

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Kristina DAMJANOVIČ

**GENETSKA RAZNOLIKOST IN OBČUTLJIVOST ZA
ANTIMIKOTIKE KLINIČNIH IZOLATOV**
Candida parapsilosis

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2012

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Kristina DAMJANOVIČ

**GENETSKA RAZNOLIKOST IN OBČUTLJIVOST ZA ANTIMIKOTIKE
KLINIČNIH IZOLATOV *Candida parapsilosis***

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

**GENETIC VARIABILITY AND SENSITIVITY FOR ANTIMICOTICS OF
CLINICAL *Candida parapsilosis* ISOLATES**

GRADUATION THESIS

University studies

Ljubljana, 2012

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija mikrobiologije. Opravljeno je bilo v Laboratoriju za diagnostiko glivičnih infekcij na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija dodiplomskega študija mikrobiologije je na seji dne 9. 6. 2010, za mentorja diplomskega dela imenovala doc. dr. Miroslava Petrovca, dr. med., za somentorico doc. dr. Tadejo Matos, dr. med. in za recenzenta prof. dr. Peter Rasporja, univ. dipl. ing.

Mentor: doc. dr. Miroslav Petrovec

Somentorica: doc. dr. Tadeja Matos

Recenzent: prof. dr. Peter Raspor

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Darja ŽGUR-BERTOK,

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: doc. dr. Miroslav PETROVEC,

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

Članica: doc. dr. Tadeja MATOS,

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

Član: prof. dr. Peter RASPOR,

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Kristina Damjanovič

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 579.24/.25:582.28:615.282:577.2.083(043) = 163.6
KG	kvasovke/ <i>Candida parapsilosis</i> / <i>Candida metapsilosis</i> / <i>Candida orthopsilosis</i> / genetska raznolikost/ občutljivost izolatov/ antimikotiki/ flukonazol/ vorikonazol/ amfotericin B/ kaspofungin/ minimalna inhibitorna koncentracija/ molekularne metode
AV	DAMJANOVIČ, Kristina
AA	PETROVEC, Miroslav (mentor)/ MATOS, Tadeja (somentorica)/ RASPOR, Peter (recenzent)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI	2012
IN	GENETSKA RAZNOLIKOST IN OBČUTLJIVOST ZA ANTIMIKOTIKE KLINIČNIH IZOLATOV <i>Candida parapsilosis</i>
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XII, 66 str., 11 pregl., 21 sl., 2 pril., 75 vir.
IJ	sl
JJ	sl/en
AI	Najpogostejša povzročiteljica glivičnih okužb pri ljudeh še vedno ostaja <i>C. albicans</i> , vendar se je spekter pojavljanja glivičnih okužb v zadnjih dveh desetletjih, predvsem na račun vrst, ki niso <i>albicans</i> , spremenil. <i>Candida parapsilosis</i> je v svetu, zlasti Južni Ameriki in Aziji, druga najpogosteje osamljena kandida v krvi. Do leta 2005 so <i>C. parapsilosis</i> kompleks ločevali v tri skupine: I, II in III. Na osnovi molekularnih raziskav so potrdili, da so si med seboj sorodne, vendar obstaja dovolj razlik in jih ločili v tri različne vrste: <i>C. parapsilosis sensu stricto</i> (skupina I), <i>C. orthopsilosis</i> (skupina II) in <i>C. metapsilosis</i> (skupina III). Namen naše diplomske naloge je bil preveriti genetsko raznolikost izolatov <i>C. parapsilosis</i> kompleksa, osamljenih iz vzorcev kužnin zbranih med rutinskim delom v Laboratoriju za diagnostiko glivičnih infekcij, Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo. Določili smo občutljivost omenjenih izolatov za antimikotike flukonazol, vorikonazol, amfotericin B in kaspofungin z uporabo E-testa. V raziskavo smo vključili 122 sevov. Z analizo restriktcijskih vzorcev gena za protein sekundarna alkoholna dehidrogenaza (SADH), ki je značilen za vse tri vrste <i>C. parapsilosis</i> kompleksa smo opredelili 109 (89,3 %) izolatov kot <i>C. parapsilosis sensu stricto</i> , 10 (8,2 %) izolatov kot <i>C. metapsilosis</i> in 3 (2,5 %) izolate kot <i>C. orthopsilosis</i> . <i>C. parapsilosis</i> lahko povzroča tako sistemske kot povrhnje kandidoze. To smo potrdili tudi z našo raziskavo, saj smo od 122 izolatov, vključenih v našo raziskavo, kar 39 (31,9 %) osamili iz brisov ran. Naši rezultati testiranja občutljivosti za antimikotike so primerljivi s podatki iz literature. Osamili smo le en izolat odporen proti flukonazolu, ta je imel tudi najvišjo minimalno inhibitorno koncentracijo (MIK) za vorikonazol (še v mejah občutljivega). Številne objave poročajo o višjih MIK-ih <i>C. parapsilosis</i> za ehinokandine, kar smo potrdili tudi v naši nalogi.

KEY WORD DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 579.24/.25:582.28:615.282:577.2.083(043) = 163.6
CX yeasts/ *Candida parapsilosis*/ *Candida metapsilosis*/ *Candida orthopsilosis*/ genetic variability/ sensitivity of isolates/ antimicrobics/ fluconazole/ voriconazole/ amphotericin B/ caspofungin/ minimal inhibitory concentration/ molecular techniques
AU DAMJANOVIČ, Kristina
AA PETROVEC, Miroslav (supervisor)/ MATOS, Tadeja (co-advisor)/ RASPOR, Peter (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
PY 2012
TI GENETIC VARIABILITY AND SENSITIVITY FOR ANTIMICOTICS OF CLINICAL *Candida parapsilosis* ISOLATES
DT Graduation Thesis (University studies)
NO XII, 66 p., 11 tab., 21 fig., 2 ann., 75 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Although *Candida albicans* is the most commonly isolated *Candida* species, longitudinal studies have demonstrated a trend toward an increased prevalence of non-*C. albicans* species in the last two decades. *Candida parapsilosis* is the second most commonly isolated *Candida* from blood cultures in some areas of the world, Latin America and Asia in particular. Prior to 2005 *C. parapsilosis* was separated into three groups, I to III. Further genetic studies revealed sufficient differences that have led to the separation of the groups into three closely related but distinct species: *C. parapsilosis sensu stricto* (group I), *C. orthopsilosis* (group II) and *C. metapsilosis* (group III). The purpose of our study was to examine genetic diversity and antifungal susceptibility of *C. parapsilosis* complex isolates, which were collected during routine work in Laboratory for fungal infections diagnostics, Institute of microbiology and immunology. 122 strains were included in our study. The susceptibility to fluconazole, voriconazole, amphotericin B and caspofungin was determined using Etest. Based on the amplification of SADH (secondary alcohol dehydrogenase) gene fragment we have identified 109 (89,3 %) isolates as *C. parapsilosis sensu stricto*, 10 (8,2 %) isolates as *C. metapsilosis* and 3 (2,5 %) isolates as *C. orthopsilosis*. *C. parapsilosis* can cause superficial as well as systemic infections, which is consistent with our results. Among 122 strains included in our study, 39 (31,9 %) were collected from wound samples. Results of antifungal susceptibility testing are comparable with those from the literature. Only one strain was resistant to fluconazole, it also had the highest voriconazole minimum inhibitory concentration (MIC) value (but still in susceptible range). We have shown higher echinocandin MIC values. Other authors have also demonstrated higher echinocandin MIC values for *C. parapsilosis* in comparison with other *Candida* species.

KAZALO VSEBINE

Ključna dokumentacijska informacija	III
Key words documentation	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VIII
Kazalo slik	IX
Kazalo prilog	XI
Kazalo okrajšav	XII
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA	3
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	3
2 PREGLED OBJAV	4
2.1 PREVALENCA OKUŽB S <i>Candida parapsilosis</i> IN GEOGRAFSKA RAZŠIRJENOST	4
2.2 MORFOLOGIJA	6
2.3 VIRULENČNI DEJAVNIKI <i>C. parapsilosis</i>	7
2.3.1 Adherenca na gostiteljske celice	7
2.3.2 Tvorba biofilma	8
2.3.3 Sekrecijski encimi	9
2.3.3.1 Aspartatne proteinaze (Saps).....	9
2.3.3.2 Fosfolipaze	10
2.3.3.3 Lipaze	10
2.4 OKUŽBE POVZROČENE S <i>Candida</i> spp.	11
2.4.1 Povrhne oblike kandidoze	11
2.4.1.1 Kandidoza kože in nohtov	11
2.4.1.2 Sluznična kandidoza.....	12
2.4.2 Invazivna kandidoza	13
2.4.2.1 Akutna diseminirana kandidoza (hematogena kandidoza).....	13
2.4.3 Kronična diseminirana kandidoza	14

2.5 ANTIMIKROBNA OBČUTLJIVOST	14
2.5.1 Metode za testiranje občutljivosti gliv na antimikotike	17
2.5.1.1 Metoda difuzije antimikotičnega gradienta (Etest).....	17
2.6 PRISTOPI K LOČEVANJU <i>C. parapsilosis</i> KOMPLEKSA NA TRI GENOTIPSKO LOČENE VRSTE: <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. orthopsilosis</i> IN <i>C. metapsilosis</i>	20
2.6.1 Molekularne genetske metode.....	21
2.6.1.1 Analiza celotnega genoma.....	21
2.6.1.1.1 Naključno pomnoževanje polimorfne DNK z verižno reakcijo s polimerazo.	21
2.6.1.1.2 Vsebnost gvanina in citozina (G+C) in DNK-DNK hibridizacija	23
2.6.1.1.3 Polimorfizem fragmentov rezanih z endonukleazami (RFLP).....	23
2.6.1.1.4 Polimorfizem dolžin pomnoženih fragmentov	23
2.6.1.1.5 Mikrosateliti.....	24
2.6.1.2 Analiza specifičnih genov.....	25
2.6.1.2.1 Tipizacija zaporedij multiplih lokusov	25
2.6.1.2.2 Mitohondrijska DNK kot genetski označevalec	27
2.6.1.2.3 Pirosekveniranje.....	28
3 MATERIALI IN METODE	29
3.1 BOLNIKI	29
3.2 METODE.....	29
3.2.1 Obdelava vzorcev	29
3.2.2 Opazovanje morfologije	30
3.2.2.1 Koruzni agar.....	30
3.2.3 Identifikacijski testi.....	31
3.2.3.1 API <i>Candida</i> test	31
3.2.3.2 ID 32 C test	31
3.3 OSAMITEV CELOKUPNE NUKLEINSKE KISLINE IZ VZORCEV	31
3.3.1 Predpriprava vzorca	31
3.3.2 Izvedba avtomatske izolacije.....	32
3.4 POMNOŽEVANJE NUKLEINSKE KISLINE GLIV	34
3.4.1 Sestava reakcijske mešanice in pogoji reakcije PCR.....	35

3.4.2 Opredelitev pridelkov PCR	36
3.5 OPREDELITEV VRSTE Z METODO RESTRIKCIJE PRIDELKOV REAKCIJE PCR.....	37
3.6 TESTIRANJE OBČUTLJIVOSTI.....	37
3.6.1 Izvedba Etesta	37
3.6.2 Odčitavanje MIK vrednosti	38
4 REZULTATI	41
4.1 PRIDOBIVANJE KUŽNIN	41
4.2 GENETSKA RAZNOLIKOST IZOLATOV <i>Candida parapsilosis</i> KOMPLEKSA	41
4.3 DEMOGRAFSKA PORAZDELITEV IZOLATOV <i>C. parapsilosis</i> KOMPLEKSA	44
4.4 VIRI IZOLATOV <i>C. parapsilosis</i> KOMPLEKSA.....	45
4.5 PRIMERJAVA MINIMALNIH INHIBITORNIH KONCENTRACIJ (MIK) IZOLATOV <i>C. parapsilosis</i> KOMPLEKSA.....	46
5 RAZPRAVA IN SKLEPI	50
5.1 RAZPRAVA	50
5.2 SKLEPI.....	55
6 POVZETEK	56
7 VIRI	57
ZAHVALA	
PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Koncentracijska območja gradienta antimikotikov na Etestu (Etest, 2008)	19
Preglednica 2: Sestava reakcijske mešanice za verižno reakcijo s polimerazo	35
Preglednica 3: Potek verižne reakcije s polimerazo	36
Preglednica 4: Interpretacijski kriteriji CLSI za opredeljevanje občutljivosti gliv kvasovk za antimikotika flukonazol in vorikonazol (CLSI, 2008)	39
Preglednica 5: Interpretacijski kriteriji CLSI za opredeljevanje občutljivosti gliv kvasovk za antimikotika amfotericin B in kaspofungin (CLSI, 2008)	39
Preglednica 6: Rezultati opredelitve vrste z metodo restrikcije PCR pridelkov, osamljenih izolatov iz kužnin	42
Preglednica 7: Število izolatov pri posamezni vrsti, osamljenih iz kužnin moških oz. žensk	44
Preglednica 8: Kužnine, iz katerih smo osamili izolate <i>C. parapsilosis</i> kompleksa	45
Preglednica 9: Mesta odvzema brisa, iz katerih smo osamili izolate <i>C. parapsilosis</i> kompleksa	46
Preglednica 10: Občutljivost izolatov <i>C. parapsilosis</i> kompleksa za antimikotike flukonazol, vorikonazol, amfotericin B in kaspofungin z interpretacijami	49
Preglednica 11: Minimalne inhibitorne koncentracije izolatov MIK ₅₀ in MIK ₉₀ za <i>C. parapsilosis</i> kompleks	49

KAZALO SLIK

Slika 1: Celice <i>C. parapsilosis</i> (Nosek in sod, 2009).....	6
Slika 2: Štirje stabilni in dedni fenotipi kolonij <i>C. parapsilosis</i> : krep, koncentrična, kraterska in gladka oblika (Laffey in Butler, 2005).....	7
Slika 3: Umerjena lestvica vrednosti koncentracij antimikotika ($\mu\text{g/ml}$) z dvočrkovno kratico antimikotika na vrhu traku Etesta (A) in eksponenten gradient posušenega in stabiliziranega antimikotika (B), pri čemer je (a) maksimalna koncentracija in (b) minimalna (Etest, 2009a).....	18
Slika 4: Odčitavanje MIK vrednosti pri azolih (flukonazol), ko je glivna rast 80 % zavrt (0,25 $\mu\text{g/ml}$; Etest, 2009b).....	19
Slika 5: Odčitavanje MIK vrednosti pri polienih (amfotericin B), ko je glivna rast 100 % (0,094 $\mu\text{g/ml}$, Etest, 2009b).....	20
Slika 6: Genomska organizacija manjše ribosomske podenote, 5,8S rDNK, večje ribosomske podenote, ITS1 in ITS2 (Lin in sod., 1995).....	25
Slika 7: Nekoreninjeno radialno drevo, ki prikazuje sosedske gruče sekvenčnih polimorfizmov genov <i>cox3</i> , <i>sadh</i> in <i>syal</i> (Tavanti in sod., 2005).....	26
Slika 8: <i>Candida parapsilosis</i> na koruznem agarju, slikana pod 1000x povečavo s svetlobnim mikroskopom.....	30
Slika 9: Osamitev nukleinske kisline s tehnologijo magnetnih delcev (Kirchgesser in sod., 2003).....	33
Slika 10: Gelska elektroforeza PCR pomnožkov (Electroforesis de dna plasmidico en gel de agarosa, 2011).....	37
Slika 11: Način polaganja Etesta(ov) na RPMI gojišče v petrijevki (Etest, 2009a).....	38
Slika 12: Odčitavanje MIK ob upoštevanju mikrokolonij (0,25 $\mu\text{g/ml}$; Etest, 2009b).....	39
Slika 13: Restriksijski vzorec testnih sevov <i>C. parapsilosis</i> ATCC22019 (P*), <i>C. metapsilosis</i> ATCC96144 (M*) in <i>C. orthopsilosis</i> ATCC96139 (O*) ter lestvica fragmentov DNK znanih velikosti- 123bp DNK ladder.....	42
Slika 14: Restriksijski vzorec testiranih izolatov <i>C. parapsilosis</i> (P) in <i>C. metapsilosis</i> (M) ter testnih sevov P* , M* in O* v zadnjih treh vdolbinah.....	43

Slika 15: Restrikcijski vzorec testiranih izolatov <i>C. metapsilosis</i> (M).....	43
Slika 16: Restrikcijski vzorec testiranih izolatov <i>C. orthopsilosis</i> (O) in <i>C. metapsilosis</i> (M).....	43
Slika 17: Porazdelitev starosti vseh bolnikov, pri katerih smo osamili vrste <i>Candida parapsilosis</i> kompleksa.....	44
Slika 18: Porazdelitev minimalnih inhibitornih koncentracij (MIK) med izolati <i>C. parapsilosis</i> kompleksa za antimikotik flukonazol (N=76 izolatov).....	47
Slika 19: Porazdelitev minimalnih inhibitornih koncentracij MIK med izolati <i>C. parapsilosis</i> kompleksa za antimikotik vorikonazol (N=76 izolatov).....	47
Slika 20: Porazdelitev minimalnih inhibitornih koncentracij MIK med izolati <i>C. parapsilosis</i> kompleksa za antimikotik amfotericin B (N=76 izolatov).....	48
Slika 21: Porazdelitev minimalnih inhibitornih koncentracij MIK med izolati <i>C. parapsilosis</i> kompleksa za antimikotik kaspofungin (N=76 izolatov).....	48

KAZALO PRILOG

Priloga A: Protokol dela za vzorce kužnin vključene v raziskavo

Priloga B: Najpogostejše zdravstvene ustanove oz. klinični oddelki, iz katerih so bili osamljeni izolati

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AFLP	polimorfizem dolžin pomnoženih fragmentov
ATP sintaza	adenozin trifosfat sintaza
BAL	bronhoalveolarna lavaža
BEC celice	bukalne oz. lične epitelijske celice
BSA	<i>angl.</i> bovine serum albumin; goveji serumski albumin
ChromC	kromogeno gojišče, Chrom <i>Candida</i> agar
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
DNK	deoksiribonukleinska kislina
dNTP	deoksinukleotidtrifosfat
ITS regije	<i>angl.</i> internal transcribed spacer; notranji prepisni vmesnik ribosomske DNK
KRA	koruzni agar
MIK	minimalna inhibitorna koncentracija
MLST	<i>angl.</i> multilocus sequence typing; tipizacija zaporedij multiplih lokusov
NADH	nikotinamid adenozin nukleotid
RAPD	<i>angl.</i> randomly amplified polymorphic DNA; naključno pomnoževanje polimorfne DNK
PCR	<i>angl.</i> polymerase chain reaction; verižna reakcija s polimerazo
RFLP	<i>angl.</i> restriction fragment length polymorphism; polimorfizem fragmentov rezanih z endonukleazami
RNK	ribonukleinska kislina
RPMI	<i>angl.</i> Roswell Park Memorial Institute (gojišče je poimenovano po tej ustanovi)
SABA	Sabouraud dekstrozni agar
SSLP	<i>angl.</i> simple sequence length polymorphism; dolžinski polimorfizmi mikrosatelitov
SADH	<i>angl.</i> secondary alcohol dehydrogenase; protein sekundarna alkoholna dehidrogenaza
TAE pufer	raztopina Trisa, acetata in EDTA

1 UVOD

Glive postajajo od začetka 80. let prejšnjega stoletja vedno pomembnejši povzročitelji človeških obolenj, še posebej pri imunsko oslabljenih bolnikih in hospitaliziranih bolnikih s težkimi osnovnimi boleznimi. Od leta 1979 je letna incidenca glivične sepse v ZDA narasla za kar 200 %. Glive rodu *Candida* so v ZDA trenutno na lestvici vzrokov bolnišničnih okužb krvnega obtoka, na visokem četrtem mestu. Povzročajo od 8 do 15 % vseh omenjenih, bolnišnično pridobljenih okužb. Skupno breme invazivne kandidemije v ZDA znaša 42.000 okužb na leto (29 okužb/ 100.000 ljudi/ leto). Invazivne glivične okužbe imajo resen vpliv na javno zdravstvo, saj so odgovorne za visoko obolevnost in smrtnost (0,4 smrti/ 100.000 ljudi) (Trofa in sod., 2008). Povečanje števila glivičnih okužb je treba pripisati čedalje večji populaciji imunsko oslabljenih bolnikov, povečani uporabi široko spektralnih antibiotikov in citotoksičnih kemoterapevtikov. Večje je tudi število bolnikov, ki se zdravijo s presaditvijo krvotvornih matičnih celic in čvrstih organov (Pfaller in Diekema, 2007; Sodja in sod., 2009). V primerjavi z ZDA imajo evropske države nižjo stopnjo kandidemije 0,31-0,44/10.000 bolnišničnih dni vs. 1,5/10.000 bolnišničnih dni. Stopnja kandidemije za Univerzitetni klinični center v Ljubljani je bila, v letih 2004 do 2008, med 0,47-0,76 na 10.000 bolnišničnih dni (Sodja in sod., 2009).

Kandidemija je pogosto povezana z žilnimi katetri, predhodnim antibiotičnim zdravljenjem, parenteralno prehrano, kirurškimi posegi, predhodnim zdravljenjem z imunosupresivi, predhodno kolonizacijo, pogosta pa je tudi pri prejemnikih organov, nevtropeničnih bolnikih in bolnikih s trdnimi tumorji in hematološkimi malignimi obolenji (Almirante in sod., 2006).

Čeprav ostaja *Candida albicans* najpogostejša povzročiteljica glivičnih okužb pri ljudeh, so v večjih centrih v 90. letih prejšnjega stoletja ugotovili, da je prišlo do spremenjenega spektra pojavljanja glivičnih okužb na račun večjega deleža vrst, ki niso vrsta *albicans*. *Candida parapsilosis* je tako v Južni Ameriki, Aziji, Kanadi pa tudi ponekod v Evropi, druga ali tretja najpogostejše izolirana vrsta iz hemokultur (Tavanti in sod., 2005; Trofa in sod., 2008; Almirante in sod., 2006; Messer in sod., 2006; Pfaller in sod., 2005).

C. parapsilosis je bila prvič izolirana leta 1928 v Puerto Ricu, iz vzorca blata bolnika z

drisko. Izoliral jo je Bailey K. Ashford, ter jo sprva poimenoval *Monilia parapsilosis*. S tem jo je želel ločiti od vrste *Monilia psilosis*, danes bolj poznane pod imenom *Candida albicans*. Prvotno so menili, da je *C. parapsilosis* nepatogena vrsta, vendar je bila leta 1940 potrjena kot vzrok smrtnega primera endokarditisa pri intravenoznem uživalcu drog (Trofa in sod., 2008).

C. parapsilosis je komezal na koži ljudi, patogenost pa omejena z nedotaknjenostjo kožne povrhnjice. Prenaša se z rokami zdravstvenih delavcev in je zelo obstojna v bolnišničnem okolju (Tay in sod., 2009; Almirante in sod., 2006; Messer in sod., 2006; Lin in sod., 1995). Veliko pozornosti preprečevanju okužb namenjajo predvsem pri neonatalni oskrbi, okužbe v tem obdobju predstavljajo kar četrtno vseh invazivnih glivičnih okužb v Veliki Britaniji ter tretjino vseh *Candida*-okužb krvnega obtoka novorojenčkov v ZDA (Trofa in sod., 2008).

