

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Tanja KAVČIČ

**PRIMERJAVA VRSTNE RAZNOLIKOSTI IN  
KONCENTRACIJ PLESNI V ZUNANJEM IN  
BOLNIŠNIČNEM OKOLJU TER GENOTIPIZACIJA  
PLESNI *Aspergillus fumigatus***

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2009

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Tanja KAVČIČ

**PRIMERJAVA VRSTNE RAZNOLIKOSTI IN KONCENTRACIJ  
PLESNI V ZUNANJEM IN BOLNIŠNIČNEM OKOLJU TER  
GENOTIPIZACIJA PLESNI *Aspergillus fumigatus***

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**COMPARISON OF SPECIES DIVERSITY AND CONCENTRATIONS  
OF MOLDS IN THE OUTSIDE AND HOSPITAL ENVIRONMENT  
AND GENOTYPING OF MOLD *Aspergillus fumigatus***

GRADUATION THESIS  
University studies

Ljubljana, 2009

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 23.06.2008 za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Katjo Seme, dr. med., za somentorico asist. dr. Tadejo Matos, dr. med. in za recenzentko prof. dr. Eva Ružić-Sabljić, dr. med.

Mentorica: prof. dr. Katja Seme, dr. med.

Somentorica: asist. dr. Tadeja Matos, dr. med.

Recenzentka: prof. dr. Eva Ružić-Sabljić, dr. med.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Darja ŽGUR-BERTOK, univ. dipl. biol.

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: prof. dr. Katja SEME, dr. med.

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

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

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

Članica: prof. dr. Eva RUŽIĆ-SABLJIĆ, dr. med.

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

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Tanja Kavčič

**KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA**

ŠD Dn

DK UDK 614.71+579.24: 614.21: 69.05(043)= 163.6

KG higiena zraka/vzorčenje zraka/bolnišnice/gradbena dela/koncentracija plesni/vrstna raznolikost plesni/*Aspergillus fumigatus*/molekularne tipizacijske metode/RAPD

AV KAVČIČ, Tanja

SA SEME, Katja (mentorica)/MATOS, Tadeja (somentorica)/RUŽIĆ-SABLJIĆ, Eva  
(recenzentka)

KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije

LI 2009

IN PRIMERJAVA VRSTNE RAZNOLIKOSTI IN KONCENTRACIJ PLESNI V ZUNANJEM IN BOLNIŠNIČNEM OKOLJU TER GENOTIPIZACIJA PLESNI *Aspergillus fumigatus*

TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)

OP XIII, 96 str., 16 pregl., 31 sl., 96 vir.

IJ sl

JI sl/en

**AB** *A. fumigatus* sodi med najpogosteje plesni, katerih konidiji se prenašajo po zraku, lahko dosežejo pljučne alveole in povzročajo invazivne okužbe z resnimi zapleti in pogostim smrtnim izidom. Zdravljenje je težavno, zato je ključnega pomena preprečevanje možnosti okužbe. Preprečevanje teh okužb temelji tudi na vzorčenju zraka v sobah, v katerih so imunsko oslabljeni bolniki. Z vzorčenjem zraka v bolnišničnem okolju Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana ter v zunanjem okolju, kjer niso in kjer so potekala gradbena dela smo primerjali koncentracije plesni v zraku iz različnih področij. Povprečne koncentracije plesni so bile najvišje na področju, kjer so potekala gradbena dela ( $106,91 \text{ CFU/m}^3$ ), najnižje povprečne koncentracije plesni pa smo zabeležili v bolnišničnem okolju ( $5,29 \text{ CFU/m}^3$ ). Najpogosteje smo osamili plesni iz rodu *Aspergillus* ter vrsti *A. fumigatus* in *A. niger*. Rezultati vzorčenja zraka nakazujejo, da so pomembne razlike med koncentracijo spor plesni v notranjem in zunanjem okolju ter da gradbene dejavnosti zvišujejo koncentracijo plesni v zraku. Izvor okužbe ter tip izolata lahko identificiramo z molekularnimi tipizacijskimi metodami. Naključno pomnoževanje polimorfne DNA (RAPD) je najpogosteje uporabljena metoda za tipizacijo sevov *A. fumigatus* kljub slabši ponovljivosti metode in težji interpretaciji rezultatov tipizacije. Z namenom, da bi ugotovili ali invazivna aspergiloza pri posameznem bolniku izvira iz bolnišnično pridobljene okužbe s plesnijo, smo primerjali med sabo okoljske in klinične izolate *A. fumigatus*. RAPD tip šestih okoljskih izolatov iz hodnika in sobe je bil enak RAPD tipu kliničnega izolata osamljenega iz bolnika P2.

