zervos M. J. 1998. Nosocomial *Candida glabrata* colonization an epidemiologic study. *Journal of Clinical Microbiology*, 36, 2: 421-426
- Villa-Carvajal M., Querol A., Belloch C. 2006. Identification of species in the genus *Pichia* by restriction of the internal transcribed spacers (ITS1 and ITS2) and the 5.8S ribosomal DNA gene, Identification of *Pichia* species by 5.8S-ITS rDNA RFLP. *Antonie van Leeuwenhoek*, 90, 2: 171-181

- Voss A., Abrahamsen T. G., Verweij P. E. 2002. Contamination of hospital water with *Aspergillus fumigatus* and other molds. *Clinical Infectious Diseases*, 34, 8: 1159-1160
- Warris A., Klaassen C. H. W., Meis J. F. G. M., de Ruiter M. T., de Valk H. A., Abrahamsen T. G., Gaustad P., Verweij P. E. 2003. Molecular epidemiology of *Aspergillus fumigatus* isolates recovered from water, air, and patients show two clusters of genetically distinct strains. *Journal of Clinical Microbiology* 41, 9: 4101-4106
- Warris A., Voss A., Verweij P. E. 2001. Hospital sources of *Aspergillus* species. New routes of transmission? *Revista Iberoamericana de Micologia* 18, 4: 156-162
- Weems J. J. Jr. 1992. *Candida parapsilosis*: epidemiology, pathogenicity, clinical manifestations, and antimicrobial susceptibility. *Clinical Infectious Disease*, 14: 756-766
- White T. J., Bruns T., Lee S., Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. V: PCR protocols a guide to methods and applications. Innis M. A., Gelfand D. H., Sninsky J. J., White T. J. (eds) London Academic Press: 315-322
- Wilson D. E., Chosewood L. C. 2009. Biosafety Microbiological and Biomedical Laboratories 5th Edition.
- Zalar P., de Hoog G. S., Schroers H.-J., Crous P. W., Groenewald J. Z., Gunde-Cimerman N. 2007. Phylogeny and ecology of the ubiquitous saprobe *Cladosporium sphaerospermum*, with descriptions of seven new species from hypersaline environments. *Studie in Mycology*, 58: 157-183
- Zalar P., Novak M., de Hoog G. S., Gunde-Cimerman N. 2011. Dishwashers-a man-made ecological niche accommodating human opportunistic fungal pathogens. *Elsevier, Fungal Biology*, 30: 1-2

Zhao Wei, Panepinto John C. , Fortwendel Jarrod R., Fox Lauren, Oliver Brian G., Askew David S. in Rhodes Judith C. 2006. Deletion of the Regulatory Subunit of Protein Kinase A in *Aspergillus fumigatus* Alters Morphology, Sensitivity to Oxidative Damage, and Virulence. *Infection and Immunity*, 74: 4865-4874

Zupančič Slavec Zvonka. 2008. Bolnišnica Golnik klinični oddelek za pljučnebolezni in alergijo Ob desetletju samostojnosti (1998-2008), Golnik, Bolnišnica Golnik – KOPA: 273

CBS – KNAW Biodiversity Fungal Centre

<http://www.cbs.knaw.nl/Collections/BioloMICS.aspx?Table=CBS%20strain%20database&Rec=14662&Fields=All> (11. nov 2012)

CBS – KNAW Biodiversity Fungal Centre

<http://www.cbs.knaw.nl/Collections/BioloMICS.aspx?Table=CBSstrain%20database&Rec=70003&Fields=All> (11. nov. 2012)

Klinika Golnik

<http://www.klinika-golnik.si/bolnisnica-golnik/> (24. dec. 2012)

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorici doc. dr. Poloni Zalar za sprejeto mentorstvo in za pomoč pri izdelavi diplomske naloge. Zahvalila bi se ji za vse nasvete in razlage, predvsem za razumevanje, podporo in dragoceni čas. Zahvalila bi se tudi Mojci Šere, ki mi je pomagala pri delu v laboratoriju in pri pisanju diplomske naloge.

Zahvalila bi se tudi somentorici dr. Viktoriji Tomič, dr. med. za pregled diplomske naloge, za vse spodbudne besede, koristne nasvete in prijaznost. Zahvaljujem se celemu oddelku LRM v Kliniki Golnik za pomoč pri izvedbi praktičnega dela diplomske naloge, predvsem Juditi Stokič ing. kem. tehnol. ter Danetu Zajcu univ. dipl. mikr., ki sta mi vedno pomagala in mi stala ob strani ter mi dajala koristne nasvete.

Zahvaljujem se tudi recenzentki doc. dr. Tadeji Matos, dr. med. za pregled diplome, koristne popravke, prijaznost in nasvete.

Hvaležna sem tudi Amelu za pomoč, potrpežljivost in podporo, ki mi jo je dajal skozi vsa študijska leta.

Iskreno se zahvaljujem svojim staršem za razumevanje, podporo in potrpežljivost skozi vsa leta študija. Pomagala sta mi v najtežjih trenutkih in me bodrila. Zahvalila bi se tudi sestri Medini, ki mi je vedno pomagala in mi stala ob strani v stresnih trenutkih študija.