C. parapsilosis je manj virulentna kot *C. albicans*, pa vendarle poseduje nekatere lastnosti, ki ji dajejo selekcijsko prednost (Lupetti in sod., 2002). Mednje uvrščamo sposobnost razrasti in tvorbe biofilma na žilnih katetrih, peritonealnih dializnih katetrih, srčnih zaklopkah in ostalih vsadkih (Kuhn in sod., 2002a; Kuhn in sod., 2004; Almirante in sod., 2006; Ramage in sod., 2006). Eksperimetalni poskusi so dokazali, da je adhezija *C. parapsilosis* na akrilne materialne bistveno večja od tiste pri *C. albicans* (Almirante in sod., 2006). Vir fungemije so v kar 50 % žilni katetri, okužbe pa se pogosteje pojavljajo pri intravenoznem prejemanju antimikotikov. Najučinkovitejšo zaježitev fungemije dosežemo z ustreznim zdravljenjem in odstranitvijo katetra (Almirante in sod., 2006; Pfaller in sod., 2008; Tay in sod., 2009). Seleksijsko prednost ji omogoča tudi hitro razmnoževanje v raztopinah z visokimi koncentracijami glukoze (Weems in sod., 1987; Lupetti in sod., 2002), zaradi česar lahko povzročajo sistemske okužbe pri nedonošenčkih, ki prejemajo parenteralno prehrano (Lupetti in sod., 2002).

Že začetne analize polimorfizma restriksijskih fragmentov so kazale na genotipsko heterogenost izolatov *C. parapsilosis*, ki je bila večja kot pri ostalih vrstah iz rodu *Candida* (Tavanti in sod., 2005), vendar so vrsto let *C. parapsilosis* kompleks ločevali v tri skupine, I, II, III (Enger in sod., 2001; Lehmann in sod., 1992; Lin in sod., 1995; Roy in Meyer, 1998). Tavanti je leta 2005 predlagala za skupini II in III *C. parapsilosis* kompleksa nova

imena. Za skupino II ime *C. orthopsilosis* in za skupino III ime *C. metapsilosis*. Izolati skupine I naj bi zadržali ime *C. parapsilosis* (Tavanti in sod., 2005).

1.1 NAMEN DELA

Namen diplomske naloge je bil preveriti genetsko raznolikost izolatov *Candida parapsilosis* kompleksa osamljenih iz vzorcev kužnin in določiti občutljivost omenjenih izolatov za antimikotike flukonazol, vorikonazol, amfotericin B in kaspofungin.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Glede na podatke iz literature pričakujemo, da bo vrsta *Candida parapsilosis* med kliničnimi izolati prevladovala medtem, ko bosta vrsti *Candida orthopsilosis* in *Candida metapsilosis* prisotni v bistveno manjšem deležu. Minimalne inhibitorne koncentracije testiranih antimikotikov bodo primerljive s podatki iz literature.

2 PREGLED OBJAV

2.1 PREVALENCA OKUŽB S *Candida parapsilosis* IN GEOGRAFSKA RAZŠIRJENOST

Candida parapsilosis je spoznana kot porajajoč glivni patogen (*angl.* emerging fungal pathogen). Povezujejo jo z širokim spektrom okužb kot so fungemija, vaginitis, endokarditis, endoftalmitis, septični artritis in peritonitis (Trofa in sod., 2008; Nosek in sod., 2009). Poročila o izbruhih okužb s *C. parapsilosis* v enotah za intenzivno nego prihajajo iz bolnišnic po vsem svetu, kar opozarja na epidemiološko širitev tega patogena (Nosek in sod., 2009; Clark in sod., 2004; Kuhn in sod., 2004).

C. parapsilosis najdemo v različnih okoljih, na primer zemlji, sladkovodnih in slanih vodnih virih, izolirali so jo tudi iz insektov (Nosek in sod., 2009). *C. parapsilosis* je ena najpogosteje izoliranih gliv iz podnohtnega predela človeških rok (Trofa in sod., 2008). Lockhart s sodelavci je med svojo raziskavo *C. orthopsilosis* izoliral iz serozne tekočine v trebušni votlini, abscesov, katetrov, likvorja ter vzorcev spodnjih dihal (bronhoalveolarne lavaže- BAL, plevralne tekočine itd.). *C. metapsilosis* so izolirali iz abscesov, serozne tekočine v trebušni votlini, BAL in sklepne tekočine (Lockhart in sod., 2008).

Število primerov invazivne kandidiaze, ki jo povzroča *C. parapsilosis* je v zadnjih letih skokovito naraslo, najopazneje v Španiji (Almirante in sod., 2006) in Južni Ameriki (Pfaller in sod., 2008). Kljub vsemu pa *C. parapsilosis* povzroča bistveno manjšo smrtnost v primerjavi z okužbami krvnega obtoka, ki jih povzročajo ostale vrste iz rodu *Candida* (Abi-Said in sod., 1997; Almirante in sod., 2005; Pfaller in sod., 2008). Po podatkih programa SENTRY iz leta 2003 je *C. parapsilosis* po številu izolacij iz običajno sterilnih mest, hospitaliziranih bolnikov, na drugem mestu. V Severni Ameriki je predstavljala 15,5 % vseh izolatov, v Evropi 16,3 % in Latinski Ameriki 23,4 % (Messer in sod., 2006). Pfaller je leta 2007 poročal o rezultatih raziskave ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance v katero je bilo vključenih 205,329 glivnih izolatov iz 134 zdravstvenih centrov iz Latinske Amerike, Evrope, Severne Amerike, Azijsko-pacifiške regije, Afrike in Bližnjega Vzhoda. Raziskava je potekala med leti 1997 in 2005, od vseh glivnih izolatov so glive rodu *Candida* predstavljale 95,7 %.

Najpogosteje zastopana vrsta je bila *C. albicans* (65,6 %) sledila je *C. glabrata* (11,1 %). *C. parapsilosis* se je pojavila v 6,1 % vseh izolatov, vendar se je incidenca v letih od 1997 do 2005 od 4,8 % povečala na 6,6 % (Pfaller in sod., 2007).

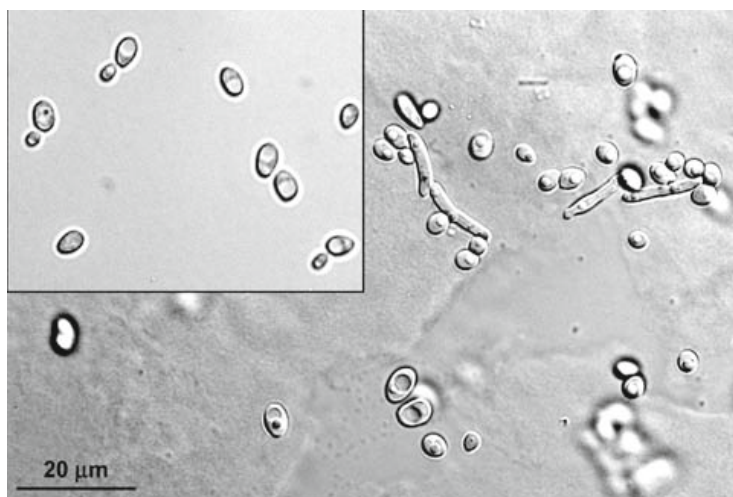
V okviru programa ARTEMIS je raziskavo izvedel tudi Lockhart s sodelavci. Med leti 2001 in 2006 so zbrali 1929 kliničnih izolatov, katere so z uporabo sistema Vitek in preostalih konvencionalnih metod sprva identificirali kot *C. parapsilosis*. Kar 151 izolatov je bilo zmotno poimenovanih. 117 izolatov je bilo v resnici *C. orthopsilosis* (6,1 %), 34 izolatov pa *C. metapsilosis* (1,8 %) (Lockhart in sod., 2008).

Izolate *C. orthopsilosis* in *C. metapsilosis* je Lockhart s sodelavci dokazala na vseh šestih kontinentih, od koder so bili izolati poslani, vendar geografska porazdelitev le-teh ni bila enakomerna. *C. orthopsilosis* so najpogosteje izolirali v Južni Ameriki (10,9 %), najredkeje pa v Afriki (0,7 %). Porazdelitev odstotkov izolatov se je v Južni Ameriki močno razlikoval: od 16,5 % in 16,0 % v Venezueli oz. Braziliji, do manjših deležev 4,3 % in 3,1 % v Ekvadorju oz. Argentini. V Severni Ameriki je *C. orthopsilosis* predstavljala 5,0 % izolatov kompleksa *C. parapsilosis*, pri čemer je bilo v ZDA 4,9 % izolatov *C. orthopsilosis*, v Mehiki pa je odstotek znašal 10,7 %. Pri 52 kanadskih izolatih, niso zaznali *C. orthopsilosis*. Skupen delež izolatov iz Evrope in Bližnjega Vzhoda je znašal 3,5 % (17 izolatov). Delež izolatov *C. orthopsilosis* se je med izvedbo raziskave povečeval. V prvih štirih letih je povprečen odstotek znašal 4,5 %, v zadnjih dveh letih raziskave pa je poskočil celo na 8,3 %. V Severni Ameriki so pri 646 poslanih izolatih potrdili le štiri primere *C. metapsilosis*, v Afriki pa so med 146 izolati našli le en tak primer. V Evropi je bil delež izolatov *C. metapsilosis* podoben tistemu *C. orthopsilosis*; potrdili so 14 izolatov (2,9 %) (Lockhart in sod., 2008).

Kar 77 % vseh izolatov *C. orthopsilosis* in 60 % vseh izolatov *C. metapsilosis* je bilo izoliranih iz krvnega obtoka. Kot primerjavo navajajo, da je okužbo krvnega obtoka povzročalo 79 % vseh izolatov *C. parapsilosis* (Lockhart in sod., 2008).

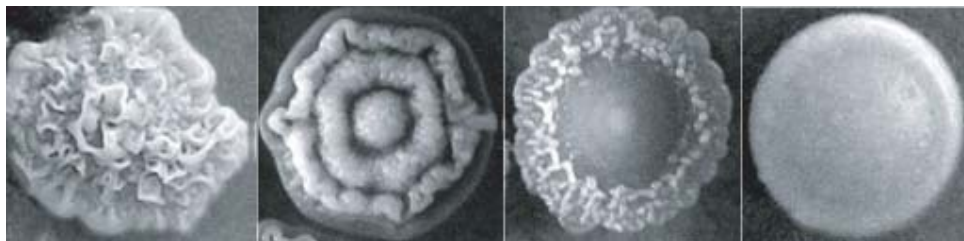
2.2 MORFOLOGIJA

Celice *C. parapsilosis* so ovalne, okrogle ali cilindrične oblike (Slika 1). Kolonije, ki zrastejo na Sabouraud dekstroznem agarju (SABA) so bele, kremaste, svetleče, lahko so suhe, gladke ali nagubane. *C. parapsilosis* ne tvori pravih hif in lahko obstaja tako v kvasni kot psevdohifalni obliki. Pseudomicelij lahko opazujemo na koruznem agarju s svetlobnim mikroskopom.



Slika 1: Celice *C. parapsilosis* (Nosek in sod., 2009)

Zadnje raziskave nakazujejo, da je tvorba psevdohif močno povezana z dostopnostjo določenih aminokislin, še posebej aminokislina citrulin. Ta povzroči celične spremembe, ki se kažejo v spremembi videza kolonij. Obliko kolonij (Slika 2) pogojuje morfološki tip *C. parapsilosis*. Pri kvasni obliki lahko opazujemo gladke oz. kraterske kolonije medtem, ko so za psevdohife značilne krepaste oz. koncentrično oblikovane kolonije (Trofa in sod., 2008).



Slika 2: Štirje stabilni in dedni fenotipi kolonij *C. parapsilosis*: krep, koncentrična, kraterska in gladka oblika (Laffey in Butler, 2005)

2.3 VIRULENČNI DEJAVNIKI *C. parapsilosis*

C. parapsilosis lahko povzroči invazivno okužbo brez predhodne kolonizacije, do okužbe lahko pride horizontalno preko zunanjih virov, kot so medicinski pripomočki, roke zdravstvenih delavcev, prostetični vsadki in katetri. Kljub poglobljenim in intenzivnim študijam je sorazmerno malo znanega o virulenčnih dejavnikih *C. parapsilosis*, med njimi velja izpostaviti predvsem adherenco na gostiteljske celice, tvorbo biofilmov in izločanje različnih hidrolitičnih encimov; proteaz, fosfolipaz in lipaz (Trofa in sod., 2008).

2.3.1 Adherenca na gostiteljske celice

Kolonizacija ter okužba s *C. parapsilosis* je odvisna od sposobnosti pritrjevanja glivnih celic na gostiteljske celice oziroma tkiva, še posebej na sluznične površine. Adherenco na trajno vstavljene medicinske vsadke olajša tvorba biofilma, pospeši se poškodba gostiteljskega tkiva. Primarno vezavo *C. parapsilosis* na površine pospeši hidrofobnost površine, vezavo na plastične katetre pa so pripisali njeni sposobnosti tvorbe sluzi (Trofa in sod., 2008).

Prva širše zastavljena študija, ki je primerjala vezavo *C. albicans* in *C. parapsilosis* (12 in 14 izolatov), je zabeležila kar 20,6 % večjo avidnost *C. parapsilosis* za bukalne oz. lične epitelijske celice (BEC) ter kar 143,7 % večjo adhezijo na akrilne materiale. Pri tem bi bilo lahko večje število vezanih celic *C. parapsilosis* posledica sprjetja samih kvasnih celic. Omenjena zmožnost tvorbe agregatov na epitelijskih površinah je pogosteje opažena pri *C. parapsilosis* kot pa *C. albicans*. Opazili so tudi, sicer statistično neznačilen podatek, da je bila avidnost BEC površinskih izolatov *C. parapsilosis* za kar 51,5 % večja od

tiste pri sistemskih izolatih (Trofa in sod., 2008).

2.3.2 Tvorba biofilma

Skupke mikroorganizmov, ujete v ekstrapolisaharidni matriks, ki rastejo na nosilcu imenujemo biofilm. Le-ti so ena najpogostejših oblik mikrobne rasti. Izolati *C. parapsilosis* proizvajajo bistveno manj biofilma kot sevi *C. albicans*. Biofilm je strukturno manj kompleksen, saj ne vsebuje ekstracelularnega matriksa in hif. Morfologija biofilma *C. parapsilosis* zato na trenutke spominja na tisto pri bakterijah (Kuhn in sod., 2002a). Nekateri filamentozni oz. psevdohifalni fenotipi *C. parapsilosis*, katerih rast v agar je invazivnejša, lahko proizvedejo več biofilma kot kvasne oblike fenotipov (Laffey in Butler, 2005).

Za tvorbo biofilma je potrebna vezava na tkiva ali medicinske vsadke kar vodi do sprememb morfologije in obnašanja organizma. *C. parapsilosis* najpogosteje tvori biofilm na različnih medicinskih vsadkih, vključno z osrednjimi ali perifernimi venskimi katetri, hemodializnimi katetri, katetri za peritonealno dializo ter intrakardialnih vsadkih in prostetičnih sklepkih (Ramage in sod., 2004). *C. parapsilosis* je komenzal na človeški koži in do same okužbe vsadkov lahko pride ob uvajanju vsadka v bolnika (torej s prenosom bolnikove kožne flore) ali prek kožne flore rok osebja, ki skrbijo za bolnika med njegovim bivanjem v bolnici. V bolnišničnih okoljih se skrbi za higieno velikokrat posveča premalo pozornosti. Omeniti je potrebno, da so izolate *C. parapsilosis* z povečano tvorbo biofilmov, nedavno povezali z izbruhi okužb v bolnišničnem okolju (Kuhn in sod., 2004).

Tvorba biofilma je pomemben virulenčni dejavnik številnih vrst *Candida*. Glivam omogoča odpornost proti antimikotikom, saj omejuje njihovo prodiranje skozi matriks ter tako ščiti celice pred gostiteljevim imunskim odzivom (Trofa in sod., 2008). Izolatom gliv *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* in *C. glabrata*, ki tvorijo biofilm, so pripisovali signifikantno višje stopnje smrtnosti pri pacientih na eni izmed italijanskih univerz. Slednja je bila 70 %, kar je v primerjavi z 45,7 % kolikor je znašala v primeru, ko izolirane vrste niso tvorile biofilma, bistveno višja. Razlika je še posebej očitna v primeru *C. parapsilosis*, saj je stopnja smrtnosti v primeru okužbe s sevi, ki tvorijo biofilm, znašala

71,4 %. V primeru okužbe s sevi, ki niso bili sposobni tvorbe biofilma, je bila smrtnost 28 % (Tumbarello in sod., 2007). Čeprav je struktura biofilma *C. parapsilosis* manj kompleksna od tiste pri *C. albicans*, pa sta biofilma podobno odporna proti običajnim, konvencionalnim antimikotikom, kot so amfotericin B, azoli ipd. Terapevtske doze ehinokandinov in amfotericina B v lipidnem kompleksu lahko dokazano učinkovito inhibirajo metabolno aktivnost biofilma *C. parapsilosis* (Kuhn in sod., 2002b).

2.3.3 Sekrecijski encimi

Zunajcelični sekrecijski encimi imajo pomembno vlogo v patogenezi mikroorganizmov. Mednje prištevamo tudi aspartatne proteinaze, fosfolipaze in lipaze.

2.3.3.1 Aspartatne proteinaze (Saps)

To je družina dobro opredeljenih encimov -Sap1p do Sap10p, s številnimi funkcijami. Ti encimi razgrajajo pomembne imunološke in strukturne obrambne proteine kot so težke verige imunoglobulinov IgG, α_2 -makroglobulin, C3 protein, β -laktoglobulin, laktoperoksidaze, kolagen in fibronektin (Trofa in sod., 2008). Razgradnja proteinov epiteljskih in sluzničnih barier jim tako pomaga pri širjenju okužbe, invaziji v tkiva in spodbujanju vnetnega odziva (Furlan, 2009). V primerjavi z *C. albicans* ima *C. parapsilosis* manjšo Sap aktivnost. Pri *C. parapsilosis* so identificirali tri Sap proteine, o dveh se ve zelo malo. Sapp1 izoencim so biokemično karakterizirali. Gen *SAPP2P* je bil sprva označen za psevdogen, vendar pa proizvaja funkcionalno proteinazo. Sapp2 predstavlja 20 % vseh Sap proteinaz izoliranih iz supernatanta kulture. Proteinaza Sapp3p oz. *SAPP3* še ni bila raziskana prav tako ostaja neznana vloga Sap proteinaz v patogenezi glivičnih okužb (Trofa in sod., 2008). Med sevi *C. parapsilosis* se tvorba Sap proteinaz spreminja, kljub temu pa je vidna povezava med mestom izolacije in tvorbe Sap. Tako vulvovaginalni kot kožni izolati *C. parapsilosis* izkazujejo večjo in vitro Sap aktivnost od izolatov osamljenih iz krvi (Trofa in sod., 2008; De Bernardis in sod., 1999). Med inhibitorje Sap prištevamo pepstatin A, ki prepreči začetek prodora *C. albicans* in

C. parapsilosis preko sluznične površine. Sap so tako potencialna tarča za nadaljnji razvoj zdravil (Trofa in sod., 2008).

2.3.3.2 Fosfolipaze

Fosfolipaze poškodujejo membrane gostiteljskih celic. Cepijo estrske vezi glicerofosfolipidov in s tem olajšajo vstop glive v gostiteljska tkiva. Vloga fosfolipaz v patogenezi *C. parapsilosis* ni dobro poznana. V literaturi najdemo protislovne rezultate o fosfolipazni aktivnosti. Ponekod aktivnosti ne zasledijo, drugi jo zasledijo pri več kot 50 % sevov. Razlike se kažejo tudi ob primerjavi sistemskih in površinskih izolatov. Nekatere študije so odkrile fosfolipazno aktivnost le pri izolatih iz krvnega obtoka medtem, ko drugi opisujejo znatno višje aktivnosti pri površinskih izolatih v primerjavi s sistemskimi izolati (Trofa in sod., 2008).

2.3.3.3 Lipaze

Lipaze katalizirajo hidrolizo in sintezo triacilglicerolov. Stabilni so v organskih raztopinah in pri visokih temperaturah, proteoliza jih ne razgradi. Med domnevne naloge mikrobnih zunajceličnih lipidov, štejejo razgradnjo lipidov v prehranske namene, vezavo na gostiteljske celice oz. tkiva, sinergistično delovanje s preostalimi encimi, iniciacijo vnetnih procesov, saj vplivajo na imunske celice ter samoobrambo z lizo sosednje konkurenčne mikroflore. Zunajcelične lipaze so potencialni virulentni dejavniki številnih bakterijskih patogenov, vključno s *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Propionibacterium acnes* in *Pseudomonas aeruginosa* ter nekaterih gliv: *Malassezia furfur*, *Hortaea werneckii* in *Candida albicans*. Pri *C. parapsilosis* so našli dva lipazna gena CpLIP1 in CpLIP2, vendar le slednji kodira aktivni encim. Poleg omenjenih genov, naj bi obstajala še dva dodatna LIP gena, katerih ekspresija lahko pojasni rast *C. parapsilosis* v olivnem olju ali *in vivo*. Nedavne raziskave potrjujejo, da lipazni inhibitorji bistveno zmanjšajo poškodbo tkiv med okužbo s *C. parapsilosis*. Dokazano je tudi, da homozigotne mutante CpLIP1-CpLIP2 tvorijo tanjši in manj kompleksen biofilm. Njihova rast v gojiščih, obogatenih z lipidi, je manjša, makrofagi jih lažje prebavijo prav tako, pa so manj virulentni kot divji tipi *C. parapsilosis*. Omenjeni rezultati so pomembni predvsem s stališča neonatalne oskrbe. *C. parapsilosis* pogosto povzroča okužbe nedonošenčkov in

novorojenčkov z nizko porodno težo, ki prejemajo z lipidi obogateno parenteralno prehrano (Trofa in sod., 2008).

2.4 OKUŽBE POVZROČENE s *Candida* spp.

Okužbe, ki jih povzročajo glive iz rodu *Candida* imenujemo kandidoze ali kandidiaze. Razdelimo jih na povrhnje in sistemske. Pri prvih se bolezenski znaki izražajo na koži, nohtih, laseh in sluznicah. Do okužbe pride zaradi lokalnih pogojev na telesnih površinah, ki sicer normalnim prebivalcem mikrobne flore, kamor prištevamo tudi kandidate, omogočijo, da se prekomerno razmnožijo in povzročijo vnetne spremembe. Med sistemske kandidoze sodijo obolenja, ki prizadenejo različne notranje organe in organske sisteme. Bolezni lahko potekajo v akutni ali kronični obliki, okužbe z njimi so zlasti pogoste pri ljudeh z zmanjšano obrambno sposobnostjo. Potek bolezni je običajno težak in jo spremlja visoka smrtnost.