**KEY WORDS DOCUMENTATION**

DN Dn

DC UDC 614.71+579.24: 614.21: 69.05(043)= 163.6

CX air hygiene/air sampling/hospitals/construction works/concentration of molds/species diversity of molds/*Aspergillus fumigatus*/molecular typing methods/RAPD

AU KAVČIČ, Tanja

AA SEME, Katja (supervisor)/MATOS, Tadeja (co-advisor)/RUŽIĆ-SABLJIĆ, Eva (reviewer)

PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology

PY 2009

TY COMPARISON OF SPECIES DIVERSITY AND CONCENTRATIONS OF MOLDS IN THE OUTSIDE AND HOSPITAL ENVIRONMENT AND GENOTYPING OF MOLD *Aspergillus fumigatus*

DT Graduation Thesis (University Studies)

NO XIII, 96 p., 16 tab., 31 fig., 96 ref.

LA sl

AL sl/en

AI *A. fumigatus* is one of the most ubiquitous fungi with airborne conidia, that can be released into the atmosphere, reach the lung alveoli and cause severe and usually fatal invasive infections. Since treatment of these infections is difficult and the outcome is often fatal, preventive measures are of major importance. One of those is also routine air sampling in rooms occupied by immunocompromised patients. With air sampling we intended to compare fungal concentrations at different locations. Air sampling was conducted at hospital University medical centre Ljubljana and in areas with and without construction work. The highest mean concentration (106,91 CFU/m<sup>3</sup>) was in areas where construction work was undertaken, mean concentrations (5,29 CFU/m<sup>3</sup>) were much lower inside the hospital. Most commonly encountered fungal genus was *Aspergillus* spp., with *A. fumigatus* and *A. niger* as the most common species. Results of air sampling revealed that there is essential difference between mean indoor and outdoor fungal concentrations because construction activities can increase levels of airborne fungi. We also compared clinical and environmental isolates of *A. fumigatus* with the intention to find out if cases of aspergillosis in an individual patient were caused by hospital or community acquired *A. fumigatus*. The source of infection and strain type can be identified by the use of molecular typing methods. RAPD (angl. random amplification of polymorphic DNA) is the most commonly used method to type strains of *A. fumigatus*, although RAPD patterns are difficult to repeat or interpret. Six environmental isolates obtained from room and corridor were similar to the isolate obtained from patient 2 (P2).

## KAZALO VSEBINE

<b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA</b>	<b>III</b>
<b>KEY WORDS DOCUMENTATION</b>	<b>IV</b>
<b>KAZALO VSEBINE</b>	<b>V</b>
<b>KAZALO PREGLEDNIC</b>	<b>VII</b>
<b>KAZALO SLIK</b>	<b>IX</b>
<b>SEZNAM OKRAJŠAV</b>	<b>XII</b>

<b>1 UVOD</b>	<b>1</b>
1.1 NAMEN DELA	3
1.2 HIPOTEZE	3
<b>2 PREGLED OBJAV</b>	<b>4</b>
2.1. KLASIFIKACIJA IN GLAVNE LASTNOSTI VRSTE <i>Aspergillus fumigatus</i>	4
<b>2.1.1 Virulenčni dejavniki <i>A. fumigatus</i></b>	7
2.2 EPIDEMIOLOGIJA PLESNI <i>A. fumigatus</i>	13
2.3 SPEKTER KLINIČNIH SINDROMOV, KI JIH POVZROČAJO PLESNI RODU <i>Aspergillus</i>	15
<b>2.3.1 Alergije na antigene <i>Aspergillus</i> spp.</b>	16
<b>2.3.2 Okužbe pri zdravih osebah</b>	16
<b>2.3.3 Okužbe pri imunsko oslabljenih osebah</b>	17
<b>2.3.4 Dejavniki tveganja za nastanek aspergiloz</b>	18
2.4 ZDRAVLJENJE IN PREPREČEVANJE	20
2.5 DIAGNOSTIKA	23
<b>2.5.1 Genotipizacija <i>Aspergillus</i> spp.</b>	24
2.5.1.1 Tehnika naključno pomnožene polimorfne DNK–RAPD	27
2.6 PATOGENEZA IN GOSTITELJEV OBRAMBNI MEHANIZEM	30
2.7 UGOTAVLJANJE PRISOTNOSTI SPOR <i>Aspergillus</i> spp. V ZRAKU	33