PRILOGE

Priloga A 1:

Nukleotidna zaporedja ITS

Cladosporium sp. (EXF – 6923)

AAGGTAACAAGGTCTCCGTAGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTACAAGAACGCC
GGGCTTCGGCCTGGTTATTCATAACCCTTTGTTGTCCGACTCTGTTGCCTCCGGG
CGACCCTGCCTTCGGGCGGGGGCTCCGGGTGGACACTTCAAACCTTTGCGTAACTT
TGCAGTCTGAGTAAACTTAATTAATAAACTTTTAACAACGGATCTCTTGG
TTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAA
TTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGG
CATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTACCACTCAAGCCTCGCTTGGTATTGGGCAACGC
GGTCCGCCGCGTGCCTCAAATCGTCCGGCTGGGTCTTCTGTCCCCTAAGCGTTGTG
GAAACTATTCGCTAAAGGGTGTTCGGGAGGCTACGCCGTAAAACAACCCCATTC
TAAGGTGACCTCGGATCAGGTAG

Cladosporium sp. (EXF – 6924)

TCGTAACAAGGTCTCCGTAGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTACAAGTTGACCCC
GGCCCTCGGGCCGGGATGTTTACAACCCTTTGTTGTCCGACTCTGTTGCCTCCGGG
GCGACCCTGCCTCCGGGCGGGGGCCCCGGGTGGACATTTCAAACCTTTGCGTAACT
TTTGCAGTCTGAGTAAATTTAATTAATAAACTTTCAACAACGGATCTCTT
GGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAG
AATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGG
GGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTACCACTCAAGCCTCGCTTGGTATTGGGCGAC
GCGGTCCGCCGCGCCTCAAATCGACCGGTGGGTCTTTCGTCCCCTCAGCGTTG
TGGAAACTATTCGCTAAAGGGTGCCGCGGGAGGCCACGCCGTAAAACAACCCCAT
TTCTAAGGTGACCTCGGATCAGT

C. sphaerospermum (EXF – 6925)

GTAACAAGGTCTCCGTAGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTACAAGTTGACCCCGG
CCCTCGGGCCGGGATGTTTACAACCCTTTGTTGTCCGACTCTGTTGCCTCCGGGGC
GACCCTGCCTCCGGGCGGGGGCCCCGGGTGGACATTTCAAACCTTTGCGTAACTTT
GCAGTCTGAGTAAATTTAATTAATAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGT
TCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAA
TCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGC
ATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTACCACTCAAGCCTCGCTTGGTATTGGGCGACGCG

GTCCGCCGCGCGCCTCAAATCGACCGGCTGGGTCTTTCGTCCCCTCAGCGTTGTGG
AAACTATTCGCTAAAGGGTGCCGCGGGAGGCCACGCCGTAAAACAACCCCATTTT
TAAGGTGACCTCGGATCAGGTAG

C. sphaerospermum (EXF – 6926)

GTAACAAGGTCTCCGTAGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTACAAGTTGACCCCGG
CCCTCGGGCCGGGATGTTCAACCCCTTTGTTGTCCGACTCTGTTGCCTCCGGGGC
GACCCTGCCTCCGGGCGGGGGCCCCGGGTGGACATTTCAAACCTCTTGCGTAACTTT
GCAGTCTGAGTAAATTTAATTAATAAATTA AAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGT
TCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAAT
TCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGC
ATGCCTGTTGAGCGTCATTTCAACTCAAGCCTCGCTTGGTATTGGGCGACGCG
GTCCGCCGCGCGCCTCAAATCGACCGGCTGGGTCTTTCGTCCCCTCAGCGTTGTGG
AAACTATTCGCTAAAGGGTGCCGCGGGAGGCCACGCCGTAAAACAACCCCATTTT
TAAGGTGACCTCGGATCAGGTAG

C. cladosporoides (EXF - 6928)

GTAACAAGGTCTCCGTAGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTACAAGTGACCCCGGT
CTAACCACCGGGATGTTCAACCCCTTTGTTGTCCGACTCTGTTGCCTCCGGGGCG
ACCCTGCCTTCGGGCGGGGGCTCCGGGTGGACACTTCAAACCTCTTGCGTAACTTTG
CAGTCTGAGTAAACTTAATTAATAAATTA AAAACTTTTAACAACGGATCTCTTGGTT
CTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATT
CAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGC
ATGCCTGTTGAGCGTCATTTCAACTCAAGCCTCGCTTGGTATTGGGCAACGCG
GTCCGCCGCGTGCCTCAAATCGACCGGCTGGGTCTTCTGTCCCCTAAGCGTTGTGG
AAACTATTCGCTAAAGGGTGTTGCGGGAGGCTACGCCGTAAAACAACCCCATTTCT
AAGGTGACCTCGGATCAGGTAGG

C. cladosporoides (EXF - 6929)

GTAACAAGGTCTCCGTAGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTACAAGTGACCCCGGT
CTAACCACCGGGATGTTCAACCCCTTTGTTGTCCGACTCTGTTGCCTCCGGGGCG
ACCCTGCCTTCGGGCGGGGGCTCCGGGTGGACACTTCAAACCTCTTGCGTAACTTTG
CAGTCTGAGTAAACTTAATTAATAAATTA AAAACTTTTAACAACGGATCTCTTGGTT
CTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATT
CAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGC
ATGCCTGTTGAGCGTCATTTCAACTCAAGCCTCGCTTGGTATTGGGCAACGCG
GTCCGCCGCGTGCCTCAAATCGACCGGCTGGGTCTTCTGTCCCCTAAGCGTTGTGG
AAACTATTCGCTAAAGGGTGTTGCGGGAGGCTACGCCGTAAAACAACCCCATTTCTA
AGGTGACCTCGGATCAG

Ascomycetes sp. (EXF – 6930)

CGTAACAAGGTCTCCGTAGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTACTGAGTGAGGGCC
CTCGCGGTCCGACCTCCAACCCTTTGTCGTCCGACTCTGTTGCCTCGGGGGCGTCC
CCGGCGTTCGCGCCAGGGGCCCCCGGCGGTCCACACAACCTCTGCATCTTTGCGTCT
GAGTAAACATTAATGAAACAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGTTCTGGCAT
CGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGA
ATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTTGGTATTCCGGGGGGGCATGCCTG
TTCGAGCGTCATTACACCACTCAAGCCTGGCTTGGTATTGGGCGCCGCGCCCCGTCG
CGCGCCCTAATGTCGCGCGCCGAGTCGTCTGTCTCCGAGCGTTGTGAATCTCATTC
GCTCCTGGGGATCCAGACGGCGCGCGCCGTTAAACCTCTTTTTACAGGTGACCTCG
GATCAGTAGA