2.4.1 Povrhnje oblike kandidoze

2.4.1.1 Kandidoza kože in nohtov

Kožna kandidoza se najpogosteje pojavlja na mestih, ki so pogosto vlažna, topla. Kožne spremembe se v začetku kažejo v obliki drobnih mehurčkov in papul, koža je pordela, spremembe imajo nejasne, zabrisane robove, spremlja jih bolečina in srbenje. Najpogostejša mesta pojavljanja so med prsti rok in nog, pod dojkami, v kožnih gubah, na primer pod pazduhami, v perigenitalnem področju in okoli anusa. K večjemu pojavljanju kožne kandidoze so nagnjeni sladkorni bolniki in ljudje s prekomerno telesno težo. Tudi določeni poklici, kot so na primer frizerke, pomivalke, čistilke, gostinski delavci pogosteje zbolevajo zlasti za kandidozo na področju kože med prsti rok. Pogosto jo spremlja še prizadetost enega ali več nohtov. Vneto obnohtno tkivo imenujemo paronihija, onihomikoza pa je glivična okužba nohta. Noht postane zadebeljen, lomljiv, neraven, sčasoma odstopi od podlage in porumeni. *C. parapsilosis* je bila le redko omenjena kot povzročiteljica patoloških sprememb na nohtih, saj je le-ta komenzal, vendar se počasi uveljavlja kot eden pomembnih povzročiteljev kandidemične onihomikoze. Najpogosteje jo osamimo iz podnohtnega predela nohta (Trofa in sod., 2008). Otomikoza ali glivično vnetje ušesa najpogosteje prizadene sluhovod. Govorimo o glivičnem vnetju zunanega

ušesa (otitis externa). Za okužbo je značilno izcejanje bele, gnojave vsebine, bolečine, srbenje in zmanjšan sluh. Približno enakovredno so med povzročitelji zastopane *C. albicans* in *C. parapsilosis*, med pomembne povzročitelje pa sodita tudi *Aspergillus fumigatus* in *A. niger*. Pomen osamitve gliv iz brisov zunanjega sluhovoda je pogosta tema razprav, saj je težko opredeliti kdaj gre za okužbo in kdaj je osamitev le posledica komenzalne flore. Simptome in znake vnetja je mogoče učinkovito pozdraviti z lokalnim nanašanjem antimikotikov (Vennewald in sod., 2003).

2.4.1.2 Sluznična kandidoza

Ustna kandidoza se kaže v več kliničnih oblikah, ki jih razdelimo v akutne in kronične. Kronično kandidozo nadalje razdelimo še v atrofične in hiperplastične oblike. Najpogostejša oblika ustne sluznične kandidoze je pseudomembranozna oblika ali soor. Klinično se kaže v obliki kremno belih, rahlo privzdignjenih lahko odstranljivih plakov na površini sluznice. Po odstranitvi sluznica ostane rdeča ali plitko razjedena. Soor se pojavlja pri otrocih in odraslih, prehodni pojavi so pogosti zlasti pri novorojenčkih in majhnih otrocih. Ti minejo spontano in razlogi za njihov nastanek niso znani. Ponavljanje psevdomembranozne kandidoze ustne sluznice pri odraslih kaže na prisotnost dejavnika tveganja, ki povečuje verjetnost za nastanek te okužbe. Njen pojav je lahko prvi znak napredovanja okužbe s HIV-om v aids. Med dejavnike tveganja za njen nastanek prištevajo tudi zdravljenje z antibiotiki, zdravljenje s kemoterapevtiki in obsevanje na področju ustne votline, nošenje zobne proteze, sladkorno bolezen, slabo ustna higiena in kajenje. Daleč najpogostejši povzročitelj je *C. albicans*, ki se pojavlja v več kot 90 % primerih. Ostale vrste so pogostejše pri bolnikih, ki so že predhodno prejeli antimikotike. Med pogoste sluznične kandidoze sodi tudi vulvovaginitis. Klinično se kaže z oteklino, pordelostjo in belimi oblogami. Spremljajo ga bolečina, srbenje in belkast izcedek. Tudi v tem primeru je najpogostejši povzročitelj *C. albicans*, druge vrste se pojavljajo zelo redko. Druge vrste so udeležene zlasti ob ponavljajočem se vnetju, zato je pri diagnostiki potrebna natančna identifikacija in testiranje občutljivosti, da se izbere pravi antimikotik za zdravljenje. *C. parapsilosis* iz ženskih spolovil lahko osamimo tudi pri asimptomatskih ženskah in jih interpretiramo kot del mikrobne flore. Izolati *C. parapsilosis* osamljeni pri ženskah s

simptomi vulvovaginitisa so *in vitro* izločali več aspartatinih proteinaz kot izolati nosilk brez simptomov (Agatensi in sod., 1991).

2.4.2 Invazivna kandidoza

2.4.2.1 Akutna diseminirana kandidoza (hematogena kandidoza)

Pri akutni diseminirani kandidozi kandidate vdrejo v krvni obtok, imenujemo jo tudi hematogena kandidoza. Fungemija lahko vodi do poškodb tkiv in organov ter do njihovega okrnjenega delovanja. Poleg povišane telesne temperature in drugih dejavnikov vnetja so pri bolnikih pogosto prisotni še znaki septičnega šoka in odpovedi ledvic. Okužba je v veliki večini primerov endogena. Kandidate najpogosteje v krvni obtok vdrejo preko poškodovane črevesne stene ali iz kože, preko okuženih žilnih katetrov. *C. parapsilosis* je ena najpogostejših vrst, ki povzročajo invazivne glivične bolezni. Almirante je v Barceloni preučeval fungemijo v letih od 2002 do 2003. V kar 23 % vseh primerov je fungemijo povzročala *C. parapsilosis*, v 51 % primerov so kot vir okužbe navedli intravenozne katetre. Kot osnovno bolezen bolnikov so najpogosteje zabeležili rakava obolenja (27 %), zdravljenje s presaditvijo krvotvornih matičnih celic in čvrstih organov (16 %) in sladkorno bolezen (9 %). V primerjavi z *C. albicans* povzroča *C. parapsilosis* okužbe pogosteje pri novorojenčkih (20 % proti 4 %), bolnikih z intravenoznimi katetri (26 % proti 7 %), bolnikih, ki prejemajo parenteralno prehrano (54 % proti 33 %) ter bolnikih po transplantaciji (16 % proti 2 %). *C. albicans* je okužbo pogosteje povzročala pri starejših bolnikih (54 % proti 27 %) in bolnikih s sladkorno boleznijo (25 % proti 9 %) (Almirante in sod., 2006). Povprečna smrtnost zaradi okužbe z *C. parapsilosis* naj bi znašala približno 28,5 %, medtem ko je le-ta za okužbo z *C. albicans* 44,8 % (Trofa in sod., 2008).

Ob hematogenem razsoju mikroorganizmov lahko pride tudi do poškodbe zaklopk srca in velikih žil, kar imenujemo septični endokarditis. Glivični endokarditis predstavlja kar od 1,3 do 6,0 % vseh primerov infektivnega endokarditisa. Incidenca glivičnega endokarditisa je v zadnjih dveh desetletjih narasla, predvsem zaradi izboljšanja diagnostičnih preiskav, ki okužbo zaznajo. Vrste *Candida* so odgovorne za kar 94,1 % vseh primerov glivičnega endokarditisa, slednji se najpogosteje razvije po operacijah krvožilnega sistema (Trofa in sod., 2008). Najpogostejši povzročitelj je *C. albicans*, sledi ji *C. parapsilosis*, ki jo

povezujejo s kar 17 % vseh primerov. Med dejavnike tveganja za nastanek glivičnega endokarditisa sodijo vstavljene umetne zaklopke (57,4 %), intravenozno uživanje drog (20%), intravenozno zdravljenje (6,9 %), operacije trebuha (6,9 %), imunska oslabiljenost (6,4 %), zdravljenje s široko spektralnimi antibiotiki (5,6 %) in že obstoječe okužbe zaklopk (4,8 %) (Garzoni in sod., 2007). *C. parapsilosis* povzroči razvoj endokarditisa v času fungemije, ko je poškodovano tkivo najbolj izpostavljeno in dovzetno za okužbo. Pri okužbi srca je največkrat prizadeta aortna zaklopka (56,9 %), sledi mitralna zaklopka (29,1%), prizadeta pa je lahko tudi trikuspidalna zaklopka (4,1 %), ventrikularna stena (2,8 %) ali pulmonarna zaklopka (1,4 %). Smrtnost pri *C. parapsilosis* endokarditisu je podobna kot, če okužbo povzroča *C. albicans*, pri čemer se skupna smrtnost giblje med 41,7 % in 65 %. Idealno zdravilo za zdravljenje endokarditisa še ni znano. Kombinacija kirurške odstranitve zaklopke (naravne ali umetne) in agresivnega antimikotičnega zdravljenja naj bi postregla z najučinkovitejšim zmanjšanjem stopnje smrtosti.

2.4.3 Kronična diseminirana kandidoza

Imenujemo jo tudi hepatosplenična kandidoza. Pojavlja se skoraj izključno pri dlje časa trajajoči motnji delovanja kostnega mozga in nevtropeniji. Za to obliko sistemske kandidoze zbolevalo predvsem bolniki s hematološkimi malignimi obolenji, kot so levkemije in limfomi. Hemokulture so redko pozitivne. Prizadeta so jetra in vranica v obliki vnetnih žarišča ali abscesov.

2.5 ANTIMIKROBNA OBČUTLJIVOST

Zdravljenje invazivnih bolezni, ki jih povzroča *C. parapsilosis*, se praktično ne razlikuje od zdravljenja kandidoz, ki jih povzročajo druge vrste tega rodu. Priporočajo odstranitev tujkov, žilnih kanalov in čimprejšnjo uvedbo občutljivega antimikotika. Med najstarejše antimikotike, sodijo polieni in med njimi je še vedno v uporabi amfotericin B. Ima veliko afiniteto do ergosterola v membrani celic. Zaradi amfipatične oblike molekul se te vgradijo v membrano in tvorijo kanale, preko katerih pride do spremenjene prepustnosti, sledi izguba vitalnih sestavin citoplazme in smrt mikroorganizma.

Klasične oblike amfotericina B imajo veliko stranskih učinkov, posebno velik je njihov toksičen vpliv na ledvice. Raziskave so vodile v razvoj lipidnih pripravkov amfotericina B, ki imajo podobno delovanje, a so manj nefrotoksični. Posamezni objavljeni primeri poročajo o 2-3 % odpornosti *C. parapsilosis* proti amfotericinu B v *in vitro* pogojih, dokumentirani pa so tudi primeri odpornih infektivnih sevov (Trofa in sod., 2008). Povprečne vrednosti MIK₅₀ (minimalna inhibitorna koncentracija) in MIK₉₀ amfotericina B za *C. parapsilosis*, pridobljene z različnimi metodologijami, se gibljejo med 0,13 do 1 µg/ml oziroma med 0,5 in 1 µg/ml (Ostrosky-Zeichner in sod., 2003; Pfaller in sod., 1998a). Najpogostejši antimikotik, ki se uporablja za zdravljenje invazivnih kandidoz v zadnjem obdobju je flukonazol. Sodi v skupino azolov. Zavira encim lanosterol demetilazo, ki je encim v biosintetski poti ergosterola, najpomembnejšega sterola v membranah glivnih celic. *In vitro* odpornost proti flukonazolu so pri vrstah, ki niso *albicans*, najpogosteje zaznali pri *C. glabrata*, medtem ko *C. krusei* poseduje naravno odpornost proti temu antimikotiku (Pfaller in sod., 1998b; Tortorano in sod., 2003). Mnenja o tem ali je uporaba flukonazola vplivala na spekter kandidemij, so razdeljena. Slednjo naj bi ob uporabi flukonazola pogosteje povzročale vrste, ki niso *albicans*. *In vitro* testi občutljivosti so pokazali, da frekvenca odpornosti proti flukonazolu niha med 0 in 4,6% (Ostrosky-Zeichner in sod., 2003; Pfaller in sod., 2007; Pfaller in sod., 2003; Pfaller in sod., 1998b) medtem, ko povprečne MIK₅₀ in MIK₉₀ vrednosti varirajo med 0,5-1 µg/ml oziroma 1-2 µg/ml (Ostrosky-Zeichner in sod., 2003; Pfaller in sod., 1998a).

Med azoli, je bila zaznana *in vitro* odpornost *Candida* spp. proti itrakonazolu. Za izolate *C. parapsilosis* se le-ta giblje med 1,5 % in 4 %. V primerjavi z amfotericinom B so za vorikonazol značilne nižje vrednosti MIK₅₀ ($\leq 0,03\mu\text{g/ml}$) in MIK₉₀ ($\leq 0,03\text{-}0,12\ \mu\text{g/ml}$) (Messer in sod., 2006; Ostrosky-Zeichner in sod., 2003; Pfaller in sod., 1998b). *In vitro* odpornost proti vorikonazolu je redka, starejše objave poročajo o kar 100 % občutljivosti *Candida* spp. na ta antimikotik (Pfaller in sod., 2003). V eni novejših raziskav, ki je vključevala 9371 izolatov *C. parapsilosis*, je bilo le 1,9 % sevov odpornih proti vorikonazolu in kar 36,7 % sevov, odpornih proti flukonazolu, je bilo občutljivih na vorikonazol (Pfaller in sod., 2007). Omenjen primer dokazuje pojav navzkrižne odpornosti proti azolom. Odpornost proti vorikonazolu se je razvila tudi pri kliničnih sevih, ki so bili

predhodno izpostavljeni zdravljenju z flukonazolom (Trofa in sod., 2008), v času izbruhov pa so se pojavili tudi sevi z zmanjšano občutljivostjo tako na vorikonazol kot flukonazol (Clark in sod., 2004).

Dandanes je v uporabi, čeprav redkeje, tudi flucitozin in sicer v kombinaciji z amfotericinom B ali azoli. Uporabljajo ga v glavnem za zdravljenje kandidoznega meningitisa, ko je zdravljenje z le enim antimikotikom kontraindicirano oz. obstaja tveganje za razvoj odpornosti. Samo tveganje se pojavi na primer pri bolnikih z endokarditisom, ki so deležni podaljšane zdravljenja. Študija iz leta 1975 je sicer poročala o kar 23 % *in vitro* odpornosti proti flucitozinu za *C. parapsilosis*, vendar pa se je ta stopnja v novejših objavah zmanjšala na 2-6,4 % (Ostrosky-Zeichner in sod., 2003).

Ehinokandini so najnovejša skupina antimikotikov za zdravljenje glivičnih okužb. V le-to spadajo kaspofungin, mikafungin in anidulafungin. Omenjena zdravila ovirajo sintezo celične stene, saj inhibirajo (1, 3)- β -D- glukan sintazo. Slednja oblikuje polimere glukana, eno glavnih sestavin celične stene gliv. Kaspofungin je enako uspešen, celo manj toksičen antimikotik in tako primeren za zdravljenje invazivne kandidiaze, povzročene s strani gliv *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. guilliermodii*, *C. lipolytica* in *C. rugosa*. Vendar pa so minimalne inhibitorne koncentracije kaspofungina za *C. parapsilosis* višje kot pri ostalih vrstah *Candida*, povprečne vrednosti MIK_{50} in MIK_{90} se gibljejo med 0,85-2 μ g/ml oziroma 2-2,33 μ g/ml (Ostrosky-Zeichner in sod., 2003; Kuhn in sod., 2002b). Mehanizem odpornosti proti kaspofunginu sicer ni znan, a veliko naj bi k njej pripomogle strukturne razlike sestavin celične stene, zmanjšana afiniteta za proteinski kompleks glukan sintazo ali pa so v mehanizmu odpornosti vključeni tudi regulatorni mehanizmi (Trofa in sod., 2008). Odpornost proti kaspofunginu mnogi avtorji povezujejo celo z mutacijami v dveh visoko ohranjenih (konzervativnih) regijah Fks1p, vroči točki 1 in vroči točki 2 (*angl.* hot spots) (Park in sod., 2005; Garcia-Effron in sod., 2008). Zmanjšano občutljivost za kaspofungin nekaterih izolatov naj bi bilo moč pripisati naravnemu polimorfizmu aminokislin. Do slednjega naj bi prišlo v »ohranjeni« Fks1p vroči točki 1, kjer pride na poziciji 660 do substitucije aminokislinske prolin v alanin (Garcia-Effron in sod., 2008).

Podobno občutljivost zasledimo tudi pri drugih derivatih ehinokandinov. Povprečne vrednosti MIK_{50} mikafungina znašajo približno 1 $\mu\text{g/ml}$, povprečne vrednosti MIK_{90} pa ≥ 2 $\mu\text{g/ml}$. Povprečne vrednosti MIK_{50} anidulafungina so okoli 2 $\mu\text{g/ml}$, povprečne vrednosti $MIK_{90} \geq 2$ $\mu\text{g/ml}$ (Ostrosky-Zeichner in sod., 2003, Trofa in sod., 2008). Kljub povišanim vrednostim MIK ehinokandinov so te vrednosti še vedno v območju občutljivosti. Zaradi novejših epidemioloških študij, ki nakazujejo na povezavo med povečano uporabo ehinokandinov in zvišano incidenco *C. parapsilosis* kandidemije, je premišljeno predpisovanje teh antimikotikov velikega pomena (Trofa in sod., 2008).

2.5.1 Metode za testiranje občutljivosti gliv na antimikotike

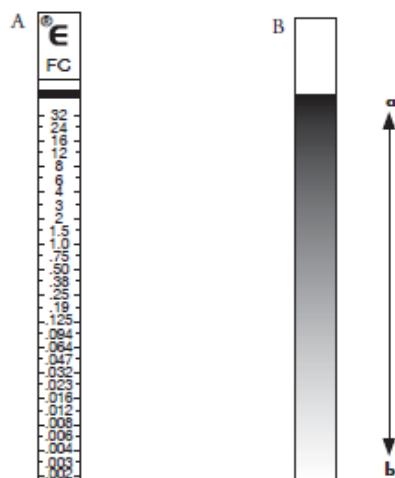
Testiranje občutljivosti gliv za antimikotike skokovito pridobiva na svojem pomenu, predvsem zaradi povečane incidence sistemskih glivičnih okužb in velikega števila antimikotikov, ki so na voljo za sistemsko zdravljenje. Občutljivost za antimikotike je zato pomemben podatek, ki usmerja zdravnike pri izbiri ustreznega zdravljenja. Podkomisija za testiranje antimikotične občutljivosti pri Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) je tako leta 1992 prvič opisala standardizirano referenčno metodo, ki so jo kasneje dopolnili in je sedaj v veljavi dokument M27-A3 iz leta 2008 (CLSI M27-A3, 2008). Metoda je standardizirana za testiranje občutljivosti povzročiteljev glivnih okužb iz rodu *Candida* in *Cryptococcus neoformans*. Zagotavlja ponovljivost in primerljivost rezultatov, zaradi česar se je uveljavila po vsem svetu in omogočila razcvet raziskav na tem področju. V dokumentu sta opisani makrodilucijska in mikrodilucijska tehnika. Opredeljeni so velikost inokuluma, čas in trajanje inkubacije, medij za testiranje in merila za odčitavanje rezultatov (Pfaller in sod., 1994).

2.5.1.1 Metoda difuzije antimikotičnega gradienta (Etest)

Etest ali metoda difuzije antimikotičnega gradienta, je ena izmed metod, ki omogočajo enostavnejše določanje občutljivosti gliv za antimikotike (AB Biodisk, Solna, Švedska). Etest temelji na kombinaciji dilucijskih in difuzijskih testov. Etest direktno ovrednoti občutljivost v obliki diskretnih vrednosti MIK, s čimer se približa dilucijskim testom.

Zaradi definirane in zveznega koncentracijskega gradienta so lahko odčitane MIK vrednosti veliko bolj natančne, kot pri običajnih testih, ki temeljijo na nezveznih serijskih oz. dvojnih redčitvah. Čeprav je postopek enak kot pri disk difuzijskem testu, pa zvezni gradient anitmikotika pri Etestu omenjeni metodi jasno ločuje. MIK vrednosti določene z Etestom, za razliko od disk difuzijske metode, niso povezane z molekulsko maso, vodotopnostjo in difuzijo antimikotika ali z različnimi rastnimi stopnjami kvasovk (Etest, 2009a).

Etest je tanek, inerten, neporozen, plastičen trak dimenzij 5×60 mm. Na eni strani traku se nahaja usmerjena lestvica vrednosti koncentracij antimikotika (v $\mu\text{g/ml}$), ter dvo-črkovna kratica antimikotika (Slika 3A). Na drugi strani pa je eksponenten gradient posušenega in stabiliziranega antimikotika (Slika 3B). Zvezni gradient obsega koncentracijsko območje, ki ustreza 15-im dvojnim (*angl.* two-fold) razredčitvam po običajnih razredčitvenih metodah. Ko položimo test na nacepljeno trdno gojišče pride do takojšnjega sproščanja antimikotika iz plastične površine v matriks agarja. Neposredno pod trakom se vzpostavi zvezen in stabilen gradient koncentracije antimikotika. Sledi inkubacija inokuliranih plošč. Ko je rast gliv vidna, se vzdolž Etesta pojavi simetrična inhibicijska elipsa. Na mestu, kjer rob elipse seka Etest, odčitamo vrednost MIK.

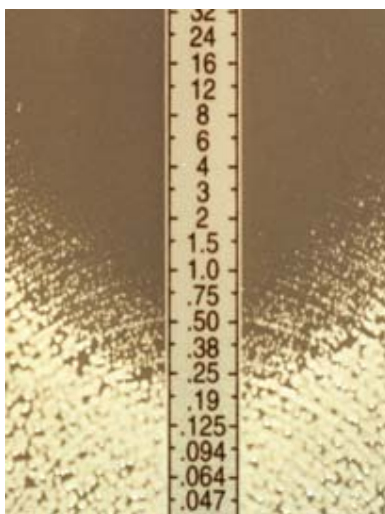


Slika 3: Umerjena lestvica vrednosti koncentracij antimikotika ($\mu\text{g/ml}$) z dvočrkovno kratico antimikotika na vrhu traku Etesta (A) in eksponenten gradient posušenega in stabiliziranega antimikotika (B), pri čemer je (a) maksimalna koncentracija in (b) minimalna (Etest, 2009a)

Pri azolnih antimikotikih kot sta flukonazol in vorikonazol je MIK po CLSI opredeljen kot koncentracija, kjer je glivna rast zavrta 80 % (slika 4), medtem, ko mora biti le-ta pri polienskih anitmikotikih kot je amfotericin B zavrta 100 % (slika 5). Omenjeno pravilo upoštevamo tudi pri odčitavanju rezultatov Etesta (Etest, 2009a).