2.8 PLESNI V ZUNANJEM ZRAKU IN ZRAKU NOTRANJIH PROSTOROV TER NJIHOV VPLIV NA POČUTJE IN ZDRAVJE LJUDI	34
<b>3 MATERIAL IN METODE</b>	37
3.1 VZORČENJE ZRAKA V BOLNIŠNIČNEM IN ZUNANJEM OKOLJU	37
3.2 MIKROBIOLOŠKA OBRAVNAVA	38
3.3 STATISTIČNA ANALIZA	42
3.4 MOLEKULARNA GENOTIPIZACIJA PLESNI <i>A. fumigatus</i>	42
3.4.1 Izolacija DNK plesni <i>A. fumigatus</i> iz okoljskih in kliničnih vzorcev	42
3.4.2 Preverjanje koncentracije konidijev <i>A. fumigatus</i> pred izolacijo DNK	42
3.4.3 Sestava reakcijske mešanice in pogoji PCR reakcije	43
3.4.4 Dokaz produktov PCR	45
3.4.5 Primerjava RAPD profilov	46
<b>4 REZULTATI</b>	47
4.1 PRIMERJAVA MED KONCENTRACIJO SPOR PLESNI V BOLNIŠNIČNEM OKOLJU, V ZUNANJEM OKOLJU IN V ZUNANJEM OKOLJU-GRADBIŠČE	47
4.2 PRIMERJAVA VRSTNE RAZNOLIKOSTI PLESNI V BOLNIŠNIČNEM OKOLJU, GRADBENEM PODROČJU IN V ZUNANJEM OKOLJU	61
4.3 PRIMERJAVA RODAC PLOŠČ Z RAZLIČNIMI GOJIŠČI	65
4.4 OPREDELITEV IZOLATOV <i>A. fumigatus</i> , OSAMLJENIH IZ KLINIČNIH VZORCEV BOLNIKOV IN IZ BOLNIŠNIČNEGA OKOLJA S TIPIZACIJSKO METODO RAPD	67
<b>5 RAZPRAVA</b>	74
<b>6 SKLEPI</b>	81
<b>7 POVZETEK</b>	82
<b>8 VIRI</b>	85

## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Datum vzorčenja zraka v bolnišničnem okolju, v zunanjem okolju kjer gradbena dela niso potekala in v zunanjem okolju kjer so potekala gradbena dela	38
Preglednica 2: Sestava reakcijske mešanice za verižno reakcijo s polimerazo	44
Preglednica 3: Potek verižne reakcije s polimerazo	45
Preglednica 4: Razpon in povprečna koncentracija plesni ( $CFU/m^3$ ) v bolnišničnem okolju, v zunanjem okolju in v zunanjem okolju-gradbišče	49
Preglednica 5: Povprečna koncentracija posameznih plesni ( $CFU/m^3$ ) v bolnišničnem okolju, v zunanjem okolju in v zunanjem okolju-gradbišče	50
Preglednica 6: Pogoji okolja v času vzorčenja zraka	54
Preglednica 7: Povprečna koncentracija in razpon plesni ( $CFU/m^3$ ) na vseh področjih vzorčenja ter delež plesni <i>Aspergillus</i> spp. glede na vse plesni	57
Preglednica 8: Povprečna koncentracija spor iz rodu <i>Aspergillus</i> ( $CFU/m^3$ ) v bolnišničnem in zunanjem okolju	59
Preglednica 9: Povprečne koncentracije spor ( $CFU/m^3$ ) v notranjem in zunanjem okolju, ki so se pojavljale v najvišjih koncentracijah	60
Preglednica 10: Vrstna raznolikost in pogostost osamljenih plesni iz različnih okolij, izražena v absolutnih številkah (n) in deležu posameznih osamljenih plesni glede na vse osamljene plesni (%)	61
Preglednica 11: Povprečne koncentracije in razpon koncentracij posameznih vrst plesni $CFU/m^3$ v zraku treh različnih bolnišničnih oddelkov	64
Preglednica 12: Prikaz vrstne raznolikosti in povprečne koncentracije posamezne vrste plesni ( $CFU/m^3$ ) na različnih gojiščih v vseh treh okoljih	66
Preglednica 13: Vrstna raznolikost in koncentracija plesni ( $CFU/m^3$ ) v sobah in na hodnikih pred sobami bolnikov P1, P2 in P3	67