C. cucumerinum (EXF – 6931)

GTAACAAGGTCTCCGTAGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTACAAGTGACCCCCGG
CTCCGGCCGGGGATGTTTCATAACCCTTTGTTGTCCGACTCTGTTGCCTCCGGGGCG
ACCCTGCCTTTTCACGGGCGGGGGCCCCGGGTGGACACATCAAAACTCTTGCGTA
ACTTTGCAGTCTGAGTAAATTTAATTAATAAATTAAAACTTTCAACAACGGATCTC
TTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGC
AGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGG
GGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTACCACTCAAGCCTCGCTTGGTATTGGGCG
ACGCGGTCCGCCGCGCGCCTCAAATCGACCGGCTGGGTCTTCTGTCCCCTCAGCGT
TGTGGAAACTATTCGCTAAAGGGTGCCACGGGAGGCCACGCCGAAAACAAACC
CATTTCTAAGGTTGACCTCGGATCAGGTG

C. cladosporoides (EXF – 6932)

TAACAAGGTCTCCGTAGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTACAAGTGACCCCCGGTC
TAACCACCGGGATGTTTCATAACCCTTTGTTGTCCGACTCTGTTGCCTCCGGGGCGA
CCCTGCCTTCGGGCGGGGGCTCCGGGTGGACACTTCAAACCTCTTGCGTAACTTTGC
AGTCTGAGTAACTTAATTAATAAATTAAAACTTTTAACAACGGATCTCTTGTTTC
TGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTC
AGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCA
TGCCTGTTTCGAGCGTCATTTACCACTCAAGCCTCGCTTGGTATTGGGCAACGCGG
TCCGCCGCGTGCCTCAAATCGACCGGCTGGGTCTTCTGTCCCCTAAGCGTTGTGGA
AACTATTCGCTAAAGGGTGTTTCGGGAGGCTACGCCGTAAAACAACCCCATTTCTA
AGGTGACCTCGGATCAGT

C. cladosporoides (EXF – 6933)

TCGTAACAAGGTCTCCGTAGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTACAAGTGACCCCCG
GTCTAACCACCGGGATGTTTCATAACCCTTTGTTGTCCGACTCTGTTGCCTCCGGGG
CGACCCTGCCTTCGGGCGGGGGCTCCGGGTGGACACTTCAAACCTCTTGCGTAACTT
TGCAGTCTGAGTAACTTAATTAATAAATTAAAACTTTTAACAACGGATCTCTTG

TTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAA
TTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGG
CATGCCTGTTCGAGCGTCATTTCACTCAAGCCTCGCTTGGTATTGGGCAACGC
GGTCCGCCGCGTGCCTCAAATCGACCGGCTGGGTCTTCTGTCCCCTAAGCGTTGTG
GAAACTATTCGCTAAAGGGTGTTTCGGGAGGCTACGCCGTAAAACAACCCATTTC
TAAGGTGACCTCGGATCAGT

Priloga A 2:

Nukleotidna zaporedja ACT

C. bruhnei (EXF – 6923)

GTAGTCCAAAACACCCGCAACCCTCCTAGCCAGACGGCCAGCTGACAACATCTTA
GCTTCCATTGTTCGGCAGACCCCGTCACCATGGGTATGCTCTTCTCCTCCCTAACCA
CCACCGGACCCAATGTCTAACC GCAGCGCAGTATCATGATCGGTATGGGCCAGAA
GGACTCGTAAA

C. halotolerans (EXF – 6924)

CGTTTTCCGTAGTTCTCACCACCCACGCTCTTCACCCACCGGACCACTCGGCTGAC
CGCCTCTCAGCTTCCATTGTTCGGCAGACCCCGTCACCATGGGTATGCATCCTCCCC
GCGCCCGCCGCCGAGGCCACCCCGTTCTAACC GCAGCGCAGTATCATGATCGGTA
TGGGCCAGAAGGACTCGTAA

C. halotolerans (EXF – 6925)

GCGTTTTTCGTAGTTCTCACCACCCACGCTCTTCACCCACCGGACCACTCGGCTGAC
CGCCTCTCAGCTTCCATTGTTCGGCAGACCCCGTCACCATGGGTATGCATCCTCCCC
GCGCCCGCCGCCGAGGCCACCCCGTTCTAACC GCAGCGCAGTATCATGATCGGTA
TGGGCCAGAAGGACTCGTAA

C. halotolerans (EXF – 6926)

TCGTAGTTCTCACCACCCACGCTCTTCACCCACCGGACCACTCGGCTGACCGCCTC
TCAGCTTCCATTGTTCGGCAGACCCCGTCACCATGGGTATGCATCCTCCCCGCGCCC
GCCGCCGAGGCCACCCCGTTCTAACC GCAGCGCAGTATCATGATCGGTATGGGCC
AGAAGGACTCGTAA

C. pseudocladospoides (EXF – 6928)

CCCGTACCTTTTCGTAGTCTAAGACCCTGTTTCGCCCCGCGCCAGAACCCCGAGCTG
ACACCCTCTCTAGCTTCCATTGTTCGGCAGACCCCGTCACCATGGGTATGCATTCTC
CCCGCGGGCCTCCTTGTCGCGCTCATTCAAGTCTAACCCCGGCGCAGTATCATGAT
CGGTATGGGCCAGAAGCGACTCGTAAA