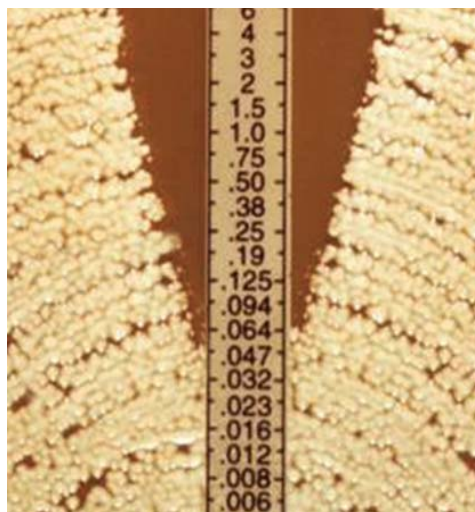
Preglednica 1: Koncentracijska območja gradienta antimikotikov na Etestu (Etest, 2008)

Antimikotik	Oznaka	MIK ($\mu\text{g/ml}$)
Flukonazol	FL	0,016 – 256
Vorikonazol	VO	0,002 – 32
Amfotericin B	AP	0,002 – 32
Kaspofungin	CS	0,002 – 32



Slika 4: Odčitavanje MIK vrednosti pri azolih (flukonazol), ko je glivna rast 80 % zavrta (0,25 $\mu\text{g/ml}$).

Prisotne so tudi mikrokolonije, značilne za *C. parapsilosis* (Etest, 2009b)



Slika 5: Odčitavanje MIK vrednosti pri polienih (amfotericin B), ko je glivna rast 100 %
(0,094 $\mu\text{g/ml}$, Etest, 2009b)

2.6 PRISTOPI K LOČEVANJU *C. parapsilosis* KOMPLEKSA NA TRI GENOTIPSKO LOČENE VRSTE: *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis* in *C. metapsilosis*

Že zgodnji poskusi analize polimorfizma restrikcijskih fragmentov so kazali na genotipsko heterogenost izolatov *C. parapsilosis*, ki je bila večja kot pri ostalih vrstah *Candida*. Izolate *C. parapsilosis* kompleksa lahko ločimo na tri vrste, *C. parapsilosis*, *C. metapsilosis* in *C. orthopsilosis*, na podlagi različnih tehnik: naključno pomnoževanje polimorfne DNK (RAPD), določanje nukleotidnega zaporedja ITS regij ribosomalnih RNK genov, sorodnosti DNK, morfotipizacije, razlike v mitohondrijski DNK, določanje nukleotidnega zaporedja gena za topoizomerozo II, uporaba oligonukleotidnih sond za določanje prstnih odtisov DNK pri sevih *C. parapsilosis* (Tavanti in sod., 2005). Kurtzman in Robnett sta upoštevala razliko v šestih nukleotidih D1/D2 rRna domeni med sevi *C. parapsilosis* in izolati skupine II, kot zadosten razlog za ločitev in upoštevanje slednje kot samostojne vrste (Kurtzman in Robnett, 1997).

2.6.1 Molekularne genetske metode

Molekularne metode omogočajo analizo nukleinskih kislin DNK in RNK. Poznamo dva pristopa preučevanja le-teh: analiza celotnega genoma in preučevanje specifičnih genov oz. genskih sklopov ali gruč (Zalar in Gunde-Cimerman, 2002).

2.6.1.1 Analiza celotnega genoma

2.6.1.1.1 Naključno pomnoževanje polimorfne DNK z verižno reakcijo s polimerazo

Molekularna tehnika RAPD PCR omogoča analize DNK in odkrivanje variabilnosti na nivoju DNK. Tehnika temelji na principu pomnoževanja DNK z verižno reakcijo s polimerazo z uporabo posameznih začetnih oligonukleotidov s poljubnim zaporedjem. RAPD tehnika omogoča analizo tudi slabše poznanih vrst, kar je poleg njene dokaj nezahtevne izvedbe, dodatno pripomoglo k uveljavitvi (Clark in Lanigan, 1993). Osnova RAPD je verižna reakcija s polimerazo, s katero v nekaj urah določen odsek DNK *in vitro* namnožimo tudi do 10^8 -krat. S tem nastane veliko število enakih molekul DNK, kar omogoča številne nadaljnje analize. Predel DNK, ki se med reakcijo pomnožuje je definiran s kratkima sintetičnima molekulama DNK (začetnima oligonukleotidoma). Ti se vežeta na obe matrični verigi DNK, uporaba encima polimeraze DNK pa omogoča sintezo DNK med njima (Jakše, 2007).

Reakcija poteka s ponavljanjem ciklov sestavljenih iz treh stopenj:

- denaturacija dvojnih verig DNK,
- prileganje oligonukleotidnih začetnikov na komplementarna zaporedja matrične molekule DNK in
- sinteza DNK (Jakše, 2007).

Vsaka stopnja polimerazne verižne reakcije poteka pri specifični temperaturi. Začetni oligonukleotidi, ki jih uporabljamo za analizo RAPD so krajši (cca. 10 nukleotidov) in vsebujejo 50-70 % G-C (Clark in Lanigan, 1993). RAPD odkriva polimorfizme, ki so naključno in bolj ali manj enakomerno razporejeni po genomu. Pri reakciji uporabimo večinoma le en začetni oligonukleotid. Ko slednji na ciljni DNK verigi najde dve nasproti

si orientirani mesti prileganja, ki sta si dovolj blizu, se v ciklih PCR reakcije ta odsek namnoži. Zaradi kratke dolžine začetnega oligonukleotida je verjetnost, da le-ta najde večje število komplementarnih mest v kompleksnem evkariontskem genomu veliko. V eni sami reakciji se tako namnoži mnogo različno dolgih odsekov DNK, ki izvirajo iz različnih delov genoma (Jakše, 2007). Poliakrilamidna ali agarozna elektroforeza omogoča ločevanje RAPD pridelkov na osnovi njihove različne dolžine. Gelska elektroforeza ima visoko ločljivost in je uporabna za razločevanje predvsem kompleksnih vzorcev RAPD (Clark in Lanigan, 1993). Polimorfizmi med posamezniki se kažejo kot pasovi na različnih mestih v gelu oz. kot prisotnost in odsotnost posameznih pasov. Glavne prednosti označevalcev RAPD v primerjavi z izoenzimskimi označevalci predstavljajo neomejeno število in zmožnost njihove identifikacije v DNK iz organizmov pri vseh stopnjah razvoja in neodvisno od tkiva iz katerega smo osamili DNK (Jakše, 2007). RAPD pa ima prednosti pred tudi, sicer doslej najpogosteje uporabljeno RFLP metodo.

Te so:

- relativno hitra in enostavna izvedba
- uporaba nanogramskih količin DNK
- metoda ne zahteva uporabe radioaktivnih sredstev
- predhodno poznavanje DNK ni potrebno (Jug, 2002)

Med slabosti prištevajo dominantno naravo označevalcev RAPD, nezanesljivost homologije med fragmenti DNK iste dolžine ter težave s ponovljivostjo rezultatov (Jakše, 2007; Jug, 2002). S tehniko RAPD so Lehmann in sodelavci že leta 1992 potrdili tri genetsko različne skupine v sklopu kompleksa *C. parapsilosis* (Lehmann in sod., 1992). Tehniko pa so uporabili še številni drugi avtorji. Tay in sodelavci so leta 2009 z analizo potrdili pet različnih profilov RAPD. Tip P1 so prepoznali za *C. parapsilosis*, P2 in P3 za *C. orthopsilosis*, P4 za *C. metapsilosis*, tip P5 pa je predstavljala vrsta *Lodderomyces elongisporus* (Tay in sod., 2009). Genetsko variabilnost izolatov *C. parapsilosis sensu lato* s tehniko RAPD, je potrdil tudi Kocsube s sodelavci. Hkrati je prvi opisal vrsto *C. metapsilosis* v Srednji Evropi, kar naj bi bil tudi prvi primer izolacije omenjene vrste iz krvnega obtoka bolnika (Kocsube in sod., 2007).

2.6.1.1.2 Vsebnost gvanina in citozina (G+C) in DNK-DNK hibridizacija

Molski odstotki gvanina in citozina (% G+C) genomske DNK, določeni s toplotno renaturacijo ali HPLC metodami, so uporabljeni v opisih vseh novih taksonov. Metoda ni najbolj uporabna pri identifikaciji, saj imajo lahko tudi popolnoma nesorodni organizmi identično G+C razmerje v genomske DNK. Tehnika je najbolj uporabna v kombinaciji z drugimi metodami. Stopnja hibridizacije med genomoma je širše uporabna metoda identifikacije na nivoju vrste. Splošno pravilo je, da sevi, pri katerih je ujemanje DNK molekul večje od 70 %, pripadajo isti vrsti. Vrednosti med 40 in 70 % nakazujejo na ozko sorodne vrste. Ta tehnika ni primerna za ločevanje taksonov nad nivojem vrste, saj vrednosti pod 40 % prenizke, da bi imele taksonomsko vrednost (Zalar in Gunde-Cimerman, 2002). Roy in Meyer sta uporabila obe tehniki za analizo trinajstih izolatov *C. parapsilosis*. Pri izolatih takratne skupine I, so se vsebnosti G +C gibale med 40,2 in 41,5 %. Pri skupini II so bile vsebnosti med 38,5 in 40,5 %, za skupino III pa med 39,4 in 40,7 %. Med izolati znotraj posamezne skupine je bila stopnja DNK-DNK hibridizacija večja od 95 %, med izolati različnih skupin pa manjša od 25 %. Avtorja sta tako potrdila obstoj ločenih vrst (Roy in Meyer, 1998).

2.6.1.1.3 Polimorfizem fragmentov rezanih z endonukleazami (RFLP)

Pri metodi RFLP genomske DNK režemo z restriksijsko endonukleazo, jo ločimo z elektroforezo in ločene odseke DNK prenesemo na membrano. Temu sledi hibridizacija s sondami DNK. Seve lahko ločujemo tudi s hibridizacijo specifičnih sond (Zalar in Gunde-Cimerman, 2002). Asadzadeh je RFLP metodo uporabil pri analizi regije IGS in gena *SADH*. Slednji kodira sekundarno alkoholno dehidrogenazo (Asadzadeh in sod., 2009).

2.6.1.1.4 Polimorfizem dolžin pomnoženih fragmentov

AFLP (*angl.* amplified fragment length polymorphisms) je novejša molekularna metoda s široko uporabno vrednostjo. Posamezna analiza nam omogoča detekcijo velikega števila polimorfizmov genomske DNK, ima visoko ponovljivost in je primerna za rutinske analize

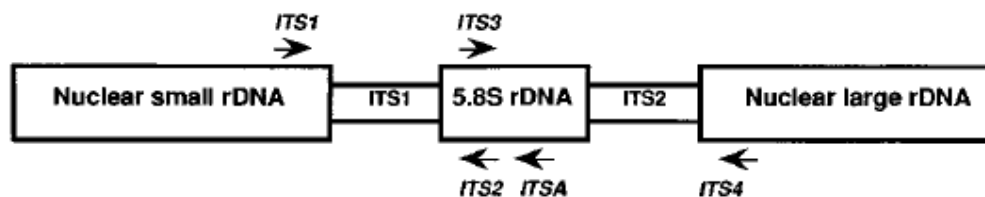
(Tkavc, 2007; Tavanti in sod., 2007). Temelji na selektivni pomnožitvi razrezane genomske DNK z verižno reakcijo s polimerazo. Metoda vključuje tri korake: 1) restrikcija genomske DNK in vezava adapterjev, 2) pomnoževanje restriksijskih fragmentov z uporabo začetnikov, ki imajo na 3'-koncu dodane 0-3 bazne pare, 3) elektroforezno ločevanje fragmentov in analiza vzorcev. Z AFLP lahko odkrivamo razlike med organizmi brez predhodnega poznavanja nukleotidnega zaporedja genoma preučevanega organizma. Te razlike so lahko posledica sprememb prepoznavnih mest restriksijskih encimov, ki nastanejo zaradi mutacij (Tkavc, 2007). AFLP zajame celoten genom in je primerna za ločevanje ozko sorodnih organizmov znotraj vrste (Tkavc, 2007; Tavanti in sod., 2007).

2.6.1.1.5 Mikrosateliti

Ena izmed novejših metod je prav gotovo tudi preučevanje mikrosatelitne DNK. Mikrosateliti so kratke tandemske ponovitve DNK, ki jih pogosto najdemo v genomih evkariontov, včasih tudi v genomih prokariontov (Jug, 1998). Ponavljajoče enote so dolge od 2 do 10 baznih parov (Lasker in sod., 2006). Sestavljajo jih skoraj vse permutacije nukleotidov, na enem lokusu pa se ponovijo od 5 do 100-krat. Mikrosateliti so večinoma raztreseni po genomu, najdemo jih lahko vsaj na vsakih 10.000 baznih parov. Glavna lastnost mikrosatelitov je dolžinski polimorfizem, ki nastane zaradi napak pri podvajanju. Pri različnih organizmih so tako mikrosateliti različno dolgi, kar lahko izkoristimo za preučevanje povezanosti med organizmi znotraj in med populacijami. Dolžinske polimorfizme mikrosatelitov (*angl.* SSLP- simple sequence length polymorphism) pogosto uporabljajo za preučevanje populacij, študije vezave genov in genomsko kartiranje. Želen mikrosatelit pomnožimo s PCR tako, da izberemo začetne oligonukleotide, ki prilegajo robnim nukleotidnim zaporedjem mikrosatelita. Dobljen pridelek analiziramo z gelsko elektroforezo, najpogosteje s kapilarno elektroforezo. Mikrosateliti so dober genetski označevalec in kažejo najhitrejši evlucijski razvoj (Jug, 1998), stopnja mutacije se giblje med 10^{-6} do 10^{-2} mutacij na generacijo na lokus (Lasker in sod., 2006). Načeloma niso podvrženi selekcijskemu pritisku, zato se spremembe ohranjajo. Primerni so za ugotavljanje sorodnosti med populacijami in sorodnimi vrstami, pri preučevanju oddaljenih taksonov pa je njihova uporabnost manjša (Jug, 1998).

2.6.1.2 Analiza specifičnih genov

Za identifikacijo analiziramo zaporedja, ki se evolucijsko zelo malo spreminjajo. V mikologiji uporabljamo na filogenetskem nivoju ribosomske gene oz. različne odseke kodirajočih in nekodirajočih delov ribosomske DNK. Najpogosteje analiziramo zaporedji 18S ali pa 28S rDNK. Slednji sta uporabni za širok spekter taksonomskih enot (Zalar in Gunde-Cimerman, 2002). Za identifikacijo na nivoju vrste največkrat zadostuje analiza zaporedja medgenskih prostorov (Slika 6), ki se nahajajo med 28S in 5,8S rDNK (ITS1) in 5,8S in 18S rDNK (ITS2). Analiziramo lahko tudi celotno zaporedje ITS1-5,8S rDNK-ITS2 (Zalar in Gunde-Cimerman, 2002; Lin in sod., 1995).



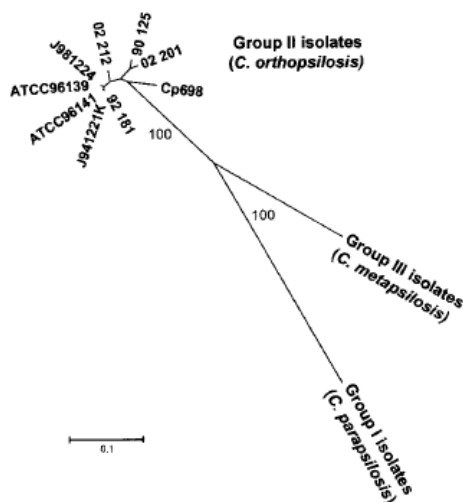
Slika 6: Genomska organizacija manjše ribosomske podenote, 5,8S rDNK, večje ribosomske podenote, ITS1 in ITS2 (Lin in sod., 1995)

2.6.1.2.1 Tipizacija zaporedij multiplih lokusov

MLST (*angl.* multilocus sequence typing) je metoda, ki odraža variabilnost v nukleotidnem zaporedju večjega števila genov, ki so pomembni za esencialne metabolne funkcije, t.i. hišnih genov (*angl.* housekeeping genes). Del gena pomnožimo z metodo PCR in dobljeno nukleotidno zaporedje analiziramo. Vsakemu zaporedju, ki je drugačno od prejšnjega dodelimo novo številko. Kombinacija številk vseh genov, vključenih v analizo nam da sekvenčni tip (ST). Do samih sprememb nukleotidnega zaporedja pride zaradi točkovnih mutacij. Frekvenca slednjih je približno osem krat večja kot frekvenca rekombinacij. Metoda je hitra in ponovljiva, moč razlikovanja (*angl.* discriminatory power) pa je odvisna od genov, vključenih v raziskavo. Analiza MLST je primerna

predvsem za dolgoročne epidemiološke študije, za kratkoročne raziskave pa je potrebno vključiti tudi gene, katerih molekulska ura teče hitreje. Med take spadajo geni, ki kodirajo virulentne dejavnike (Janežič, 2008).

MLST metode je v raziskavi uporabila tudi Tavanti in sodelavci. Z namenom ustvarjanja MLST sheme za *C. parapsilosis* so analizirali 11 genov: *acpl*, *acpr*, *cox3*, *gall*, *lia1*, *lip2*, *sadh*, *sapp3*, *sya1*, *top2* in *ura3*. Ustaljene sekvenčne razlike med podskupinami so potrdili pri štirih genih: *cox3*, *l1s1*, *sadh* in *sya1*. Za devet izolatov skupine II so pridobili PCR produkte le pri petih od 11 ih genov, pri dveh izolatih skupine III so PCR produkte pridobili le pri petih genih. Trije PCR pridelki izolatov II in III so se po velikosti razlikovali od produktov skupine I. S analizo gruč, matematično multivariatno metodo, sekvenčnih polimorfizmov *cox3*, *sadh* in *sya1*, ki so skupni vsem trem podskupinam so izolate dosledno ločili v tri različne skupine (Slika 7). *Sadh* in *sya1* nista visoko konzervativna gena. Ugotovitev, da je podobnost sekvenc teh genov pri *C. parapsilosis*, *C. metapsilosis* in *C. orthopsilosis* bistveno manjša kot 90 %, še dodatno priča o tem, da ni genomske podobnosti, ki je temeljna za vrsto (Tavanti in sod., 2005).



Slika 7: Nekoreninjeno radialno drevo, ki prikazuje sosednje gruče sekvenčnih polimorfizmov genov *cox3*, *sadh* in *sya1* (Tavanti in sod., 2005)

2.6.1.2.2 Mitohondrijska DNK kot genetski označevalec

Mitohondriji so celični organeli, ki vsebujejo lastni genom in so sposobni avtonomnega podvojevanja DNK, prepisovanja in prevajanja genetske informacije v beljakovine. Dedovanje mitohondrijskega genoma je maternalno in pri sesalcih poteka izključno od matere na potomca. Geni mitohondrijske DNK so zgoščeno razvrščeni drug zraven drugega brez vmesnih intronov, katere opazimo le v kontrolni regiji. Slednja predstavlja mesto začetka replikacije in transkripcije. Funkcija mtDNK je sinteza beljakovin, ki so potrebne za sestavo mitohondrijske dihalne verige. Zaradi hitre evolucije nukleotidnih zaporedij v mtDNK lahko preučujemo evolucijo vrste tudi znotraj razmeroma kratkih časovnih intervalov. Mitohondrijska DNK je kot genetski označevalec primerna za študije majhnih populacij (Melkič, 2000).

Genetske študije mitohondrijske DNK *C. parapsilosis* so razkrile, da je le-ta pri večini izolatov linearne oblike medtem, ko je za izolate *Saccharomyces cerevisiae*, *C. albicans*, *C. tropicalis* in *C. orthopsilosis* značilnejša krožna oblika mtDNK (Rycovska in sod., 2004). Restriksijska encimska analiza in označevanje 5' koncev sta dokazali, da je mitohondrijska DNK *C. parapsilosis* uniformna, linearna molekula DNK velika cca. 30kb. Ureditev njenih koncev spominja na mitohondrijske telomere evkariontov (Trofa in sod., 2008). Rycovska je mitohondrijski genom treh genotipsko različnih vrst *C. parapsilosis* kompleksa preučevala že leta 2004 in tako postavila osnovo za nadaljne analize biološke pestrosti kliničnih izolatov. Izsledki so olajšali tudi razvoj vrstno in skupinsko specifičnih molekularnih sond, ki nalegajo na zaporedja mtDNK (Rycovska in sod., 2004; Nosek in sod., 2002). Mitohondrijski genom je izredno zgoščen in nosi zapis za sedem podenot nikotinamid adenin dinukleotida (angl. NADH- nicotinamide adenine dinucleotide): ubikinon reduktazo (*nad1-6*, *nad4L*), apocitokrom b (*cob*), tri podenote citokrom c oksidaze (*cox1-3*) in ATP sintazo (*atp6,8,9*). Najdemo tudi zapis za malo in veliko podenoto mitohondrijskih ribosomov ter 24 tRNA (Nosek in sod., 2004; Kosa in sod., 2006).

Kosa in sodelavci menijo, da naj bi se linearni mitohondrijski genomi vrst *C. parapsilosis*, *C. metapsilosis* in *C. orthopsilosis* razvili iz prednikov s krožnimi genomi mtDNK.

Filogenetske analize namreč nakazujejo, da naj bi skupni prednik teh vrst sicer imel linearen genom. Krožne oblike mtDNK, ki jih najdemo pri nekaterih sevih *C. orthopsilosis* in *C. metapsilosis* naj bi bile posledica nedavnih mutacij telomer (Kosa in sod., 2006). Telomere so elementi, ki preprečujejo zlepljanje koncev, razgradnjo z eksonukleazami in varujejo konce pred učinkom popravljalnih mehanizmov DNK. Mitohondrijske telomere naj bi se razvile iz mobilnih genetskih elementov (transpozoni, plazmidi itd.). Z vstopom v mitohondrij naj bi se vključile v krožno mtDNK, kar je posledično privedlo do oblikovanja linearne mtDNK določene dolžine s telomernimi konci (Rycovska in sod., 2004).

2.6.1.2.3 Pirosekveniranje

Pirosekveniranje je hitra in dokaj robustna metoda identifikacije glivnih vrst (Borman in sod., 2009). V osnovi je namenjena genotipizaciji in odkritju točkovnih mutacij (*angl.* SNP- single nucleotide polymorphism). Za sintezo komplementarne verige potrebujemo z biotinom označen oligonukleotidni začetnik, encime (DNK polimerazo, ATP sulfurilazo, luciferazo, apirazo), substrat (adenozin 5' fosfosulfat) in luciferin. Ob sintezi postopoma dodajamo enega izmed 4 dNTP-jev (razen namesto dATP dodamo deoksiadenozin α -tio sultat). Tega nato zaznamo prek emisije fotonov ob luminiscenci luciferina v oksiluciferin. Ob vgradnji nukleotida se sprosti pirofosfat, ki ga ATP sulfrilaza pretvori v ATP. Adenozin trifosfat omogoča delovanje luciferaze, ki oksidira luciferin. Apiraza pa po koncu razgradi nevgrajene dNTP-je in nastali ATP. Sekvenciranje tako poteka "de novo" Metoda je natančna in omogoča hkratno sledenje določitve zaporedja (Šnajder, 2009).

3 MATERIALI IN METODE

Izhajajoč iz namena dela, ki je bil preveritev genetske raznolikosti izolatov *Candida parapsilosis* kompleksa ter določitev občutljivosti omenjenih izolatov za antimikotike flukonazol, vorikonazol, amfotericin B in kaspofungin, smo v diplomski nalogi uporabili potrebna gojišča in metode.

3.1 BOLNIKI

Med raziskavo smo zbrali 181 izolatov gliv kvasovk, ki so bile s klasičnimi biokemijskimi metodami opredeljeni kot *C. parapsilosis*. V nadaljno obravnavo smo vključili le 122 izolatov, ki so bili odvzeti 119 bolnikom, zdravljenih na oddelkih Kliničnega centra Ljubljana in drugih slovenskih bolnišnicah. Do zmanjšanja števila izolatov je prišlo zato, ker so bili nekateri sevi pri istih bolnikih osamljeni večkrat iz istih kliničnih vzorcev. Vzorci so bili zbrani prospektivno od julija leta 2009 do septembra 2010. V raziskavo smo vključili tudi kulture shranjene na stalnem gojišču pri $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, ki so jih med rutinskim delom, pred začetkom raziskovalnega dela, izolirali v Laboratoriju za diagnostiko glivičnih okužb na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinske fakultete v Ljubljani. Letih je bilo 19, pri čemer so prevladovali izolati iz hemokultur.

3.2 METODE

Pri začetni identifikaciji glivnih vrst smo poleg morfoloških znakov upoštevali tudi rezultate komercialno dostopnih biokemijskih testov. Identifikacija na ravni fenotipa je mnogokrat zavajajoča, zaradi česar smo izolate vključene v raziskavo analizirali z uporabo molekularnih metod.

3.2.1 Obdelava vzorcev

Kužnine smo v laboratoriju nacepili na trdna, Sabouraud agar (SABA, bioMérieux Marcy-l'Etoile, Francija) in Chrom Candida agar (Chrom C, Mast Diagnostica GmbH, Nemčija) ter tekoča gojišča, Sabouraud bujon in Tioglycollate-medium bujon. Vrsto glive kvasovke

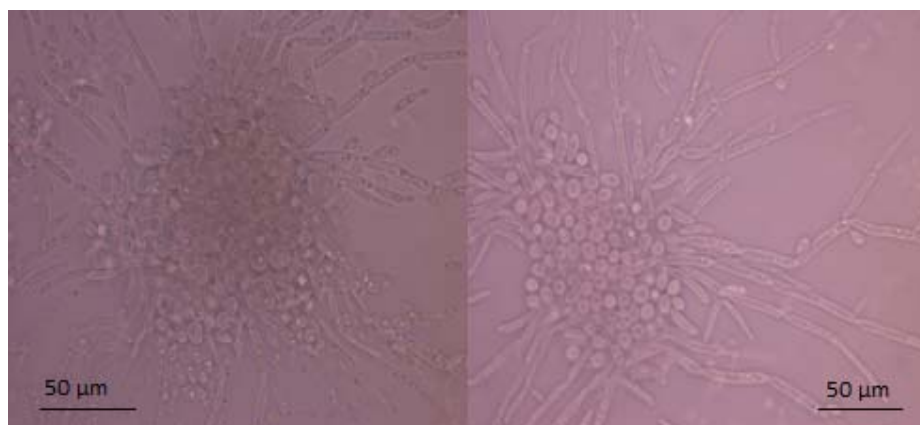
smo določili glede na makroskopski izgled kolonij, poraslih na Chrom-C gojišču. Za glivo *Candida parapsilosis* so značilne hrapave, sijoče in suhe ali gladke kolonije. Te smo precepili na koruzni agar (KRA) in izvedli API Candida test in/ali ID 32 C test. Po uspešni identifikaciji smo izolat raztopili v fiziološki raztopini in ga shranili pri temperaturi $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ do pričetka izvedbe avtomatske izolacije DNK.

3.2.2 Opazovanje morfologije

Klub razvoju biokemijskih in molekularnih metod, ostajajo morfološke metode osnova pri preučevanju gliv, morfološke lastnosti mikroorganizma (oblika, površina, barva) pa bistvene pri njegovi identifikaciji in klasifikaciji.

3.2.2.1 Koruzni agar

Koruzni agar v epruveti smo segreli v termobloku in ga razlili po sterilnem stekelcu. Na ohlajen agar smo nanесли kulturo glive kvasovke v obliki dveh vzporednih črt. Te smo nato do polovice zarezali in prekrili s krovnim stekelcem tako, da je bila prekrita le polovica zarezane črte. Po 24 in 48 urni inkubaciji pri $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ smo s svetlobnim mikroskopom opazovali morfološke značilnosti psevdomicelija (Slika 8).



Slika 8: *Candida parapsilosis* na koruznem agarju, slikana pod 1000x povečavo s svetlobnim mikroskopom

3.2.3 Identifikacijski testi

3.2.3.1 API Candida test

API Candida (bioMérieux, Marcy-l'Etoile, Francija) je sistem za identifikacijo večine medicinsko pomembnih gliv kvasovk. Pri izvedbi testa smo uporabili testno ploščico z 10 vdolbinicami, ki vsebujejo dehidrirane substrate s katerimi izvedemo 12 ločenih identifikacijskih testov v 24 urah. Rezultate smo odčitali glede na spremembo barve v vdolbinah in jih vpisali na priložen listič. Testna kartica je razdeljena v 4 skupine po 3 teste, pri čemer vsakemu testu pripada določena vrednost (0, 1, 2 ali 4). Negativni testi se vrednotijo z 0, pozitivni pa z ustrezno številko 1, 2, ali 4. Slednje smo nato po navodilih proizvajalca spremenili v numerično kodo, ki nam z uporabo ustreznih tabel, vključenih v sistem, identificirajo izolirani glivo.

3.2.3.2 ID 32 C test

ID 32C sistem (bioMérieux, Marcy-l'Etoile, Francija) uporablja testno ploščico z dehidriranimi substrati (ogljikohidrati, organske kisline in aminokisline), ki omogoča izvedbo 29 asimilacijskih reakcij. Sistem vključuje še negativno kontrolo, reakcijo občutljivosti (cikloheksimid) ter kolorimetrični test (eskulin). Po 24 oz. 48 urah opazujemo rast v posamezni vdolbinici, le-ta je vidna kot zamotnitev suspenzije ali kot pomotnitev suspenzije v primeru reakcije z eskulinom. Rezultate ovrednotimo z avtomatiziranim sistemom *ATB Expression* ali vizualno. *ATB Expression* (bioMérieux, Marcy-l'Etoile, Francija) omogoča avtomatizirano identifikacijo. Numerični profil vnesemo v identifikacijo bazo podatkov, ki ga pretvori v identifikacijo glive kvasovke. Baza s 63 različnimi vrstami gliv kvasovk se nahaja v računalniku, kot del sistema *ATB Expression*.

3.3 OSAMITEV CELOKUPNE NUKLEINSKE KISLINE IZ VZORCEV

3.3.1 Predpriprava vzorca

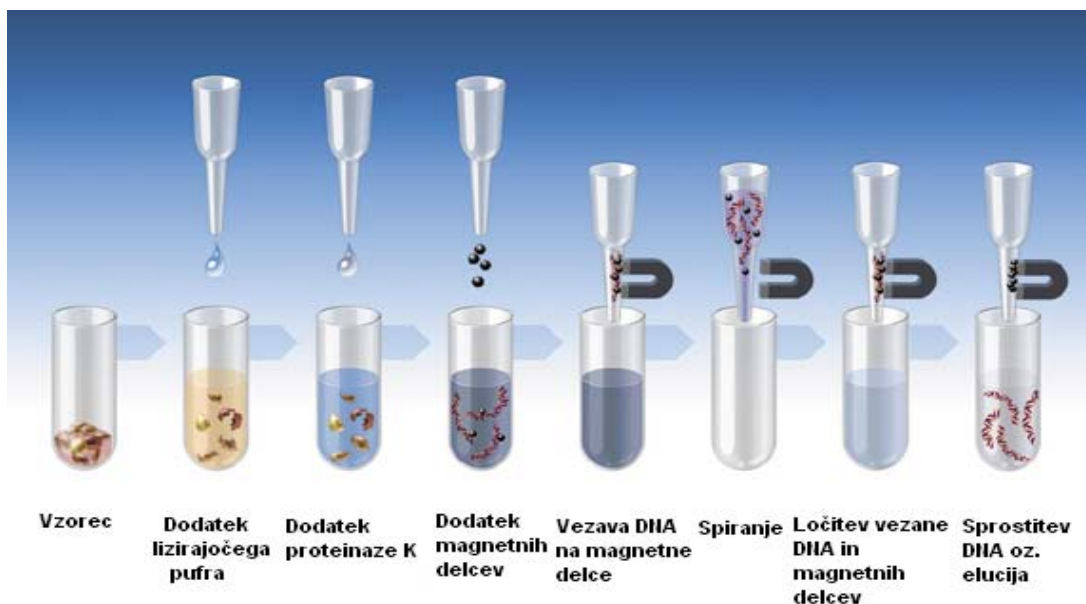
Izolate shranjene pri -20 °C smo najprej odtalili in jih vorteksirali z bioVortex V1 (Biosan), da so se celice enakomerno porazdelile. Nato smo jih nacepili na SABA (za ustrezno oživitev izolata smo prekonočno kulturo precepili še dvakrat).

Četrty dan smo v sterilne epruvetke odpipetirali 300 µl Nuclease free vode (Qiagen, GmbH, Hilden, Nemčija), v njej pa raztopili polno zanko kulture. Vzorce smo ponovno vorteksirali in izvedli kratko centrifugiranje t.i. »spin down« (Mini Spin plus, Eppendorf, Hamburg, Nemčija). Sledil je dodatek 200 µl MagNA Pure Bacteria Lysis Buffer (BBL, Roche Applied Science, Mannheim, Nemčija) pufru in 20 µl proteinaze K (Roche Applied Science, Mannheim, Nemčija). Predhodno smo pripravili termobloka (Thermomixer comfort, Eppendorf, Hamburg, Nemčija) in nastavili ustrezni temperaturi. Vzorce smo najprej inkubirali 10 minut pri temperaturi 65 °C, naslednjih 10 minut pa pri 95 °C. Sledila je petminutna ohladitev vzorcev v hladilniku in ponovno kratko centrifugiranje, da se je celotna mešanica zbrala na dnu epruvetke. V epruvetko, priloženo kompletu MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation kit I (MagNA, Roche Applied Science, Mannheim, Nemčija), smo odpipetirali 410 µl posameznega vzorca.

3.3.2 Izvedba avtomatske izolacije

Za osamitev celokupne nukleinske kisline iz vzorcev smo uporabili komercialni komplet MagNA Pure Compact Nucleic Acids Isolation Kit I (Roche Applied Science, Mannheim, Nemčija). Sistem omogoča hkratno avtomatizirano osamitev DNK iz osmih vzorcev v eni seriji. Predpriprava vzorca traja približno 30 minut, prav toliko pa tudi celoten čas osamitve. Slika 9 prikazuje avtomatizirano osamitev, ki vključuje:

- lizo celic in beljakovin (nukleaz)
- vezavo nukleinske kisline na magnetne delce
- odstranitev primesi in inhibitorjev
- elucijo vezane nukleinske kisline pri visoki temperaturi (Kirchgesser in sod., 2003)



Slika 9: Osamitev nukleinske kisline s tehnologijo magnetnih delcev (Kirchgesser in sod., 2003)

Nukleinska kislina iz vzorca se veže na magnetne delce (magnetit), ki so imobilizirani s sintetičnimi polimeri (agaroz), biopolimeri (celuloza) ali poroznim steklom. Uporabljajo se tudi delci, osnovani na anorganskih materialih, kot je Fe_2O_4 . Stalni magnet, ki se nahaja izven tubice ustvari magnetno polje zaradi česar se magnetni delci z vezano nukleinsko kislino pomaknejo proti njemu. Na ta način pride do ločitve od vzorca. Magnetni delci pri tem ne smejo reagirati med seboj v odsotnosti magnetnega polja, saj bi se s tem zmanjšala površina za vezavo nukleinske kisline. Posledično bi bila zmanjšana tudi občutljivost metode PCR, kar bi vodilo do lažno negativnih rezultatov (Škrlec, 2010).

Komplet vsebuje:

- 32 kartuš z reagenti:
 - proteinaza K
 - lizirajoči pufer
 - spiralni pufer
 - elucijski pufer

- steklene kroglice z vezanimi magnetki

- 32 plastičnih vložkov z nastavki (*angl.* tip trays)
- 35 epruvetk za vzorce
- 35 kodiranih elucijskih epruvetk
- 35 pokrovčkov za elucijske epruvetke

Reagenti so stabilni na sobni temperaturi od 15 °C do 25 °C.

V aparaturu za osamitev nukleinske kisline MagNA Pure Compact (Roche, Applied Science, Basel, Švica) smo namestili vse potrebne kartuše z reagenti. Te smo pred uporabo dobro pretresli, saj se morajo magnetni delci v kartuši enakomerno porazdeliti. Z ustreznim programom smo izbrali želen protokol osamitve in sicer DNA_Bacteria. Pri slednjem je bila količina vzorca 400 µl, volumen elucije pa 100 µl. Elucijskim epruvetkam smo dodelili ustrezne protokolne številke vzorcev in skenirali njihove kode.

Po končanem postopku smo elucijske epruvetke z izolirano DNA zaprli in jih shranili pri -20 °C.

3.4 POMNOŽEVANJE NUKLEINSKE KISLINE GLIV

Verižna reakcija s polimerazo (*angl.* PCR- polymerase chain reaction) temelji na pomnoževanju specifičnih odsekov nukleinske kisline. Za izvedbo PCR je pomembna pravilna izbira začetnih oligonukleotidov, saj morajo z visoko zmogljivostjo in specifičnostjo omogočati pomnožitev želenega nukleotidnega zaporedja v vzorcu. Začetni oligonukleotidi zato ne smejo biti predolgi (20-28 nukleotidov), vsebovati morajo 40-60 % delež nukleotidov G in C. V posameznem začetnem oligonukleotidu ne smejo biti prisotne komplementarne regije, le-te pa prav tako ne smejo biti prisotne na 3' koncu med izbranima paroma. Temperatura tališča med njima se ne sme razlikovati za več kot 5 °C (Mackay in sod., 2002).

3.4.1 Sestava reakcijske mešanice in pogoji reakcije PCR

Pri pripravi reakcijske mešanice smo uporabili sledeče reagente:

- Deionizirana voda (nuclease free water, 50 mL)
- 1, 5 ml 10x PCR Buffer II, brez MgCl₂ (Applied Biosystems, Nemčija)
- 1,5 mL 25 mM MgCl₂ Solution (Applied Biosystems, Nemčija)
- dNTPmix (mešanica deoksinukleotidtrifosfatov, Applied Biosystems, Nemčija)
- začetni oligonukleotid SADH S1R (50 μM) gTTgATgCTgTTggATTgT (Tavanti in sod., 2005)
- začetni oligonukleotid SADH S1F (50 μM) CAATgCCAAATCTCCCAA (Tavanti in sod., 2005)
- AmpliTaq[®] DNK polimeraza (5 U/μl, Applied Biosystems, Nemčija)

Preglednica 2: Sestava reakcijske mešanice za verižno reakcijo s polimerazo

Reagent	Količina	Začetna koncentracija	Končna koncentracija
H ₂ O	32 μl	32 μl	32 μl
pufer	5 μl	10 x	1 x
DNTP	4 μl	10 mM	0,8 mM
MgCl ₂	3 μl	25 mM	1,5 mM
začetni oligonukleotidi	0,5 μl	50 μM	0,5 μM
Taq polimeraza	0,5 μl	5 U/μl	2,5 U
SKUPAJ	50 μl	50 μl	50 μl

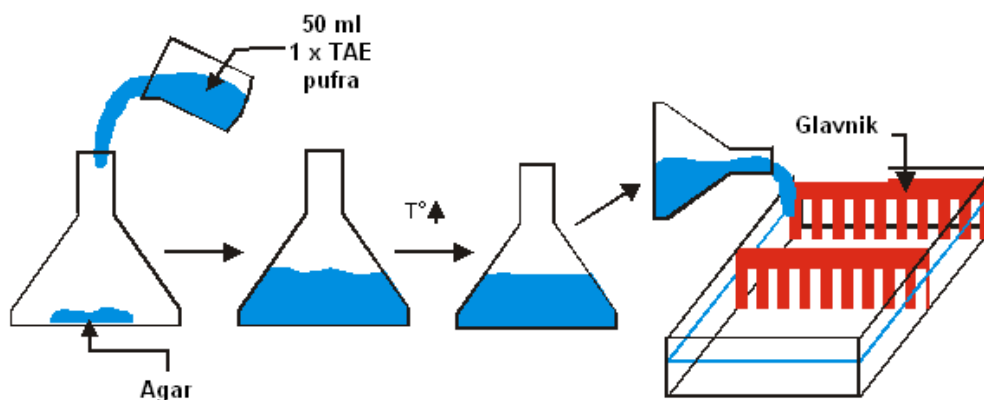
Mešanico za PCR smo pripravili tako, da smo v 1,5 ml epruvelko odpipetirali sledeče sestavine: voda, pufer, MgCl₂, dNTP-je, oba začetna oligonukleotida. Na koncu smo dodali še DNK polimerazo. Vse sestavine, razen slednje, smo pred dodatkom v mešanico premešali. Dodobra smo premešali tudi celokupno mešanico in v 200 μl epruvelke prenesli po 45 μl reakcijske mešanice. V ločenem prostoru smo dodali 5 μl DNK glivnega vzorca do skupnega volumna reakcijske mešanice 50 μl. Pomnoževanje DNK je potekalo v cikličnem termostatu T3 Thermocycler (Biometra biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen, Nemčija). Potek PCR reakcije je opisan v Preglednici 3.

Preglednica 3: Potek verižne reakcije s polimerazo

	Čas (s)	Temperatura (°C)	Število ciklov
Začetni aktivacijski korak	120	94	1
Denaturacija tarčne DNK	30	94	30
Vezava začetnih oligonukleotidov	30	57	
Sinteza nove verige DNK	30	72	
Končni podaljšan korak	600	72	

3.4.2 Opredelitev pridelkov PCR

Gelsko elektroforezo (Slika 10) za ločevanje pridelkov DNK smo izvedli na 1 % agaroznem gelu, katerega smo predhodno pripravili. Natehtali smo 0,5 g agaroze (Sigma-Aldrich, St. Louis, ZDA) in dodali 50 ml hladnega pufru 1 x TAE (Tris baza/Acetac/EDTA). Raztopino smo segrevali v mikrovalovni pečici, nato pa gel postopoma ohladili do približno 55-60 °C. Ohlajenemu gelu smo dodali 3,5 µl etidijevga bromida (10 mg/ml) in ga prelili v plastičen nosilec za vlivanje z vstavljenim glavničkom. Pri vlivanju gela smo pazili, da se pod zobce glavnika niso ujeli mehurčki zraka. Počakali smo, da se je gel strdil in ga nato skupaj z nosilcem prenesli v elektroforezno banjico HE33 (Hofer, Inc., Holliston, ZDA), odstranili glavniček in gel prelili s hladnim pufrom 1 x TAE. V zadnjo luknjico gela smo vnesli 5 µl raztopine fragmentov DNK znanih velikosti-123 bp DNA ladder (Invitrogen, Kalifornija, ZDA). V vse ostale luknjice smo vnesli 10 µl PCR pridelka, katerega smo predhodno na parafilmu združili in premešali z 3 µl modrilom (0,05 % bromfenol blue v 40 % glukozi, SIGMA-Aldrich, St. Louis, ZDA). Elektroforeza je tekla pri napetosti 100 V, 25 minut pri sobni temperaturi. Agarozni gel smo analizirali pod UV-transiluminatorjem in dokumentirali (Gel-doc, Bio-rad, Lab Inc., Hercules, Kalifornija).



Slika 10: Gelska elektroforeza PCR pomnožkov (Electroforesis de dna plasmidico en gel de agarosa, 2011)

3.5 OPREDELITEV VRSTE Z METODO RESTRIKCIJE PRIDELKOV REAKCIJE PCR

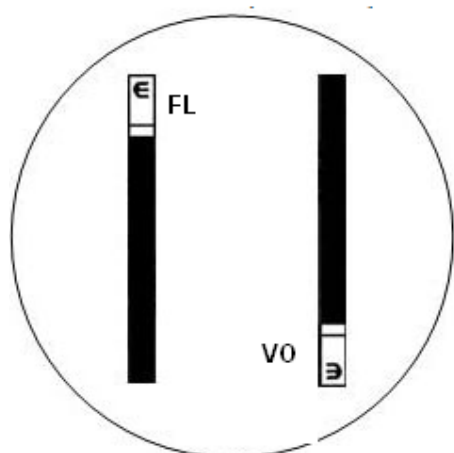
Vse vzorce, pri katerih smo uspešno pomnožili gen za protein sekundarna alkoholna dehidrogenaza (SADH) smo rezali z restrikcijsko endonukleazo *BanI* in vrste med seboj ločili po številu restrikcijskih mest za ta encim. *C. parapsilosis* ima eno restrikcijsko mesto, na poziciji 196. *C. metapsilosis* ima tri, na pozicijah 96, 469 in 529 medtem, ko ga *C. orthopsilosis* nima (Silva in sod., 2009). Restrikcijska mešanica za restrikcijo enega PCR pridelka je vsebovala 4 μ l 10 x NEBuffer 4 pufra, 1 μ l 100 x BSA (*angl.* bovine serum albumine- goveji serumski albumin, 10 mg/ml), 13 μ l deionizirane vode in 2 μ l encima *BanI*. Restrikcijski mešanici smo dodali 20 μ l pridelka PCR in vse skupaj inkubirali 100 minut pri 37 °C. Prikaz restrikcije pridelkov PCR smo izvedli na 1 % agaroznih gelih. Priprava le-teh in izvedba elektroforeze je opisana pod točko 3.4.2.

3.6 TESTIRANJE OBČUTLJIVOSTI

3.6.1 Izvedba Etesta

S sterilnim bombažnim brisom smo prenesli nekaj kolonij 24 urne kulture kvasovk v 5 ml sterilne 0,85 % raztopine API NaCl Medium (bioMérieux Marcy-l'Etoile, Francija) in pripravili homogeno suspenzijo gostote 0,5 McFarland standarda (Etest, 2009a).

Nov sterilen bombažen bris smo pomočili v pripravljeno raztopino in s pritiskom na notranjo stran ampule odstranili odvečno tekočino. Z njim smo enakomerno premazali površino gojišča RPMI 1640 v petrijevki. Gojišče smo premazali trikrat, pri tem pa obračali petrijevko v različne smeri. Počakali smo 15 do 20 minut, da se je površina gojišča posušila, nato pa s sterilno pinceto Etest (AB Biodisk, Solna, Švedska) položili na površino gojišča (Slika 11). Pri polaganju Etesta smo morali paziti, da je bila MIK skala obrnjena navzgor in je bil celoten Etest v stiku z gojiščem. Z rahlim potegom pincete od nižje proti višji koncentraciji antimikotika smo sprostili zračne mehurčke, ki so se pojavili med testom in gojiščem. Položen Etest nismo smeli premikati, saj pride ob položitvi do takojšnje difuzije antimikotika v gojišče. Plošče s položenimi Etesti smo inkubirali v aerobni atmosferi pri 35 °C 48 ur (Etest, 2009a).