C. cladosporoides (EXF – 6929)

CCCAGACGTTTTCCGTAGTCTAAGACACCTGTTTCGCCCATCCCAGAATCCCGAGC
TGACACCCCTCCAGCTTCCATTGTTCGGCAGACCCCGTCACCATGGGTATGCATTC
TCCCCGCGAGCCTCCCCATCGCGCGCAGCCAGTTCTAACCCCTCCGCAGTATCATG
ATCGGTATGGGCCAGAAAGGAC

C. sphaerospermum (EXF – 6930)

GGAGCCCGTTTTTCCGGTAAGTCTGAAGACACCTGGTTTCACTCCCCACGCCGGA
TCGCTCGGGTGACTGACAACTCCATCACAGCCTCCATTGTCGGTAGACCCCGTCAC
CATGGGTATGCAGTGCTCCCAATCCGCGCTCGCCGCAGAGCAAGTTGTTTCTAAC
CTTCCGCGC

C. tenuissimum (EXF – 6931)

CTGTTTTCGTAAGTCTTTCCACAACCCTTCTCGCTGACCTGCGACAATCCACTGAC
ATCCGTTTCAGCCTCCATCGTTGGCCGACCGCGCCACCATGGGTATGCCATTACCAC
CCTCCCCCTGCAACCCTCACAATCCCTAATTCGTCTGTAGTATCATGATCGGTAT
GGGCCAGAAGGACTCGTAA

C. pseudocladospooides (EXF – 6932)

AGAAGCCGTTTTTCCGTAAGTCTAAAGACACCTGGTTTCGCCCCGCGCCAGAACCCC
GAGCTGACACCCCTCTCTAGCTTCCATTGTCGGCAGACCCCGTCACCATGGGTATG
CATTCTCCCCGCGGGCCCTCCTTGTCGCGCTCATTCAAGTCTAACCCCGGCGCAGT
ATCATGATCGGTATGGGC

C. pseudocladospooides (EXF – 6933)

AGCCGTTTTTCCGTAAGTCTAAAGACACCTGGTTTCGCCCCGCGCCAGAACCCCGAG
CTGACACCCCTCTCTAGCTTCCATTGTCGGCAGACCCCGTCACCATGGGTATGCATT
CTCCCCGCGGGGCCTCCTTGTCGCGCTCATTCAAGTCTAACCCCGGCGCAGTATCA
TGATCGGTATGGGCCAGAAGG

Priloga A 3:

Nukleotidna zaporedja LSU

C. albicans (ni EXF številke)

CGGCGAGTGAGCGGCAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGCGTCTTTGGCGTCCGAG
TTGTAATTTGAAGAAGGTATCTTTGGGCCCGGCTCTTGTCTATGTTCCCTTGGAACA
GGACGTCACAGAGGGTGAGAATCCCGTGCGATGAGATGACCCGGGTCTGTGTAAA
GTTCCCTTCGACGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTC
CATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGA
AAGATGAAAAGAAGCTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAG
GGAAGGGCTTGAGATCAGACTTGGTATTTTGCATGCTGCTCTCTCGGGGGCGGCC
GCTGCGGTTTACCGGGCCAGCATCGGTTTGGAGCGGCAGGATAATGGCGGAGGAA
TGTGGCACGGCTTCTGCTGTGTGTTATAGCCTCTGACGATACTGCCAGCCTAGACC
GAGGACTGCGGTTTTTACCTAGGATGTTGGCATAATGATCTTAAGTCGCCCGTCTT
GAA

C. albicans (EXF – 6936)

CTCAGTAGCGGCGAGTGAAGCGGCAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGCGTCTTTG
GCGTCCGAGTTGTAATTTGAAGAAGGTATCTTTGGGCCCGGCTCTTGTCTATGTTCC
CTTGGAACAGGACGTCACAGAGGGTGAGAATCCCGTGCGATGAGATGACCCGGG
TCTGTGTAAAGTTCCTTCGACGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGG
TGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTAC
AGTGATGGAAGATGAAAAGAAGCTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAAT
TGTTGAAAGGGAAGGGCTTGAGATCAGACTTGGTATTTTGCATGCTGCTCTCTCGG
GGGCGGCCGCTGCGGTTTACCGGGCCAGCATCGGTTTGGAGCGGCAGGATAATGG
CGGAGGAATGTGGCACGGCTTCTGCTGTGTGTTATAGCCTCTGACGATACTGCCA
GCCTAGACCGAGGACTGCGGTTTTTACCTAGGATGTTGGCATAATGATCTTAAGTC
GCCCGTCTG

C. albicans (EXF – 6981)

CGGCGAGTGAGCGGCAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGCGTCTTTGGCGTCCGAG
TTGTAATTTGAAGAAGGTATCTTTGGGCCCGGCTCTTGTCTATGTTCCCTTGGAACA
GGACGTCACAGAGGGTGAGAATCCCGTGCGATGAGATGACCCGGGTCTGTGTAAA
GTTCCCTTCGACGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTC
CATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGA
AAGATGAAAAGAAGCTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAG
GGAAGGGCTTGAGATCAGACTTGGTATTTTGCATGCTGCTCTCTCGGGGGCGGCC
GCTGCGGTTTACCGGGCCAGCATCGGTTTGGAGCGGCAGGATAATGGCGGAGGAA

TGTGGCACGGCTTCTGCTGTGTGTTATAGCCTCTGACGATACTGCCAGCCTAGACC
GAGGACTGCGGTTTTTACCTAGGATGTTGGCATAATGATCTTAAGTCGCCCGTCTT

C. albicans (ni EXF številke)

CGGCGAGTGAGCGGCAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGCGTCTTTGGCGTCCGAGT
TGTAATTTGAAGAAGGTATCTTTGGGCCCGGCTCTTGTCTATGTTCCCTTGGAACAG
GACGTCACAGAGGGTGAGAATCCCGTGCGATGAGATGACCCGGGTCTGTGTAAG
TTCCTTCGACGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCC
ATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAA
AGATGAAAAGAAGCTTTGAAAAGAGAGTGAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGG
GAAGGGCTTGAGATCAGACTTGGTATTTTGCATGTTGCTCTCTCGGGGGCGGCCGC
TGCGGTTTACCGGGCCAGCATCGGTTTGGAGCGGCAGGATAATGGCGGAGGAATG
TGGCACGGCTTCTGCTGTGTGTTATAGCCTCTGACGATACTGCCAGCCTAGACCGA
GGACTGCGGTTTTTACCTAGGATGTTGGCATAATGATCTTAAGTCGCCCGTCTTA