Slika 11: Način polaganja Etesta(ov) na RPMI gojišče v petrijevki (Etest, 2009a)

3.6.2 Odčitavanje MIK vrednosti

Po 24 in 48 urni inkubaciji smo vrednosti MIK v $\mu\text{g/ml}$ odčitali neposredno s skale na Etestu, in sicer v točki, kjer je rob inhibicijske elipse sekal Etest. MIK vrednosti pri flukonazolu, vorikonazolu in kaspofunginu smo odčitali na točki 80 % inhibicijske rasti, pri amfotericinu B pa smo MIK odčitali tam, kjer je bila rast popolnoma zavrta (Etest, 2009a). Slika 12 prikazuje odčitavanje vrednosti MIK ob upoštevanju prisotnih mikrokolonij.



Slika 12: Odčitavanje MIK ob upoštevanju mikrokolonij (0,25 µg/ml; Etest, 2009b)

Pri interpretaciji MIK vrednosti smo upoštevali mejne vrednosti, ki jih predpisujejo CLSI v dokumentu M27-A3 (Preglednici 4 in 5; CLSI, 2008).

Preglednica 4: Interpretacijski kriteriji CLSI za opredeljevanje občutljivosti gliv kvasovk za antimikotika flukonazol in vorikonazol (CLSI, 2008)

	S (µg/ml)	S-DD (µg/ml)	R (µg/ml)
Flukonazol	≤ 8	16 - 32	≥ 64
Vorikonazol	≤ 1	2	≥ 4

Legenda: S: občutljiv, S-DD: občutljiv z višjimi odmerki antimikotika, R: odporen

Preglednica 5: Interpretacijski kriteriji CLSI za opredeljevanje občutljivosti gliv kvasovk za antimikotika amfotericin B in kaspofungin (CLSI, 2008)

	S (µg/ml)	S-DD (µg/ml)	R (µg/ml)	NS (µg/ml)
Amfotericin B	≤ 1	-	-	> 1
Kaspofungin	≤ 2	-	-	> 2

Legenda: S: občutljiv, S-DD: občutljiv z višjimi odmerki antimikotika, R: odporen, NS: ni občutljiv

Opredelili smo tudi MIC_{50} in MIC_{90} za vse testirane antimikotike pri čemer MIC_{50} predstavlja tisto koncentracijo, ki zavre 50 % in MIC_{90} koncentracijo, ki zavre 90 % testiranih izolatov.

4 REZULTATI

Izhajajoč iz namena dela, katerega cilj je bil preveriti genetsko raznolikost izolatov *Candida parapsilosis* kompleksa in določiti občutljivost izolatov za izbrane antimikotike, smo prišli do sledečih rezultatov.

V začetnem delu prikazujemo rezultate analize genetske raznolikosti izolatov *Candida parapsilosis* kompleksa, izoliranih med rutinskim delom v Laboratoriju za diagnostiko glivičnih infekcij. Analizirali smo protokole bolnikov, ki so nam omogočili demografsko opredelitev, torej starost in spol bolnikov in izvor kužnin iz katerih smo izolate osamili. V drugem delu so prikazane MIK za antimikotike flukonazol, vorikonazol, amfotericin B in kaspofungin, omenjenih izolatov.

4.1 PRIDOBIVANJE KUŽNIN

V obdobju od julija leta 2009 do septembra 2010 smo prospektivno zbirali izolate *C. parapsilosis* kompleksa iz kliničnih vzorcev bolnikov, ki so bili poslani v Laboratorij za diagnostiko glivičnih infekcij. V analizo pa smo vključili tudi kulture shranjene na stalnem gojišču. Slednje smo najprej, z namenom oživitve, precepili na SABA. V raziskavo je bilo vključenih 122 izolatov *C. parapsilosis* kompleksa osamljenih iz kliničnih vzorcev 119 bolnikov, ki so se zdravili na različnih oddelkih Univerzitetnega kliničnega centra v Ljubljani oziroma v drugih slovenskih bolnišnicah. V Preglednici B, v prilogah, so prikazani najpogostejši oddelki oz. zdravstvene ustanove iz katerih so bili osamljeni izolati.

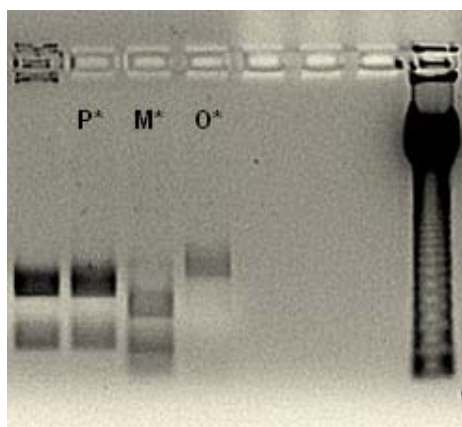
4.2 GENETSKA RAZNOLIKOST IZOLATOV *Candida parapsilosis* KOMPLEKSA

S pomočjo verižne reakcije s polimerazo smo pomnožili gen *SADH* in ga rezali z restrikcijsko endonukleazo *BanI*. V preglednici 6 so predstavljeni rezultati genetske analize zbranih izolatov. 109 (89,3 %) izolatov smo opredelili kot *C. parapsilosis*, 10 (8,2 %) kot *C. metapsilosis* in 3 (2,5 %) izolate kot *C. orthopsilosis*.

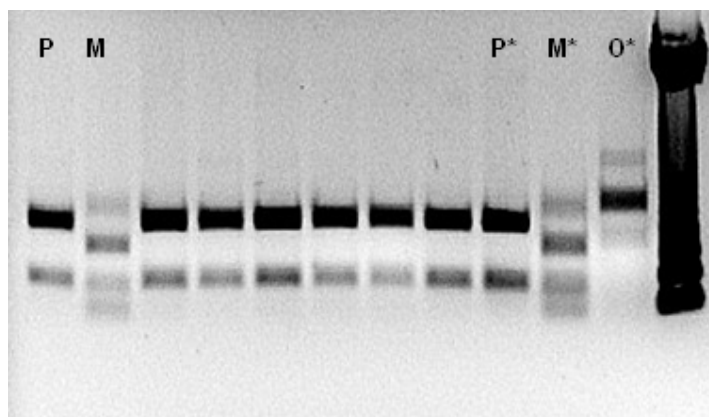
Preglednica 6: Rezultati opredelitve vrste z metodo restrikcije PCR pridelkov, osamljenih izolatov iz kužnin

Izolati	Število izolatov	Odstotek (%)
<i>Candida parapsilosis</i>	109	89,3
<i>Candida metapsilosis</i>	10	8,2
<i>Candida orthopsilosis</i>	3	2,5
SKUPAJ	122	100,0

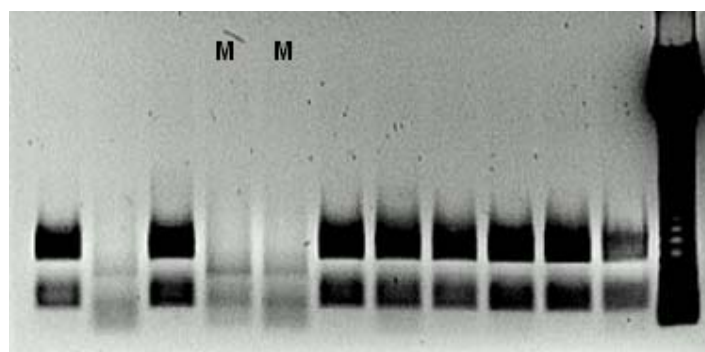
Na Slikah 13-16 prikazujemo restrikcijski vzorec vseh treh vrst *C. parapsilosis* kompleksa ter testnih sevov.



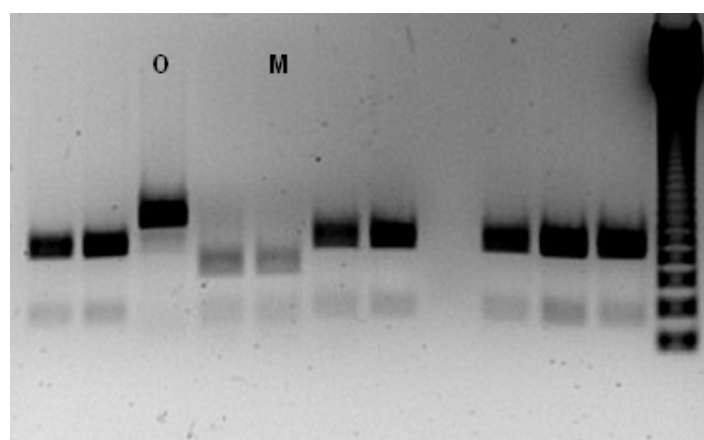
Slika 13: Restrikcijski vzorec testnih sevov *C. parapsilosis* ATCC22019 (**P***), *C. metapsilosis* ATCC96144 (**M***) in *C. orthopsilosis* ATCC96139 (**O***) ter lestvica fragmentov DNK znanih velikosti- 123bp DNK ladder



Slika 14: Restriksijski vzorec testiranih izolatov *C. parapsilosis* (P) in *C. metapsilosis* (M) ter testnih sevov P*, M* in O* v zadnjih treh vdolbinah



Slika 15: Restriksijski vzorec testiranih izolatov *C. metapsilosis* (M)



Slika 16: Restriksijski vzorec testiranih izolatov *C. orthopsilosis* (O) in *C. metapsilosis* (M)

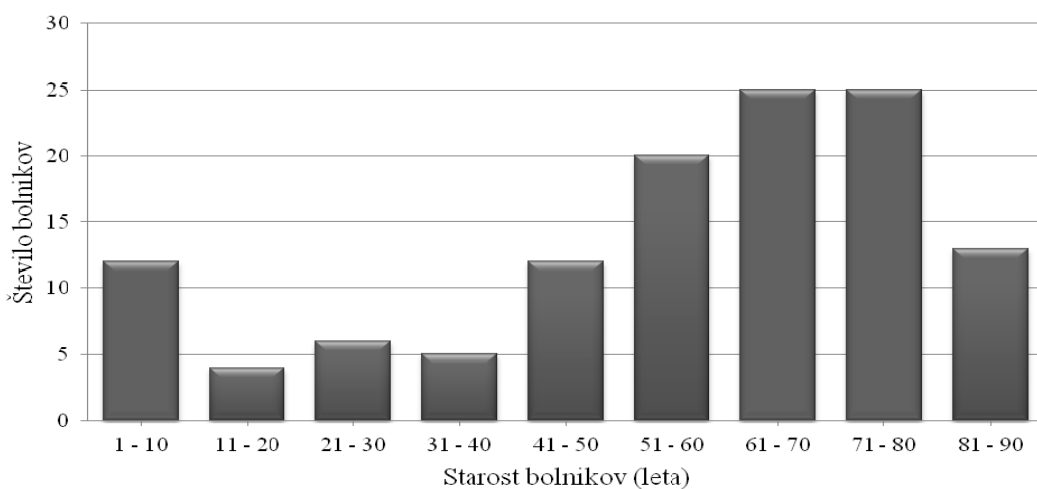
4.3 DEMOGRAFSKA PORAZDELITEV IZOLATOV *C. parapsilosis* KOMPLEKSA

Največ izolatov smo osamili iz kužnin, ki so bile odvzete predstavnikom moškega spola. Kar 62,3 % vseh izolatov je bilo osamljenih iz kužnin moških, iz kužnin žensk smo osamili 37,7 % vseh izolatov. Omenjen trend smo dokazali pri vseh treh vrstah *C. parapsilosis* kompleksa (Preglednica 7).

Preglednica 7: Število izolatov pri posamezni vrsti, osamljenih iz kužnin moških oz. žensk

Spol	Število izolatov osamljenih pri posamezni vrsti			Kompleks <i>C. parapsilosis</i> (%)
	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. metapsilosis</i>	<i>C. orthopsilosis</i>	
Moški	65	9	2	76 (62,3)
Ženski	44	1	1	46 (37,7)
SKUPAJ	109	10	3	122 (100,0)

Slika 17 prikazuje starostno porazdelitev bolnikov pri katerih smo osamili vrste *C. parapsilosis* kompleksa. Večino izolatov smo osamili iz kužnin starejših bolnikov. 52 % vseh bolnikov je bilo starejših od 60 let. 12 (10 %) izolatov so osamili pri najmlajši starostni skupini do 10 let. Vsi ti so bili opredeljeni kot *C. parapsilosis*. Starost bolnikov je bila pri bolnikih z osamljeno vrsto *C. orthopsilosis* ravno tako višja. Starost treh bolnikov je bila sledeča: 54, 56 in 74 let.



Slika 17: Porazdelitev starosti vseh bolnikov, pri katerih smo osamili vrste *Candida parapsilosis* kompleksa

4.4 VIRI IZOLATOV *C. parapsilosis* KOMPLEKSA

V Preglednici 8 so prikazani viri izolatov skupine *C. parapsilosis*. Prevladujejo izolati osamljeni iz brisov, teh je bilo kar 32 %, 18,9 % izolatov je bilo osamljenih iz hemokultur. Zabeležili smo en primer onihomikoze, enkrat smo *C. parapsilosis* osamili iz likvorja. Nadalje smo v Preglednici 9 brise med seboj razporedili po mestu odvzema. Največ, to je 12 (31 %) izolatov smo osamili iz brisov ran, in 11 (28 %) iz brisov sluhovoda.

Preglednica 8: Kužnine, iz katerih smo osamili izolate *C. parapsilosis* kompleksa

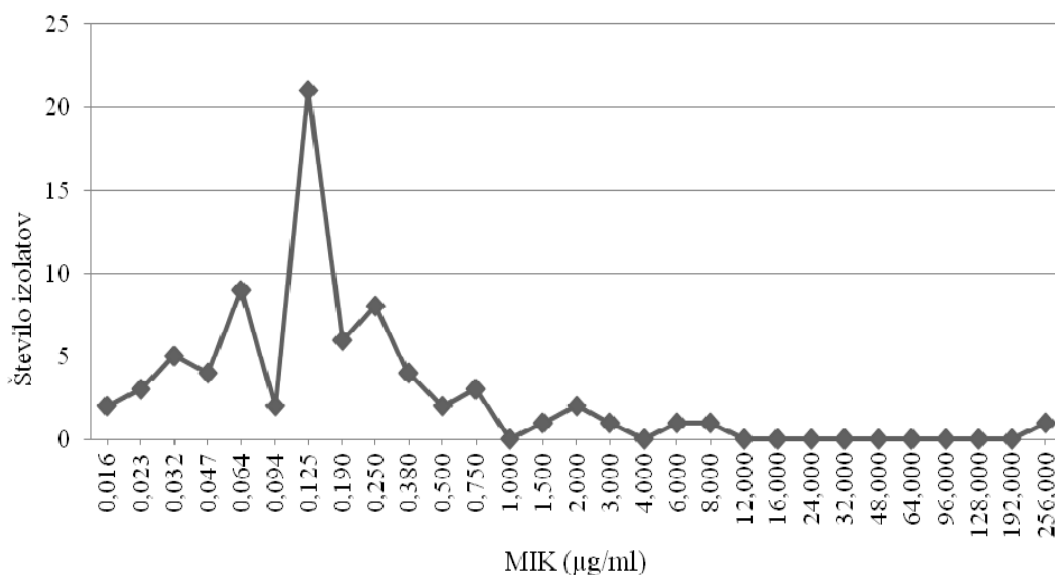
Mesto osamitve	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. metapsilosis</i>	<i>C. orthopsilosis</i>	Kompleks <i>C. parapsilosis</i> (%)
bris	36	2	1	39 (32)
kri	20	3	0	23 (18,9)
sputum	15	1	1	17 (13,9)
aspirat	13	2	1	16 (13,1)
urin	13	1	0	14 (11,5)
blato	8	1	0	9 (7,4)
konica katetra	2	0	0	2 (1,6)
košček nohta	1	0	0	1 (0,8)
likvor	1	0	0	1 (0,8)
	109	10	3	122 (100,0)

Preglednica 9: Mesta odvzema brisa, iz katerih smo osamili izolate *C. parapsilosis* kompleksa

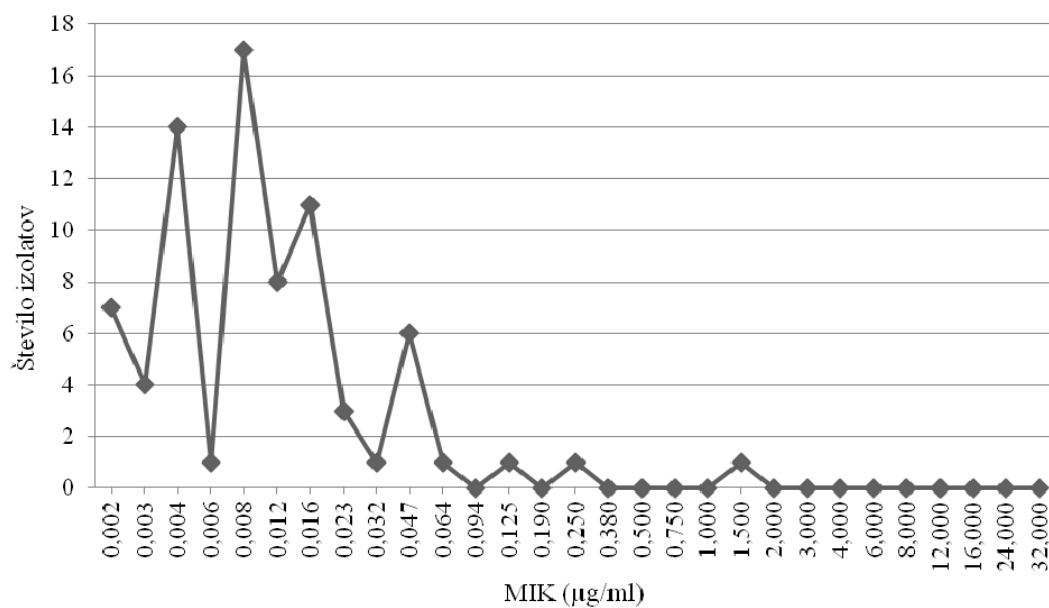
Predel brisa	Št. izolatov osamljenih v kužnini
rana	12
sluhovod	11
črevesje	4
žrelo	3
traheostoma	3
gastrostoma	1
vagina	1
eflorescenca	1
nos	1
ustna sluznica	1
jezik	1
SKUPAJ	39

4.5 PRIMERJAVA MINIMALNIH INHIBITORNIH KONCENTRACIJ (MIK) IZOLATOV *C. parapsilosis* KOMPLEKSA

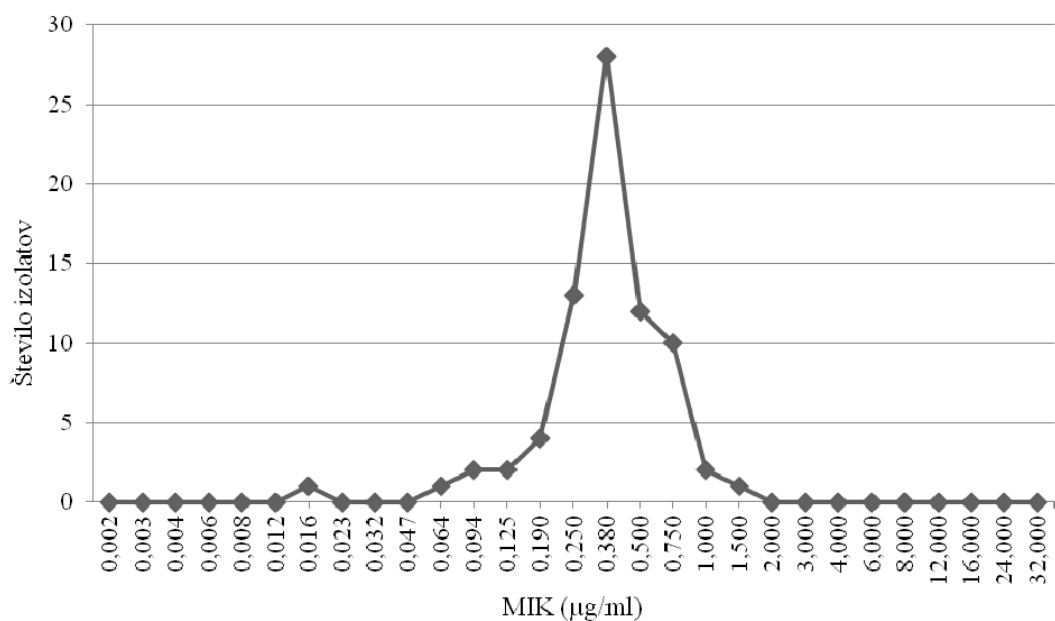
Testirali smo občutljivost izolatov *C. parapsilosis* kompleksa za štiri antimikotike: flukonazol, vorikonazol, amfotericin B in kaspofungin. V testiranje občutljivosti za omenjene antimikotike je bilo vključenih 76 izolatov *C. parapsilosis* kompleksa: 67 izolatov *C. parapsilosis*, 7 izolatov *C. metapsilosis* in 2 izolata *C. orthopsilosis*. Slike 18-21 prikazujejo porazdelitev MIK za vse štiri testirane antimikotike.



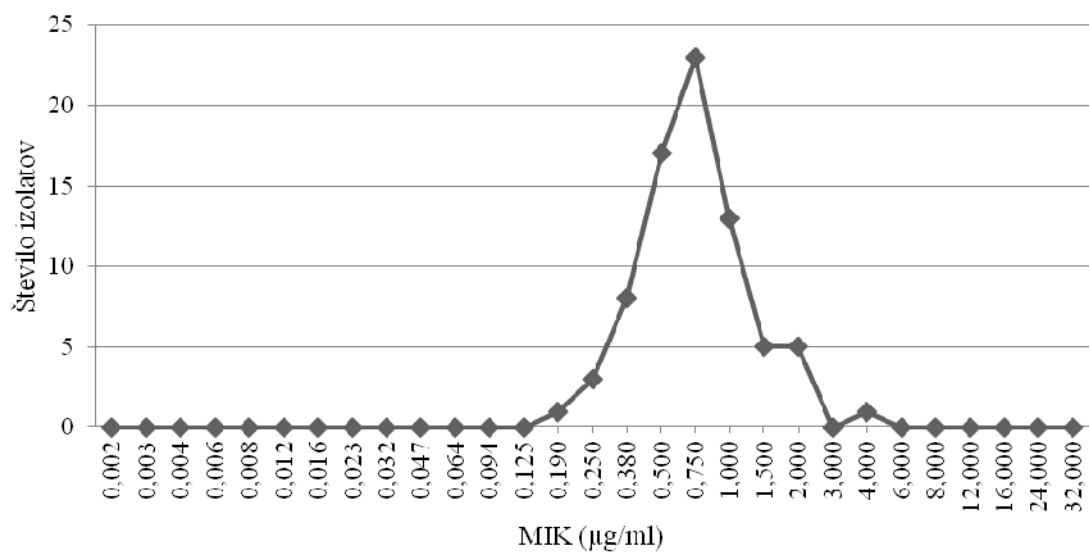
Slika 18: Porazdelitev minimalnih inhibitornih koncentracij (MIK) med izolati *C. parapsilosis* kompleksa za antimikotik flukonazol (N=76 izolatov)



Slika 19: Porazdelitev minimalnih inhibitornih koncentracij MIK med izolati *C. parapsilosis* kompleksa za antimikotik vorikonazol (N=76 izolatov)



Slika 20: Porazdelitev minimalnih inhibitornih koncentracij MIK med izolati *C. parapsilosis* kompleksa za antimikotik amfotericin B (N=76 izolatov)



Slika 21: Porazdelitev minimalnih inhibitornih koncentracij MIK med izolati *C. parapsilosis* kompleksa za antimikotik kaspofungin (N=76 izolatov)

Občutljivost za antimikotike in razporeditev glede na mejne vrednosti MIK, opredeljenih po kriterijih CLSI (za flukonazol, vorikonazol in kaspofungin) in znanih podatkih iz literature (za amfotericin B) je prikazana v Preglednici 10. Vsi izolati vrst *C. metapsilosis* in *C. orthopsilosis* so bili občutljivi za vse testirane antimikotike, dva izolata *C. parapsilosis* sta bila neobčutljiva za amfotericin B in kaspofungin, en pa odporen na flukonazol. Določili smo tudi MIK₅₀ in MIK₉₀. Prikazani so v Preglednici 11.