C. inconspicua, Pichia cactophila (ni EXF številke)

ATGCCTCAGTAGCGGCGAGTGAAGCGGCAAGAGCTCAGATTTGAAATCGCAGCAC
CATGCTGCGAGTTGTAGATTGCAGGTGGGAGAGTCTGCGTAGGCCGGTGTGGAAG
TCCCTTGGAACAGGGCGCCACTGAGGGTGAGAGCCCCGTGCGATGCCACGCTCTA
CGTTTTGTACTCCCCTCTGACGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGG
TGGTAAATTCCATCTAAGGCTAAATACTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTAC
TGTGAAGGAAAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTGAAACAGCACGTGAAAT
TGTTGAAAGGGAAGGGTATTGGGCCCGACATGGGAATCGCGCACCGCTGCTCCTT
GTGGGCGGCGCTCTGGGCTTTTCCCTGGGCCAGCATCGGTTCTTGCTGCAGGAGAA
GGGGCTGTGGAATGTGGCTGCCGCGCTTTGCCGGGGCAGTGTTATAGCCACTGGG
CCAGATGCTGCGTGTGGGGACCGAGGACTGCGGCCGCAAGGTCTCGGATGCTGGC
ACAACGGCGCAATACCGCCCGTCTTGACACAC

C. albicans (EXF – 6940)

ATGCTCAGTAGCGGCGAGTGAAGCGGCAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGCGTCT
TTGGCGTCCGAGTTGTAATTTGAAGAAGGTATCTTTGGGCCCGGCTCTTGTCTATG
TTCCTTGGAACAGGACGTCACAGAGGGTGAGAATCCCGTGCGATGAGATGACCCG
GGTCTGTGTAAGTTCCTTCGACGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTG
GGTGGTAAATTCCATCTAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGT
ACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAAGCTTTGAAAAGAGAGTGAAAAGTACGTGAA
ATTGTTGAAAGGGAAGGGCTTGAGATCAGACTTGGTATTTTGCATGCTGCTCTCTC
GGGGGCGGCCGCTGCGGTTTACCGGGCCAGCATCGGTTTGGAGCGGCAGGATAAT
GGCGGAGGAATGTGGCACGGCTTCTGCTGTGTGTTATAGCCTCTGACGATACTGC
CAGCCTAGACCGAGGACTGCGGTTTTTACCTAGGATGTTGGCATAATGATCTTAA
GTCGCCCGTCTTGA

Exophiala dermatitidis (EXF – 6942)

ACGGCGAGTGAGCGGCAACAGCTCAAATTTGAAATCTGGCCTCTTTGGGGTCCGA
GTTGTAATTTGTAGAGGATGTTTCGGGCACCGCTCCGGTTTAAATTTCTTGGAACA
GAATGTCAAAGAGGGGTGAGAACCCCGTCTTGGACCGGCAGTAGGGCCCATGTGA
AACTCCTTCGACGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCAAATGGGTGGTAAAT
TTCATCTAAAGCTAAATATTGGCCAGAGACCGATAGCGCACAAGTAGAGTGATCG
AAAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTTAAACAGTACGTGAAATTTGTTGAAA
GGGAAGCGCTTGCAACCAGACTTGCGCGCGGCGGTTCCCCCTTCCTTTTGGTTGGG
TTATTCCGCCGTGTCCAGGCCAACATCGGTTCTGGGGGTTCGGTTAAAGGCCTGGG
GAATGTATCTACCCTTCGGGCGTAGACTTATAGCCCCGGGTGTCATGCGACCTCCC
GGGACCGAGGAACGCGCTTCGGCTCGGATGTTGGCGTAATGGTTGTCAGCGACCC
GTCTTGAACCAACGGGA

C. parapsilosis (EXF – 6998)

GCGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGCACTTTCAGTGTCCG
AGTTGTAATTTGAAGAAGGTATCTTTGGGTCTGGCTCTTGTCTATGTTTCTTGGA
CAGAACGTCACAGAGGGTGAGAATCCCGTGCGATGAGATGTCCAGACCTATGTA
AAGTTCCTTCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAA
TTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATG
GAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAGTACGTGAAATTTGTTGAA
AGGGAAGGGCTTGAGATCAGACTTGGTATTTTGTATGTTACTCTCTCGGGGGTGGT
CTCTACAGTTTACCGGGCCAGCATCAGTTTGAGCGGTAGGATAAGTGCAAAGAAA
TGTGGCACTGCTTCGGTAGTGTGTTATAGTCTTTGTGCGATACTGCCAGCTTAGACT
GAGGACTGCGGCTTCGGCCTAGGATGTTGGCATAATGATCTTAAGTCGCCCGTCTT

C. parapsilosis (EXF – 7001)

TGCCTTAGAAGCGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGCACTT
TCAGTGTCCGAGTTGTAATTTGAAGAAGGTATCTTTGGGTCTGGCTCTTGTCTATG
TTTCTTGGAACAGAACGTCACAGAGGGTGAGAATCCCGTGCGATGAGATGTCCCA
GACCTATGTAAAGTTCCTTCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGT
GGGTGGTAAATTCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAG
TACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAGTACGTGA
AATTGTTGAAAGGGAAGGGCTTGAGATCAGACTTGGTATTTTGTATGTTACTCTCT
CGGGGGTGGCCTCTACAGTTTACCGGGCCAGCATCAGTTTGAGCGGTAGGATAAG
TGCAAAGAAATGTGGCACTGCTTCGGTAGTGTGTTATAGTCTTTGTGCGATACTGCC
AGCTTAGACTGAGGACTGCGGCTTCGGCCTAGGATGTTGGCATAATGATCTTAAG
TCGCCCGTCTTGA

C. albicans (EXF – 7087)

GCGTCAGCAGCGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGCGTCTT
TGCGGTCCGAGTTGTAATTTGAAGAAGGTATCTTTGGGCCCGGCTCTTGTCTATGT

TCCTTGGAACAGGACGTCACAGAGGGTGAGAATCCCGTGCGATGAGATGACCCGG
GTCTGTGTAAGTTCCTTCGACGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGG
GTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTA
CAGTGATGGAAAGATGAAAAGA AACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAGTACGTGAAA
TTGTTGAAAGGGAAGGGCTTGAGATCAGACTTGGTATTTTGCATGTTGCTCTCTCG
GGGGCGGCCGCTGCGGTTTACCGGGCCAGCATCGGTTTGGAGCGGCAGGATAATG
GCGGAGGAATGTGGCACGGCTTCTGCTGTGTGTTATAGCCTCTGACGATACTGCC
AGCCTAGACCGAGGACTGCGGTTTTTACCTAGGATGTTGGCATAATGATCTTAAGT
CGCCCGTCTG

C. albicans (EXF – 7088)

GCGGCGAGTGAAGCGGCAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGCGTCTTTGGCGTCCG
AGTTGTAATTTGAAGAAGGTATCTTTGGGCCCGGCTCTTGTCTATGTTTCTTGGAA
CAGGACGTCACAGAGGGTGAGAATCCCGTGCGATGAGATGACCCGGGTCTGTGTA
AAGTTCCTTCGACGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAA
TTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATG
GAAAGATGAAAAGA AACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAGTACGTGAAATTGTTGAA
AGGGAAGGGCTTGAGATCAGACTTGGTATTTTGCATGTTGCTCTCTCGGGGGCGG
CCGCTGCGGTTTACCGGGCCAGCATCGGTTTGGAGCGGCAGGATAATGGCGGAGG
AATGTGGCACGGCTTCTGCTGTGTGTTATAGCCTCTGACGATACTGCCAGCCTAGA
CCGAGGACTGCGGTTTTTACCTAGGATGTTGGCATAATGATCTTAAGTCGCCCGTC
TTGA

C. albicans (EXF – 7091)

GCGGCGAGTGAAGCGGCAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGCGTCTTTGGCGTCCG
AGTTGTAATTTGAAGAAGGTATCTTTGGGCCCGGCTCTTGTCTATGTTTCTTGGAA
CAGGACGTCACAGAGGGTGAGAATCCCGTGCGATGAGATGACCCGGGTCTGTGTA
AAGTTCCTTCGACGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAA
TTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATG
GAAAGATGAAAAGA AACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAGTACGTGAAATTGTTGAA
AGGGAAGGGCTTGAGATCAGACTTGGTATTTTGCATGTTGCTCTCTCGGGGGCGG
CCGCTGCGGTTTACCGGGCCAGCATCGGTTTGGAGCGGCAGGATAATGGCGGAGG
AATGTGGCACGGCTTCTGCTGTGTGTTATAGCCTCTGACGATGCTGCCAGCCTAGA
CCGAGGACTGCGGTTTTTACCTAGGATGTTGGCATAATGATCTTAAGTCGCCCGT
CTT

C. albicans (EXF – 7092)

TCAGCAGCGGCGAGTGAAGCGGCAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGCGTCTTTGG
CGTCCGAGTTGTAATTTGAAGAAGGTATCTTTGGGCCCGGCTCTTGTCTATGTTCC
TTGGAACAGGACGTCACAGAGGGTGAGAATCCCGTGCGATGAGATGACCCGGGT
CTGTGTAAGTTCCTTCGACGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGT
GGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACA

GTGATGGAAAGATGAAAAGAAGCTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATT
GTTGAAAGGGAAGGGCTTGAGATCAGACTTGGTATTTTGCATGTTGCTCTCTCGGG
GGCGGCCGCTGCGGTTTACCGGGCCAGCATCGGTTTGGAGCGGCAGGATAATGGC
GGAGGAATGTGGCACGGCTTCTGCTGTGTGTTATAGCCTCTGACGATACTGCCAG
CCTAGACCGAGGACTGCGGTTTTTACCTAGGATGTTGGCATAATGATCTTAAGTCG
CCCGTCTTG

C. albicans (EXF – 7093)

GCGTCAGCAGCGGCGAGTGAAGCGGCAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGCGTCTT
TGGCGTCCGAGTTGTAATTTGAAGAAGGTATCTTTGGGCCCGGCTCTTGTCTATGT
TCCTTGGAAACAGGACGTCACAGAGGGTGAGAATCCCGTGCGATGAGATGACCCGG
GTCTGTGTAAGTTCCCTTCGACGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGG
GTGGTAAATCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTA
CAGTGATGGAAAGATGAAAAGAAGCTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAA
TTGTTGAAAGGGAAGGGCTTGAGATCAGACTTGGTATTTTGCATGTTGCTCTCTCG
GGGGCGGCCGCTGCGGTTTACCGGGCCAGCATCGGTTTGGAGCGGCAGGATAATG
GCGGAGGAATGTGGCACGGCTTCTGCTGTGTGTTATAGCCTCTGACGATACTGCC
AGCCTAGACCGAGGACTGCGGTTTTTACCTAGGATGTTGGCATAATGATCTTAAGT
CGCCCGTCTT