Preglednica 10: Občutljivost izolatov *C. parapsilosis* kompleksa za antimikotike flukonazol, vorikonazol, amfotericin B in kaspofungin z interpretacijami

Kompleks <i>C. parapsilosis</i>	Skupno št. testiranih izolatov	S (%)	S-DD (%)	R (%)	NS (%)
Flukonazol	76	75 (98,7)	0 (0,0)	1 (1,3)	-
Vorikonazol	76	75 (98,7)	1 (1,3)	0 (0,0)	-
Amfotericin B	76	75 (98,7)	-	-	1 (1,3)
Kaspofungin	76	75 (98,7)	-	-	1 (1,3)

Legenda: S: občutljiv, S-DD: občutljiv z višjimi odmerki antimikotika, R: odporen, NS: ni občutljiv

Preglednica 11: Minimalne inhibitorne koncentracije izolatov MIK₅₀ in MIK₉₀ za *C. parapsilosis* kompleks

	Flukonazol	Vorikonazol	Amfotericin B	Kaspofungin
Število izolatov	76	76	76	76
MIK₅₀	0,125	0,008	0,38	0,75
MIK₉₀	0,75	0,047	0,75	1,5

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

Izhajajoč iz delovne hipoteze, ki pravi da bo vrsta *Candida parapsilosis* med kliničnim izolati prevladovala (vrsti *C. orthopsilosis* in *C. metapsilosis* bosta prisotni v bistveno manjšem deležu) in bodo minimalne inhibitorne koncentracije testiranih antimikotikov primerljive s podatki iz literature, smo prišli do sledečih spoznanj in sklepov.

5.1 RAZPRAVA

C. albicans je najpogostejša vrsta, ki jo povezujemo s človeškimi glivičnimi okužbami, saj je povzročitelj več kot polovice vseh omenjenih okužb. V zadnjih desetletjih pa so se kot povzročitelji začele v večji meri pojavljajati tudi številne druge vrste gliv. Mednje uvrščamo tudi *C. parapsilosis*, ki je v Evropi in Severni Ameriki na tretjem mestu, v Latinski Ameriki in Aziji, pa celo druga najpogosteje osamljena kandida iz krvi (Almirante in sod., 2006; Pfaller in sod., 2008). *C. parapsilosis* je oportunistični patogen, ki kolonizira kožo človeka, zaradi česar so pogostejše okužbe bolnikov z žilnimi katetri in bolnikov, ki prejemajo parenteralno prehrano. Gliva povzroča resne bolnišnično pridobljene okužbe, povezujejo pa jo tudi z hematogenimi kandidozami pri nedonošenčkih (Tavanti in sod., 2005). Čeprav je bila vrsta *C. parapsilosis* sprva obravnavana kot ena, so številne raziskave fenotipskih in genotipskih vzorcev potrdile tri jasno ločene vrste. Tavanti s sodelavci je leta 2005 uporabila metodo MLST in kompleks *C. parapsilosis* ločila v tri vrste: *Candida parapsilosis sensu stricto*, *Candida orthopsilosis* in *Candida metapsilosis*. Porajanje omenjenih patogenov predstavlja nevarnost za v prihodnje, saj lahko pričakujemo povečevanje incidence okužb z njimi. Ravno zaradi tega je raziskovanje virulence, občutljivosti na antimikotike in ne nazadnje epidemiologije, smotrno.

V naši raziskavi smo največ izolatov *C. parapsilosis* kompleksa osamili od bolnikov, ki so se zdravili na Onkološkem inštitutu, Kliničnem oddelku za hematologijo, Kliničnem oddelku za pljučne bolezni in kirurških oddelkih Univerzitetnega kliničnega centra v Ljubljani (Priloga B). Bolniki z malignimi obolenji in imunsko oslabljeni bolniki nasploh, pogosteje zbolevalo za glivičnimi okužbami. Uporaba agresivnih oblik zdravljenja in daljša obdobja nevtropenije pogosto spremlja poškodba sluznic. K večjemu tveganju za

nastanek glivičnih okužb prispeva tudi zdravljenje s kortikosteroidi in široko spektralnimi antibiotiki (Matos in sod., 2008). V raziskavo smo vključili 122 izolatov gliv kvasovk, ki so bili s klasičnimi mikološkimi postopki identifikacije, kot so izgled kolonij na Chrom-C gojišču, morfologija pseudomicelija na koruznem agarju ter rezultati biokemičnih testov API *Candida* (bioMérieux, Marcy-l'Etoile, Francija) in ID 32 C (bioMérieux, Marcy-l'Etoile, Francija), opredeljeni kot *C. parapsilosis* kompleks. Z analizo restriksijskih vzorcev gena SADH, ki je značilen za vse tri vrste *C. parapsilosis* kompleksa smo opredelili 109 (89,3 %) izolatov kot *C. parapsilosis* sensu stricto, 10 (8,2 %) izolatov kot *C. metapsilosis* in 3 (2,5 %) izolate kot *C. orthopsilosis* (Preglednica 6). Skladnost rezultatov s klasičnimi metodami je bila 89,3 %, kar je primerljivo s rezultati Silve iz leta 2009. Slednji je s sodelavci testiral 175 kliničnih in okoljskih izolatov, pri čemer je *C. parapsilosis* sensu stricto potrdil v 160 (91,4 %) primerih, šest izolatov je bilo popolnoma zmotno identificiranih in niso pripadali kompleksu *C. parapsilosis*. Pet (2,9 %) izolatov so opredelili kot *C. metapsilosis* in štiri (2,3 %) kot *C. orthopsilosis* (Silva in sod., 2009). Podobno raziskavo, le veliko bolj obširno, je izvedel Lockhart s sodelavci. Med leti 2001 in 2006 so s konvencionalnimi metodami kot *C. parapsilosis* potrdili 1929 kliničnih izolatov. Z namnožitvijo in restrikcijo gena SADH so 1762 (92,1 %) izolatov opredelili kot *C. parapsilosis* sensu stricto, 117 (6,1 %) izolatov je bilo dejansko *C. orthopsilosis*, 34 (1,8 %) pa *C. metapsilosis* (Lockhart in sod., 2008). Kljub majhnemu številu vzorcev, v naši diplomski nalogi, smo dobili z omenjenimi raziskavami primerljive rezultate v deležu *C. parapsilosis* sensu stricto. Zanimivo je, da smo potrdili večji delež izolatov *C. metapsilosis* (8,2 % vs. 2,9 in 1,8 %) medtem, ko je bil pri drugih raziskavah večji delež osamljenih *C. orthopsilosis* (2,3 in 6,1 % vs. 2,5 %). Lockhart je porazdelitev izolatov tudi geografsko razčlenil, pri čemer je bil v Evropi delež izolatov *C. metapsilosis* 2,9 %. Kocsube je preučil 209 izolatov rodu *Candida*, od tega je bilo le 20 izolatov *C. parapsilosis* (9,6 %). Osamljene izolate je preučil z metodama RAPD in sekvenčno analizo regij ITS ter dokazal, da je 18 izolatov (90 %) *C. parapsilosis*, dva izolata (10 %) pa sta bila *C. metapsilosis*. Raziskava je pomembna predvsem zato, ker sta bila izolata prvi zabeležen primer pojava *C. metapsilosis* v centralni Evropi nasploh, prav tako pa so to vrsto prvič osamili oziroma jo potrdili iz hemokulture (Kocsube in sod., 2007). Retrospektivno analizo 114 izolatov *C. parapsilosis* kompleksa, osamljenih iz krvi in ostalih kliničnih izolatov, je opravil

Asadzadeh s sodelavci v Kuvajtu. Slednji so potrdili *C. parapsilosis* senso stricto v 109 (95,6 %) primerih. Pet (4,4 %) izolatov so opredelili kot *C. orthopsilosis*, medtem ko *C. metapsilosis* niso osamili (Asadzadeh in sod., 2009).

Največ izolatov kompleksa *C. parapsilosis* smo osamili iz kužnin starejših bolnikov, starih nad 60 let. Povprečna starost bolnikov je bila 71 let. Zanimivo je, da je bilo 12 (9,8 %) izolatov osamljenih pri bolnikih mlajših od 10 let, od tega pet (4,1 %) bolnikov še ni dopolnilo enega leta. Najstarejši bolnik v tej starostni skupini je bil star štiri leta (Slika 17). Tudi ti podatki so skladni s pričakovanji saj je znano, da je *C. parapsilosis* pogosto omenjena pri okužbah nedonošenčkov in malih otrocih, pri čemer do okužbe lahko pride preko prenosa kožne flore rok zdravstvenega osebja, ki skrbi za bolnike ali pa pri medicinskih posegih, kot je uvajanje katetrov ali različnih drugih diagnostičnih in terapevtskih posegih. Bolnik se lahko okuži tudi ob prejemanju parenteralne prehrane ali raztopin z visoko koncentracijo glukoze, v katerih se je gliva zmožna razmnoževati. Vzorec osamljenih izolatov *C. metapsilosis* je majhen. Kar 60 % vseh izolatov je bilo izoliranih iz kužnin bolnikov starejših od 50 let, pri čemer te vrste nismo osamili pri bolnikih mlajših od 10 let. Raziskave, ki bi preučila starost bolnikov, z obravnavano glivo, nismo zasledili. Vse tri izolate *C. orthopsilosis* smo izolirali pri starejših bolnikih. Povprečna starost treh bolnikov je 61 let (Rezultati, točka 4.3, 2. odstavek). Starosti bolnikov so primerljive z rezultati raziskave Lockharta. Ta je poročal o povprečni starosti bolnikov z osamljeno *C. orthopsilosis*, med 40 in 49 leti, pri čemer je bil največji delež bolnikov starejši od 60 let (34,8 %) (Lockhart in sod., 2008).

Glivo *C. parapsilosis* najdemo v različnih okoljih, kot komenzal na koži ljudi pa je ena najpogosteje izoliranih gliv, predvsem iz podnohtnega predela človeških rok (Trofa in sod., 2008). Do sistemske okužbe pride predvsem ob fizični poškodbi kože preko katere povzročitelji vstopijo v telo ali preko vstavljenih žilnih katetrov in drugih medicinskih pripomočkov saj je znano, da ima ta vrsta veliko ahderentno sposobnost. *C. parapsilosis* lahko povzroča tudi povrhnje oblike kandidiaze, kot so spremembe na koži, nohtih, in sluznicah. Slednje smo zasledili tudi med našo raziskavo. Največ izolatov, kar 39 (31,9 %) smo osamili iz brisov (Preglednica 8). Najpogostejše odvzemno mesto so bile rane kar nakazuje prisotnost povzročiteljev na koži človeka. Do okužbe rane je lahko prišlo med

samo poškodbo bolnika ali pa pri negi bolnika preko rok zdravstvenega osebja. Pri 11 bolnikih je okužbo rane povzročala *C. parapsilosis* sensu stricto, osamili smo tudi primer okužbe rane s *C. metapsilosis* (Preglednica 8). Otomikozo smo potrdili pri 11 (9,0 %) izolatih, od tega sta *C. metapsilosis* in *C. orthopsilosis* okužbo povzročala vsak pri enem bolniku (Preglednica 9). Med povrhnje kandidoze uvrščamo tudi onihomikozo. Raziskave v veliki večini navajajo dermatofite, kot večinske povzročitelje okužbe nohtov rok in nog, pri čemer naj bi vrste iz rodu *Candida* (pretežno *C. albicans*) povzročale predvsem okužbe nohtov rok (Brilhante in sod., 2005). Delež onihomikoze naj bi se povečeval s starostjo (Godoy-Martinez in sod., 2009). V naši raziskavi smo zasledili en primer onihomikoze (Preglednica 8), pri bolniku starem 81 let. Povzročala jo je *C. parapsilosis* sensu stricto. Slednjo smo povezali tudi z sluznično kandidozo, saj smo jo v šestih primerih izolirali iz žrela, jezika in ustne sluznice, pri eni bolnici pa je povzročila vulvovaginitis (Preglednica 9). Precejšnjo raznolikost kužnin v katerih so osamili glive kompleksa *C. parapsilosis* je v letu 2010 potrdila tudi Tavanti. Pri preučitvi 62 izolatov jih je 14 povzročalo povrhnje kandidoze. V petih primerih (8,0 %) so potrdili onihomikozo, v šestih (9,6 %) pa vulvovaginitis. *C. parapsilosis* sensu stricto so pri petih bolnikih našli v likvorju (Tavanti in sod., 2010), mi smo jo osamili v likvorju le pri enem bolniku (Preglednica 8). Na drugo mesto po številu osamljenih kandid *C. parapsilosis* kompleksa sodijo klinični vzorci krvi oziroma hemokulture bolnikov. Pri 20 bolnikih smo osamili *C. parapsilosis* sensu stricto, v treh primerih pa *C. metapsilosis*. Iz krvi nismo osamili nobene *C. orthopsilosis* (Preglednica 8). Do vdora povzročiteljev lahko pride preko okuženih žilnih katetrov, zaradi česar smo pričakovali večji delež osamljenih kandid iz konic katetrov bolnikov. Med izdelavo naloge smo prejeli dve konici katetrov (Preglednica 8), iz katerih smo osamili *C. parapsilosis* sensu stricto. Glive kompleksa smo osamili tudi iz kliničnih vzorcev spodnjih dihal, v skupno 33 sputumih in aspiratih, pri čemer so bili bolniki večinoma imunsko oslabljeni ali so prejeli antibiotična zdravila. Od teh smo 18 izolatov opredelili kot *C. parapsilosis* sensu stricto, tri izolate kot *C. metapsilosis* in dva kot *C. orthopsilosis* (Preglednica 8).

Za pravilno odločitev izbire antimikotika za zdravljenje glivičnih okužb je pomembna pravilna identifikacija povzročitelja ter določitev profila občutljivosti izolata. Testiranje

občutljivosti glivnih vrst je izrednega pomena tudi pri samem oblikovanju splošnih smernic za zdravljenje, preprečevanje in nadzorovanje širjenja okužb. Izolati *C. parapsilosis* so dobro občutljivi na večino sistemskih antimikotikov, med katere prištevamo poliene (amfotericin B), azole (flukonazol, vorikonazol, posakonazol, itrakonazol) ter ehinokandine (kaspofungin, anidulafungin). Zmanjšana občutljivost na flukonazol naj bi bila med izolati *C. parapsilosis*, ki so bili osamljeni iz krvi, redka (van Asbeck in sod., 2009). Do podobne ugotovitve je prišel tudi Sarvikivi, ki je opazoval občutljivost na flukonazol med 10-letno študijo. Osamil je le en izolat, odporen na flukonazol (Sarvikivi in sod., 2005). Nekaterne objave pričajo o odpornosti *C. parapsilosis* proti vorikonazolu (Ostrosky-Zeichner in sod., 2003; Pfaller in sod., 2007), čeprav starejše prikazujejo celo 100 % občutljivost *Candida* spp. za ta antimikotik (Pfaller in sod., 2003). V naši diplomski nalogi smo testirali občutljivost izolatov kompleksa *C. parapsilosis* na štiri antimikotike, flukonazol, vorikonazol, amfotericin B in kaspofungin. Rezultati so primerljivi s podatki, ki jih je objavil Silva in sodelavci. Večina njihovih izolatov je bila občutljivih za flukonazol (94,4 %), osem izolatov je bilo občutljivih z višjimi odmerki antimikotika (5,0 %), le en izolat je bil odporen proti flukonazolu (0,6 %) (Silva in sod., 2009). Kar 98,7 % vseh naših izolatov je bilo občutljivih za flukonazol (Preglednica 10). Osamili smo le en izolat, iz urina, ki je bil odporen proti flukonazolu (256 µg/ml), pri čemer je imel le-ta tudi višjo MIK za vorikonazol (1,5 µg/ml) (Sliki 18 in 19, Preglednica 10). Tako kot Silva, nismo zaznali odpornih izolatov proti azolom, iz vrst *C. metapsilosis* in *C. orthopsilosis*, Silva je ugotovil, da so MIK amfotericina B vrst *C. metapsilosis* in *C. orthopsilosis* nižje od primerljivih MIK *C. parapsilosis*. Lockhart je do enake ugotovitve prišel pri testiranju občutljivosti sevov na kaspofungin. MIK₉₀ vrednost *C. parapsilosis* je bila 1 µg/ml, za *C. metapsilosis* in *C. orthopsilosis* pa 0,25 µg/ml. Mnoge objave povezujejo *C. parapsilosis* z višjimi MIK-i za ehinokandine v primerjavi z ostalimi vrstami *Candida* (van Asbeck in sod., 2009, Ostrosky-Zeichner in sod., 2003; Kuhn in sod., 2002b), kar je naša diplomatska naloga potrdila. Tako MIK₅₀ kot MIK₉₀ kaspofungina sta bila za *C. parapsilosis* višja (0,75 µg/ml in 1,5 µg/ml) od MIK-ov *C. metapsilosis* (0,38 µg/ml in 1 µg/ml) (Preglednica 11). Povprečne vrednosti MIK₅₀ in MIK₉₀ kaspofungina se v literaturi sicer gibljejo med 0,85-2 µg/ml oziroma 2-2,33 µg/ml (Ostrosky-Zeichner in sod., 2003; Kuhn in sod., 2002b). Naši rezultati testiranja občutljivosti na amfotericin B se

skladajo s podatki iz literature. Vrednosti MIC₅₀ se gibljejo med 0,13 do 1 µg/ml, vrednosti MIC₉₀ med 0,5 in 1 µg/ml (Ostrosky-Zeichner in sod., 2003; Pfaller in sod., 1998a). Zaradi majhnega števila zbranih izolatov, posebno vrst *C. metapsilosis* in *C. orthopsilosis* bi bilo potrebno za objektivnejšo oceno razširiti raziskavo. Na ta način bi lahko natančneje opredelili občutljivostne profile tudi teh dveh vrst, kar bi nam pomagalo pri izbiri empiričnega zdravljenja bolnikov, pri katerih bi osamili te vrste.

Zaradi majhnega števila zbranih izolatov, posebno vrst *C. metapsilosis* in *C. orthopsilosis* bi bilo potrebno za objektivnejšo oceno razširiti raziskavo. Na ta način bi lahko natančneje opredelili občutljivostne profile tudi teh dveh vrst, kar bi nam pomagalo pri izbiri empiričnega zdravljenja bolnikov, pri katerih bi osamili te vrste. Z analizo rezultatov smo dokazali, da *Candida parapsilosis* med kliničnimi izolati bistveno prevladuje. Pomembno pa je vedenje, da znotraj tega kompleksa *Candida parapsilosis* obstajata še dve popolnoma novi vrsti, za kateri ne vemo, kako se obnašata kot patogeni prav tako, pa je še malo znanega o občutljivosti teh vrst za antimikotike. To znanje bo potrebno z raziskavami v prihodnje še razširiti, za smotrno uporabo antimikotikov v vsakdanji klinični praksi.

5.2 SKLEPI

- Z analizo rezultatov smo dokazali, da *Candida parapsilosis* kompleks obsega tudi med izolati, osamljenimi iz kužnin bolnikov zajetih v našo raziskavo, vse tri opisane vrste: *Candida parapsilosis* sensu stricto, *C. metapsilosis* in *C. orthopsilosis*, pri tem prevladuje *Candida parapsilosis* 109 (89,3 %) medtem, ko sta ostali vrsti *C. metapsilosis* 10 (8,2 %) in *C. orthopsilosis* 3 (2,5 %) prisotni v bistveno manjšem deležu.
- Dva izolata *C. parapsilosis* nista bila občutljiva za amfotericin B in kaspofungin, en izolat je bil odporen proti flukonazolu, slednji je imel tudi višjo MIK za vorikonazol.
- Vsi izolati *C. metapsilosis* in *C. orthopsilosis* so bili občutljivi za vse štiri testirane antimikotike, flukonazol, vorikonazol, kaspofungin in amfotericin B.

6 POVZETEK

Candida parapsilosis je oportunistični patogen na koži človeka, patogenost je močno povezana z nedotaknjenostjo kožne povrhnjice. O virulenčnih dejavnikih vrste je sicer malo znanega, a izpostaviti velja adherenco na gostiteljske celice, tvorbo biofilma in izločanje različnih hidrolitičnih encimov. Zadnji dve desetletji se je spekter pojavljanja glivičnih okužb, večinoma na račun vrst, ki niso *C. albicans*, spremenil. Med t.i. porajajoče patogene uvrščamo tudi *C. parapsilosis*, ki je v svetu, zlasti Latinski Ameriki in Aziji, celo druga najpogostejše osamljena kandida. Vrsto let so *C. parapsilosis* kompleks ločevali v tri skupine, I, II in III. Analize polimorfizma restrikcijskih fragmentov so kasneje potrdile obstoj treh različnih vrst: *C. parapsilosis* sensu stricto, *C. orthopsilosis* in *C. metapsilosis*. Namen naše diplomske naloge je bil opredeliti genetsko raznolikost izolatov *C. parapsilosis* kompleksa osamljenih iz vzorcev kužnin in določiti občutljivost izolatov za antimikotike flukonazol, vorikonazol, amfotericin B in kaspofungin. V raziskavo je bilo vključenih 122 izolatov, odvzetih 119 bolnikom, katere smo s klasičnimi mikrobiološkimi postopki identifikacije, opredelili kot *C. parapsilosis* kompleks. Z analizo polimorfizma restrikcijskih fragmentov gena SADH, dobljenih z restrikcijsko endonuklazo *BanI* smo opredelili 109 (89,3 %) izolatov kot *C. parapsilosis* sensu stricto, 10 (8,2 %) izolatov kot *C. metapsilosis* in 3 (2,5 %) izolate kot *C. orthopsilosis*. Največ izolatov, kar 39 (31,9 %) smo osamili iz brisov. Najpogostejše odvzemno mesto so bile rane, kar nakazuje prisotnost povzročiteljev na koži človeka. Na drugo mesto po številu osamljenih izolatov *C. parapsilosis* kompleksa sodijo klinični vzorci krvi oziroma hemokulture bolnikov. V raziskavi smo ugotovili, da so vrste *C. parapsilosis* kompleksa dobro občutljive na večino sistemskih antimikotikov, med katere prištevamo poliene, azole ter ehinokandine. Dobljeni rezultati testiranja občutljivosti na antimikotike se skladajo z že objavljeno literaturo. Kar 98,7 % vseh naših izolatov je bilo občutljivih za flukonazol, le en izolat je bil odporen proti flukonazolu (256 µg/ml). Odpornih izolatov proti azolom, iz vrst *C. metapsilosis* in *C. orthopsilosis* nismo zaznali. Mnoge objave povezujejo *C. parapsilosis* z višjimi MIK-i za ehinokandine v primerjavi z ostalimi vrstami *Candida*, kar je naša diplomska naloga potrdila. MIK₅₀ in MIK₉₀ *C. parapsilosis* za kaspofungin sta bila 0,75 µg/ml in 1,5 µg/ml in sta bili višji od MIK₅₀ in MIK₉₀ za *C. metapsilosis*, ki sta znašala 0,38 µg/ml in 1 µg/ml.

7 VIRI

- Abi-Said D., Anaissie E., Uzun O., Raad I., Pinkowski H., Vertivarian S. 1997. The epidemiology of hematogenous candidiasis caused by different *Candida* species. *Clinical Infectious Diseases*, 24: 1122-1128
- Agatensi L., Franchi F., Mondello F., Bevilacqua R. L., Ceddia T., De Bernardis F., Cassone A. 1991. Vaginal pathogenic and proteolytic *Candida* species in outpatients attending a gynaecology clinic. *Journal of Clinical Pathology*, 44: 826-830
- Almirante B., Rodriguez D., Cuenca-Estrella M., Almela M., Sanchez F., Ayats J., Alonso Tarres C., Rodriguez-Tudela J. L., Pahissa A. 2006. Epidemiology, risk factors, and prognosis of *Candida parapsilosis* bloodstream infections: case-control population-based surveillance study of patients in Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. *Journal of Clinical Microbiology*, 44: 1681-1685
- Almirante B., Rodriguez D., Park B. J., Cuenca-Estrella M., Planes A. M., Almelo M., Mensa J., Sanchez F., Avats J., Gimenez M., Saballs P., Fridkin S. K., Morgan J., Rodriguez-Tudela J. L., Warnock D. W., Pahissa A. 2005. Epidemiology and predictors of mortality in cases of *Candida* bloodstream infection: results from population-based surveillance, Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. *Journal of Clinical Microbiology*, 43: 1829-1835
- Asadzadeh M., Ahmad S., Al-Sweih N., Khan Z. U. 2009. Rapid molecular differentiation and genotypic heterogeneity among *Candida parapsilosis* and *Candida orthopsilosis* strains isolated from clinical specimens in Kuwait. *Journal of Clinical Microbiology*, 58: 745-752
- Borman A. M., Linton C. J., Oliver D., Palmer M. D., Szekely A., Odds F., C., Johnson E. M. 2009. Pyrosequencing analysis of 20 nucleotides of the internal transcribed spacer 2 discriminate *Candida parapsilosis*, *Candida metapsilosis* and *Candida orthopsilosis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 47: 2307-2310

- Brilhante R. S. N., Cordeiro R. A., Medrano D. J. A., Rochal M. F. G., Monteiro A. J., Cavalcante C. S. P., Meireles C. S. P., Sidrim J. J. C. 2005. Onychomycosis in Ceará (Northeast Brazil): epidemiological and laboratory aspects. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 100: 131-135
- Clark A. G., Lanigan C. M. S. 1993. Prospects for estimating nucleotide divergence with RAPD's. *Molecular Biology and Evolution*, 10,5: 1096-1111
- 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
- CLSI. 2008. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast; approved standard- 3rd ed. CLSI document M27-A3. Wayne, PA, CLSI- Clinical and Laboratory Standards Institute: 25. str.
- De Bernardis F., Mondello F., San Millan R., Ponton J., Cassone A. 1999. Biotyping and virulence properties of skin isolates of *Candida parapsilosis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 37: 3481-3486
- Electroforesis de dna plasmidico en gel de agarosa. 2011. Barbacoas, Prys.kyoll.net: 1 str.
<http://prysk.yoll.net/medicina/electrodnapelectroforesis.htm> (januar, 2011)
- Enger L., Joly S., Pujol C., Simonson P., Pflaller M., Soll D. R. 2001. Cloning and characterizatton of complex DNA fingerprinting probe for *Candida parapsilosis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 39: 658-669
- Etest. 2009a. Antifungal susceptibility testing for *in vitro* diagnostic use. Solna, AB Biodisk: 2 str.
<http://www.abbiotest.com/pdf/pi/75002017.pdf> (avgust, 2010)

- Etest. 2009b. For on-scale MIC determination. Marcy l'Etoile, bioMerieux S.A.: 1 str.
http://www.biomerieux-diagnostics.com/upload/Etest_Guide_Antifungal-1.pdf
(oktober, 2010)
- Etest. 2008. Yeast: *Candida* spp. and *Cryptococcus neoformans*. Solna, AB Biodisk: 2 str.
<http://www.abiodisk.com/pdf/eas/M0000145.pdf> (oktober, 2010)
- Garcia-Effron G., Katiyar K. S., Park S., Edlind T. D., Perlin D. S. 2008. A naturally occurring proline-to-alanine amino acid change in Fks1p in *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* accounts for reduced echinocandin susceptibility. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52: 2305-2312
- Garzoni C., Nobre V. A., Garbino J. 2007. *Candida parapsilosis* endocarditis: a comparative review of the literature. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 26: 915-926
- Godoy-Martinez P., Nunes F. G., Tomimori-Yamashita J., Urrutia M., Zaror L., Silva V., Fischman O. 2009. Onychomycosis in São Paulo, Brazil. *Mycopathologia*, 168: 111-116
- Furlan T. 2009. Kandidemije v dveh največjih bolnišnicah v Ljubljani v obdobju od 01.01.2000 do 31.03.2008. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije: 65 str.
- Jakše J. 2007: Rastlinska biotehnologija, Vaje 2006/2007, Univerzitetni študij Agronomije, Vaja 4: Verižna reakcija s polimerazo (PCR), PCR ITS regije in RAPD markerji. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo: 19 str.
http://www.genetika.si/slike/vsebina/File/Rastlinska%20B/Vaje/Vaja4/vaja4_PCR_tekst.pdf (december, 2010)
- Janežič S. 2008. Molekularne metode za tipizacijo črevesnih patogenih bakterij *Clostridium difficile*. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije: 72 str.

- Jug T. 1998. Analiza treh mikrosatelitskih lokusov pri postrvi *Salmo trutta* L. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta. Oddelek za biologijo: 39 str.
- Jug T. 2002. Genetska raznolikost Soške postrvi (*Salmo marmoratus*) v Sloveniji. Magistrsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta: 94 str.
- Kirchgesser M., Schlagenhauer R., Kirchner B., Adem C., Malmberg W., Tgetgel A., Huber I., Nieswandt V., Walter T. 2003. The New MagNA pure compact nucleic acid isolation kits – fast and flexible fully automated sample preparation. *Biochemica*, 4: 12-14
- Kocsube S., Toth M., Vagvolyi C., Doczi I., Pesti M., Poci I., Szabo J., Varga J. 2007. Occurrence and genetic variability of *Candida parapsilosis sensu lato* in Hungary. *Journal of Clinical Microbiology*, 56: 190-195
- Kosa P., Valach M., Tomaska L., Wolfe K., H., Nosek J. 2006. Complete DNA sequence of mitochondrial genomes of the pathogenic yeasts *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis*: insight into evolution of linear DNA genomes from mitochondrial telomere mutants. *Nucleic Acids Research*, 34: 2472-2481
- Kuhn D. M., Chandra J., Mukherjee P. K., Ghannoum M.A. 2002a. Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces. *Infection and Immunity*, 70: 878-888
- Kuhn D. M., George T., Chandra J., Mukherjee P. K., Ghannoum M. A. 2002b. Antifungal susceptibility of *Candida* biofilms: unique efficacy of amphotericin B lipid formulations and echinocandins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46: 1773-1780
- Kuhn, D. M., Mukherjee P. K., Clark T. A., Pujol C., Chandra J., Hajjeh R. A., Warnock D. W., Soil D. R., Ghannoum M. A. 2004. *Candida parapsilosis* characterization in an outbreak setting. *Emerging Infectious Diseases*, 10: 1074-1081

- Kurtzman C. P., Robnett C. J. 1997. Identification of clinically important ascomycetous yeasts based on nucleotide divergence in the 5' end of the large-subunit (26S) ribosomal DNA gene. *Journal of Clinical Microbiology*, 35: 1216-1223
- Lasker B. A., Butler G., Lott T. J. 2006. Molecular genotyping of *Candida parapsilosis* group I clinical isolates by analysis of polymorphic microsatellite markers. *Journal of Clinical Microbiology*, 44: 750-759
- Laffey S. F., Butler G. 2005. Phenotype switching affects biofilm formation by *Candida parapsilosis*. *Microbiology*, 151: 1073-1081
- Lehmann P. F., Lin D., Lasker B. A. 1992. Genotyping identification and characterization of species strains within the genus *Candida* by using random amplified polymorphic DNA. *Journal of Clinical Microbiology*, 30: 3249-3254
- Lin D., Wu L. C., Rinaldi M. G., Lehmann P. F. 1995. Three distinct genotypes within *Candida parapsilosis* from clinical sources. *Journal of Clinical Microbiology*, 33:1815-1821
- Lockhart S. R., Messer S. A., Pfaller M. A., Diekema D. J. 2008. Geographic distribution and antifungal susceptibility of the newly described species *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* in comparison to closely related species *Candida parapsilosis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 46: 2659-2664
- Lupetti A., Tavanti A., Davini P., Ghelardi E., Corsini V., Merusi I., Boldrini A., Campa M., Senesi S. 2002. Horizontal transmission of *Candida parapsilosis* candidemia in a neonatal intensive care unit. *Journal of Clinical Microbiology*, 40:2363-2369
- Mackay I. M., Arden K. E., Nitsche A. 2002. Survey and summary. Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Research*, 30: 1292-1305
- Matos T., Zver S., Seme K., Čižman M., Ravnik J. 2008. Občutljivost gliv kvasovk, osamljenih iz nadzornih kužnin bolnikov s hematološkimi malignimi boleznimi v obdobju 1992-2005. *Zdravniški vestnik*, 77: 117-123

- Melkič E. 2000. Variabilnost nukleotidnih zaporedij dela kontrolne regije mitohondrijske DNA pri postrveh *Salmo trutta*. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko: 68 str.
- Messer S. A., Jones R. N., Fritsche T. R. 2006. International surveillance of *Candida* spp. and *Aspergillus* spp.: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2003). *Journal of Clinical Microbiology*, 44:1782-1787
- Nosek J., Holesova Z., Kosa P., Gacser A., Tomaska L. 2009. Biology and genetics of the pathogenic yeast *Candida parapsilosis*. *Current Genetics*, 55: 497–509
- Nosek J., Novotna M., Hlavatovicova Z., Ussery D. W., Fajkus J., Tomaska L. 2004. Complete DNA sequence of the linear mitochondrial genome of the pathogenic yeast *Candida parapsilosis*. *Molecular Genetics and Genomics*, 272: 173–180
- Nosek J., Tomaska L., Rycovska A., Fukuhara R. 2002. Mitochondrial telomeres as molecular markers for identification of the opportunistic yeast pathogen *Candida parapsilosis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 40: 1283-1289
- Ostrosky-Zeichner L., Rex H., Pappas P. G., Hamill R. J., Larsen R. A., Horowitz H. W., Powderly W. G., Hyslop N., Kauffman C. A., Cleary J., Mangino J. E., Lee J. 2003. Antifungal susceptibility survey of 2,000 bloodstream *Candida* isolates in the United States. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47: 3149-3154
- Park S., Kelly R., Nielsen Kahn J., Robles J., Hsu M. J., Register E., Li W., Vyas V., Fan H., Abruzzo G., Flattery A., Gill C., Chrebet G., Parent S. A., Kurtz M., Teppler H., Douglas C. M., Perlin D. S. 2005. Specific substitutions in the echinocandin target Fks1p account for reduced susceptibility of rare laboratory and clinical *Candida* sp. isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49: 3264-3273
- Pfaller M. A., Bale I. M., Buschelman B., Lancaster M., Espinel-Ingroff A., Rex J. H., Rinaldi M. G. 1994. Selection of candidate quality control isolates and tentative quality control ranges for *in vitro* susceptibility testing of yeast isolates by national committee

- for Clinical Laboratory Standards Proposed Standard Methods. *Journal of Clinical Microbiology*, 32: 1650-1653
- Pfaller M. A., Boyken L., Hollis R. J., Messer S. A., Tendolkar S., Diekema D. J. 2005. *In vitro* activities of anidulafungin against more than 2,500 clinical isolates of *Candida* spp., including 315 isolates resistant to fluconazole. *Journal of Clinical Microbiology*, 43: 5425-5427
- Pfaller M. A., Diekema D. J. 2007. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clinical Microbiology Reviews*, 20:133-163
- Pfaller M. A., Diekema D. J., Gibbs D. L., Newell V. A., Meis J. F., Gould I. M., Fu W., Colombo A. L., Rodriguez-Noriega E. 2007. Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance study, 1997 to 2005: and 8.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* species and other yeast species to fluconazole and voriconazole determined by CLSI standardized disk diffusion testing. *Journal of Clinical Microbiology*, 45: 1735-1745
- Pfaller M. A., Diekema D. J., Gibbs D. L., Newell V. A., Ng K. P., Colombo A., Finquelievich J., Barnes R., Wadula J., Global antifungal surveillance group. 2008. Geographic and temporal trends in isolation and antifungal susceptibility of *Candida parapsilosis*: a global assessment from the ARTEMIS DISK antifungal surveillance program, 2001 to 2005. *Journal of Clinical Microbiology*, 46: 842-849
- Pfaller M. A., Jones R. N., Doern G. V., Sader H. S., Hollis R. J., Messer S. A. 1998a. International surveillance of bloodstream infections due to *Candida* species: frequency of occurrence and antifungal susceptibilities of isolates collected in 1997 in the United States, Canada, and South America for the SENTRY Program. *Journal of Clinical Microbiology*, 36: 1886-1889
- Pfaller M. A., Messer S. A., Hollis R. J., Jones R. N., Doern G. V., Brandt M. E., Hajjeh R. A. 1998b. *In vitro* susceptibilities of *Candida* bloodstream isolates to the new triazole

- antifungal agents BMS-207147, Sch 56592, and voriconazole. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42: 3242-3244
- Pfaller M. A., Messer S. A., Boyken L., Rice C., Tendolkar S., Hollis R. J., Diekema D. J. 2003. Caspofungin activity against clinical isolates of fluconazole-resistant *Candida*. *Journal of Clinical Microbiology*, 41: 5729-5731
- Ramage G., Martinez J. P., Lopez-Ribot J. L. 2006. *Candida* biofilms on implanted biomaterials: a clinically significant problem. *FEMS Yeast Research*, 6: 979-986
- Ramage G., Tomsett K., Wickes B. L., Lopez-Ribot J. L., Redding S. W. 2004. Denture stomatitis: a role for *Candida* biofilms. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 98: 53-59
- Roy B., Meyer S. A. 1998. Confirmation of the distinct groups within the form species *Candida parapsilosis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 36: 216-18
- Rycovska A., Valach M., Tomaska L., Bolotin-Fukuhara M., Nosek J. 2004. Linear versus circular mitochondrial genomes: intraspecies variability of mitochondrial genome architecture in *Candida parapsilosis*. *Microbiology*, 150: 1571-1580
- Sarvikivi E., Lyytikäinen O., Soll D. R., Pujol C., Pfaller M. A., Richardson M., Koukila-Kähkölä P., Luukkainen P., Saxén H. 2005. Emergence of fluconazole resistance in a *Candida parapsilosis* strain that caused infections in a neonatal intensive care unit. *Journal of Clinical Microbiology*, 43: 2729-2735
- Silva A. P., Miranda I. M., Lisboa C., Pina-Vaz C., Rodrigues A. G. 2009. Prevalence, distribution and antifungal susceptibility profile of *Candida parapsilosis*, *C. orthopsilosis* and *C. metapsilosis* in a tertiary care hospital. *Journal of Clinical Microbiology*, 47: 2392-2397
- Sodja E., Matos T., Simčič S. 2009. Mikrobiološka diagnostika invazivne kandidioze. *Zdravniški Vestnik*, 78: 321-327

- Škrlec J. 2010. Dokazovanje adenovirusov v fecesu z verižno reakcijo s polimerazo v realnem času. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije: 58 str.
- Šnajder M. 2009. Vloga molekularnih metod v mikrobiološki diagnostiki (Seminar pri predmetu Temeljna medicinska mikrobiologija, modul 1). Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Interdisciplinarni doktorski študij biomedicine: 14 str.
- Tavanti A., Davidson A. D., Gow N. A., Maiden M. C., Odds F. C. 2005. *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. *Journal of Clinical Microbiology*, 43: 284-292
- Tavanti A., Hensgens L. A. M., Ghelardi E., Campa M., Senesi S. 2007. Genotyping of *C. orthopsilosis* clinical isolates by amplification fragment length polymorphism reveals genetic diversity among independent isolates and strain maintenance within patients. *Journal of Clinical Microbiology*, 45: 1455-1462
- Tavanti A., Hensgens L. A. M., Mogavero S., Majoros L., Senesi S., Campa M. 2010. Genotypic and phenotypic properties of *Candida parapsilosis* sensu stricto strains isolated from different geographic regions and body sites. *BMC Microbiology*, 10: 203, doi:10.1186/1471-2180-10-20: 11 str.
- Tay S. T., Na S. L., Chong J. 2009. Molecular differentiation and antifungal susceptibilities of *Candida parapsilosis* isolated from patients with bloodstream infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 58: 185-191
- Tkavc R. 2007. Identifikacija in genotipizacija entomopatogenih gliv izoliranih iz troglofilnih metuljev *Scoliopteryx libatrix* L. in *Triphosa dubitata* L. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta Enota medoddelčnega študija mikrobiologije: 79 str.
- Tortorano A. M., Rigoni A. L., Biraghi E., Prigitano A., Viviani M. A., FIMUA-ECMM candidaemia study group. 2003. The European confederation of medical mycology (ECMM) survey of candidaemia in Italy: antifungal susceptibility patterns of 261 non-

albicans Candida isolates from blood. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 52: 679-682

Trofa D., Gácsér A., Nosanchuk J. D. 2008. *Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen. Clinical Microbiology Reviews, 21, 4: 606–625

Tumbarello M., Posteraro B., Trecarichi E. M., Fiori B., Rossi M., Porta R., de Gaetano Donati K., La Sorda M., Spanu T., Fadda G., Cauda R., Sanguinetti M. 2007. Biofilm production by *Candida* species and inadequate antifungal therapy as predictors of mortality for patients with candidemia. Journal of Clinical Microbiology, 45: 1843-1850

van Asbeck E. C., Clemons K. V., Stevens D. A. 2009. *Candida parapsilosis*: a review of its epidemiology, pathogenesis, clinical aspects, typing and antimicrobial susceptibility. Critical Reviews in Microbiology, 35: 283-309

Vennewald I., Schönlebe J., Klemm E. 2003. Mycological and histological investigations in humans with middle ear infections. Mycoses, 46: 12-18

Weems J. J. Jr., Chamberland M. E., Ward J., Willy M., Padhye A. A., Solomon S. L. 1987. *Candida parapsilosis* fungemia associated with parenteral nutrition and contaminated blood pressure transducers. Journal of Clinical Microbiology, 25: 1029-1032

Zalar P., Gunde-Cimerman N. 2002. Taksonomija in identifikacija gliv. Ljubljana, Študentska založba: 92 str.

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorju doc. dr. Miroslavu Petrovcu, dr. med., za sprejeto mentorstvo.

Zahvaljujem se somentorici doc. dr. Tadeji Matos, dr. med., za vodenje in strokovno pomoč pri izdelavi diplomske naloge. Hvala, ker ste si vedno vzeli čas za moja vprašanja.

Zahvaljujem se tudi prof. dr. Petru Rasporju za korektno recenzijo diplomske naloge.

Za ves trud, odgovore na moja številna vprašanja ter čas, ki si ga je vzela za pregled diplomske naloge se iskreno zahvaljujem mikrobiologinji Tjaši Cerar.

Zahvala gre tudi sodelavkam v Laboratoriju za diagnostiko glivičnih infekcij na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo v Ljubljani za pomoč pri praktičnem delu diplomske naloge.

Iskreno se zahvaljujem svoji mami in sestri Aleksandri, ki sta me podpirali in bodrili tekom celotne študijske poti. Hvala, za vse vajine pohvale in veselje ob uspehih ter tolažbo v težkih trenutkih. Diplomsko nalogo posvečam očetu kot izpolnjeno obljubo. Hvala, že takrat si vedel da mi bo uspelo!

Za vse spodbudne besede, smeh in dobro voljo se zahvaljujem svojim prijateljicam, še posebej Saši, Janji, Darji in Maji. Naš klepet ob kavi mi je marsikdaj polepšal dan! Saši in Andražu pa gre zahvala tudi za pomoč pri urejanju naloge in prevodu abstrakta.

Hvala Gregatu za vse nasmeha in objeme, ko sem jih najbolj potrebovala. S teboj se zdi vse lažje in dosegljivo.

PRILOGE

Priloga A: Protokol dela za vzorce kužnin vključene v raziskavo

PROTOKOLNA ŠTEVILKA

BOLNIK M Ž

DATUM ROJSTVA

VZOREC URI HEM ASP BLA SPU

ODDELEK

DIAGNOZA _____

VRSTA (določena s PCR)

OBČUTLJIVOST NA ANTIMIKOTIKE

	MIK	INTERPRETACIJA (S, S-DD, R)
FLU		
VOR		
AMB		
CS		

Priloga B: Najpogostejše zdravstvene ustanove oz. klinični oddelki, iz katerih so bili osamljeni izolati

Zdravstvena ustanova ali odderek	Št. izolatov osamljenih v ustanovi/oddelku
Onkološki inštitut Ljubljana	21
Klinični odderek za hematologijo	12
Klinika za otorinolaringologijo in cervikofacialno kirurgijo	10
Klinika za infekcijske bolezni in vročinska stanja	9
Klinični odderek za pljučne bolezni in alergije	8
Klinični odderek za otroško kirurgijo in intenzivno terapijo	7
Klinični odderek za nefrologijo	7
Klinični odderek za anestziologijo in intenzivno terapijo operativnih strok	5
Splošna bolnišnica Trbovlje	4
Klinični odderek za kirurgijo srca in ožilja	3
Klinični odderek za abdominalno kirurgijo	3
Klinični odderek za intenzivno interno medicino	3
Služba za gastroenterologijo	3
Klinični odderek za vaskularno nevrologijo in intenzivno nevrološko terapijo	3
Zdravstveni dom Ljubljana	2
Zdravstveni dom Kočevje	2
Kirurška klinika (transplantacijski center)	2
Center za vojne veterane	2
Dermatovenerološka klinika	2
Klinični odderek za nevrologijo	2
Klinični odderek za revmatologijo	2
Drugi	10
SKUPAJ	122