C. albicans (EXF – 7094)

GGCGAGTGAGCGGCAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGCGTCTTTGGCGTCCGAGTT
GTAATTTGAAGAAGGTATCTTTGGGCCCGGCTCTTGTCTATGTTCCCTTGGAAACAG
ACGTCACAGAGGGTGAGAATCCCGTGCGATGAGATGACCCGGGTCTGTGTAAGT
TCCTTCGACGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCCA
TCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAA
GATGAAAAGAAGCTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGG
AAGGGCTTGAGATCAGACTTGGTATTTTGCATGTTGCTCTCTCGGGGGCGGCCGCT
GCGGTTTACCGGGCCAGCATCGGTTTGGAGCGGCAGGATAATGGCGGAGGAATGT
GGCACGGCTTCTGCTGTGTGTTATAGCCTCTGACGATACTGCCAGCCTAGACCGAG
GACTGCGGTTTTTACCTAGGATGTTGGCATAATGATCTTAAGTCGCCCGTCT

C. albicans (EXF – 7095)

CGGCGAGTGAGCGGCAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGCGTCTTTGGCGTCCGAGT
TGTAATTTGAAGAAGGTATCTTTGGGCCCGGCTCTTGTCTATGTTCCCTTGGAAACAG
GACGTCACAGAGGGTGAGAATCCCGTGCGATGAGATGACCCGGGTCTGTGTAAG
TTCCCTTCGACGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCC
ATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAA
AGATGAAAAGAAGCTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGG
GAAGGGCTTGAGATCAGACTTGGTATTTTGCATGCTGCTCTCTCGGGGGCGGCCG
CTGCGGTTTACCGGGCCAGCATCGGTTTGGAGCGGCAGGATAATGGCGGAGGAAT

GTGGCACGGCTTCTGCTGTGTGTTATAGCCTCTGACGATGCTGCCAGCCTAGACCG
AGGACTGCGGTTTTTTACCTAGGATGTTGGCATAATGATCTTAAGTCGCCCGTCT

C. albicans (EXF – 7096)

GCGGCGAGTGAGCGGCAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGCGTCTTTGGCGTCCGAG
TTGTAATTTGAAGAAGGTATCTTTGGGCCCGGCTCTTGTCTATGTTTCCTTGGAACA
GGACGTCACAGAGGGTGAGAATCCCGTGCGATGAGATGACCCGGGTCTGTGTAA
GTTCCCTTCGACGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTC
CATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGA
AAGATGAAAAGAAGCTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAG
GGAAGGGCTTGAGATCAGACTTGGTATTTTGCATGTTGCTCTCTCGGGGGCGGCC
GCTGCGGTTTACCGGGCCAGCATCGGTTTGGAGCGGCAGGATAATGGCGGAGGAA
TGTGGCACGGCTTCTGCTGTGTGTTATAGCCTCTGACGATGCTGCCAGCCTAGACC
GAGGACTGCGGTTTTTAACCTAGGATGTTGGCATAATGATCTTAAGTCGCCCTT

Kazachstania bovina (EXF – 7097)

CGTCAGAAGCGGCGAGTGAAGCGGCAAGAGCTCAAATTTGAAATCTAGCACCGCT
GGTGCTCGAGTTGTAATTTGTAGAGTGGATCCTTGGGGCCGTTTCCTTGCCTATGTT
CCTTGAACAGGACGTCATGGAGGGTGAGAACCCCGTGTGGCGAGGGGGCGCGGC
TCCGTGTAAGGGCTGCTCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGG
GTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATACAGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGT
ACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAAGCTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAA
ATTGTTGAAAGGGAAGGGCATTGATCAGACATGGTGTTTTTGCGCCCTGCTCCT
TGTGGGCGGGGGATCCTCGCAGCTCACTGGGCCAGCATCAGTTTTTGGCGGCTGGA
TAAAACCGGAGGAATGTGGCTTCTCTCGGGAAGTGTTATAGCCTGCGGGAATGCG
GCCAGCCGGGACTGAGGAACGCGACTTTTGTCAAGGATGCTGGCATAATGGTTAT
ATGCCGCCCGTCTA

C. albicans (EXF – 7099)

AGCGGCGAGTGAGCGGCAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGCGTCTTTGGCGTCCGA
GTTGTAATTTGAAGAAGGTATCTTTGGGCCCGGCTCTTGTCTATGTTTCCTTGGAAC
AGGACGTCACAGAGGGTGAGAATCCCGTGCGATGAGATGACCCGGGTCTGTGTAA
AGTTCCCTTCGACGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATT
CCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGG
AAAGATGAAAAGAAGCTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAA
GGGAAGGGCTTGAGATCAGACTTGGTATTTTGCATGTTGCTCTCTCGGGGGCGGC
CGCTGCGGTTTACCGGGCCAGCATCGGTTTGGAGCGGCAGGATAATGGCGGAGGA
ATGTGGCACGGCTTCTGCTGTGTGTTATAGCCTCTGACGATACTGCCAGCCTAGAC
CGAGGACTGCGGTTTTTTACCTAGGATGTTGGCATAATGATCTTAAGTCGCCCGTTG

C. albicans (EXF – 7100)

TGCCTCAGTAGCGGCGAGTGAGCGGCAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGCGTCTT
TGGCGTCCGAGTTGTAATTTGAAGAAGGTATCTTTGGGCCCGGCTCTTGTCTATGT
TCCTTGGAACAGGACGTCACAGAGGGTGAGAATCCCGTGCGATGAGATGACCCGG
GTCTGTGTAAAGTTCCTTCGACGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGG
GTGGTAAATTCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTA
CAGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAA
TTGTTGAAAGGGAAGGGCTTGAGATCAGACTTGGTATTTTGCATGTTGCTCTCTCG
GGGGCGGCCGCTGCGGTTTACCGGGCCAGCATCGGTTTGGAGCGGCAGGATAATG
GCGGAGGAATGTGGCACGGCTTCTGCTGTGTGTTATAGCCTCTGACGATACTGCC
AGCCTAGACCGAGGACTGCGGTTTTTACCTAGGATGTTGGCATAATGATCTTAAGT
CGCCCGTCTG

C. albicans (EXF – 7101)

ATGCCTCAGTAGCGGCGAGTGAAGCGGCAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGCGTC
TTTGGCGTCCGAGTTGTAATTTGAAGAAGGTATCTTTGGGCCCGGCTCTTGTCTAT
GTTCCCTTGGAACAGGACGTCACAGAGGGTGAGAATCCCGTGCGATGAGATGACCC
GGGTCTGTGTAAAGTTCCTTCGACGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGT
GGGTGGTAAATTCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAG
TACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGA
AATTGTTGAAAGGGAAGGGCTTGAGATCAGACTTGGTATTTTGCATGTTGCTCTCT
CGGGGGCGGCCGCTGCGGTTTACCGGGCCAGCATCGGTTTGGAGCGGCAGGATAA
TGGCGGAGGAATGTGGCACGGCTTCTGCTGTGTGTTATAGCCTCTGACGATACTGC
CAGCCTAGACCGAGGACTGCGGTTTTTACCTAGGATGTTGGCATAATGATCTTAA
GTCGCCCGTCTTG

C. albicans (EXF – 7102)

CTCAGTAGCGGCGAGTGAGCGGCAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGCGTCTTTGGC
GTCCGAGTTGTAATTTGAAGAAGGTATCTTTGGGCCCGGCTCTTGTCTATGTTCC
TGGAACAGGACGTCACAGAGGGTGAGAATCCCGTGCGATGAGATGACCCGGGTC
TGTGTAAAGTTCCTTCGACGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTG
GTAAATTCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAG
TGATGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTG
TTGAAAGGGAAGGGCTTGAGATCAGACTTGGTATTTTGCATGCTGCTCTCTCGGG
GGCGGCCGCTGCGGTTTACCGGGCCAGCATCGGTTTGGAGCGGCAGGATAATGGC
GGAGGAATGTGGCACGGCTTCTGCTGTGTGTTATAGCCTCTGACGATACTGCCAG
CCTAGACCGAGGACTGCGGTTTTTACCTAGGATGTTGGCATAATGATCTTAAGTCG
CCCGTTA

C. albicans (EXF – 7103)

TGAAGCGGCAAAGCTCAATTTGAAATCTGGCGTCTTTGGCGTCCGAGTTGTAATTT
GAAGAAGGTATCTTTGGGCCCGGCTCTTGTCTATGTTCCCTTGGAACAGGACGTCAC
AGAGGGTGAGAATCCCGTGCGATGAGATGACCCGGGTCTGTGTAAAGTTCCTTCG

ACGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAA
GCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAA
AAGAACTTTGAAGAAGTGAAGAAGTACGTGAAATTGTTGAAGGGAAGGGCTT
GAGATCAGACTTGGTATTTTGCATGCTGCTCTCTCGGGGGCGGCCGCTGCGGTTTA
CCGGGCCAGCATCGGTTTGGAGCGGCAGGATAATGGCGGAGGAATGTGGCACGG
CTTCTGCTGTGTGTTATAGCCTCTGACGATACTGCCAGCCTAGACCGAGGACTGCG
GTTTTACCTAGGATGTTGGCATAATGATCTTAAGTCGCCCCGTCTG

C. glabrata (EXF – 7104)

ACGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGTACCTTTGGTGCCCC
AGTTGTAATTTGGAGAGTACCACTTTGGGACTGTACTTTGCCTATGTTCCCTTGAA
CAGGACGTCATGGAGGGTGAGAATCCCGTGTGGCGAGGGTGTGAGTTCTTTGTAA
AGGGTGCTCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAAT
TCCATCTAAAGCTAAATACAGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATG
GAAAGATGAAAAGAAGCTTTGAAAAGAGAGTGAAGAAGTACGTGAAATTGTTGAA
AGGGAAGGGCATTGATCAGACATGGTGTGTTTGCGCCCTTGCCTCTCGTGGGCTT
GGGACTCTCGCAGCTCACTGGGCCAGCATCGGTTTTGGCGGCCGGAAAAAACCTA
GGGAATGTGGCTCTGCGCCTCGGTGTAGAGTGTTATAGCCCTGGGGAATACGGCC
AGCCGGGACCGAGGACTGCGATACTTGTTATCTAGGATGCTGGCATAATGGTTAT
ATGCCGCCCGTCTT

C. albicans (EXF – 7105)

AGCGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGCGTCTTTGGCGTCC
GAGTTGTAATTTGAAGAAGGTATCTTTGGGCCCGGCTCTTGTCTATGTTCCCTTGGA
ACAGGACGTCACAGAGGGTGAGAATCCCGTGCGATGAGATGACCCGGGTCTGTGT
AAAGTTCCTTCGACGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAA
ATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGAT
GGAAAGATGAAAAGAAGCTTTGAAAAGAGAGTGAAGAAGTACGTGAAATTGTTGA
AAGGGAAGGGCTTGAGATCAGACTTGGTATTTTGCATGCTGCTCTCTCGGGGGCG
GCCGCTGCGGTTTACCGGGCCAGCATCGGTTTGGAGCGGCAGGATAATGGCGGAG
GAATGTGGCACGGCTTCTGCTGTGTGTTATAGCCTCTGACGATACTGCCAGCCTAG
ACCGAGGACTGCGGTTTTAACCTAGGATGTTGGCATAATGATCTTAAGTCGCCCC
TCTTG