Preglednica 14: Izolati <i>Aspergillus fumigatus</i> , osamljeni iz kliničnega vzorca bolnika in iz bolnišničnega okolja	68
Preglednica 15: Izolati <i>Aspergillus fumigatus</i> , osamljeni iz kliničnega vzorca bolnika in iz bolnišničnega okolja	71
Preglednica 16: Izolati <i>Aspergillus fumigatus</i> , osamljeni iz kliničnega vzorca bolnika in iz bolnišničnega okolja	72

## KAZALO SLIK

Slika 1: <i>Aspergillus fumigatus</i> na gojišču Sabouraud (Kavčič, 2007)	5
Slika 2: Virulenčni dejavniki plesni <i>Aspergillus fumigatus</i> (Rementeria in sod., 2005)	12
Slika 3: <i>Aspergillus fumigatus</i> na Sabouraud gojišču (Kavčič, 2007)	23
Slika 4: Kolonije <i>Aspergillus fumigatus</i> na gojišču CYA (angl. Czapek yeast extract agar) po sedmih dneh pri temperaturi 25 °C (A), kolonije <i>Aspergillus fumigatus</i> na gojišču MEA (angl. Malt extract agar) po sedmih dneh pri temepraturi 25 °C (B), kolonije <i>Aspergillus fumigatus</i> na gojišču CYA po treh dneh pri temepraturi 37 °C (Samson in sod., 2007)	39
Slika 5: Konidiofore plesni <i>Aspergillus fumigatus</i> (E-F, velikost merila je 10 µm) (Samson in sod., 2007)	40
Slika 6: Shematski prikaz metode dela; (SABA=Sabouraud, PDA=angl. Potato dextrose agar, CZA=Czapek agar, OA=gojišče z ovsenimi kosmiči, CFU=angl. colony forming units)	41
Slika 7: Sistem elektroforeze z E-gelom (Invitrogen) za dokaz produktov verižne reakcije s polimerazo	46
Slika 8: Osamljene plesni iz zraka s SAS vzorčevalnikom (angl. Surface air system sampler) na gradbišču nove pediatrične bolnišnice na RODAC (angl. Replicate organism detection and counting) plošči z gojiščem Sabouraud (Kavčič, 2008)	47
Slika 9: Osamljene plesni iz zraka s SAS vzorčevalnikom (angl. Surface air system sampler) na gradbišču novega vhoda v urgentni blok Kliničnega centra na RODAC (angl. Replicate organism detection and counting) plošči s Sabouraud gojiščem (levo) ter na RODAC plošči s Czapek gojiščem (desno) (Kavčič, 2008)	48
Slika 10: Osamljene plesni iz zraka s SAS vzorčevalnikom (angl. Surface air system sampler) v zunanjem okolju na RODAC (angl. Replicate organism detection and counting) plošči s Sabouraud gojiščem (Kavčič, 2008)	48

Slika 11: Povprečna koncentracija plesni ( $\text{CFU}/\text{m}^3$ ) v bolnišničnem okolju, v zunanjem okolju in v zunanjem okolju-gradbišče	49
Slika 12: Povprečna koncentracija najpogostejših plesni v zraku bolnišničnega okolja ( $\text{CFU}/\text{m}^3$ )	51
Slika 13: Povprečna koncentracija najpogostejših plesni v zraku zunanjega okolja kjer niso potekala gradbena dela ( $\text{CFU}/\text{m}^3$ )	51
Slika 14: Povprečna koncentracija najpogostejših plesni v zraku zunanjega okolja kjer so potekala gradbena dela ( $\text{CFU}/\text{m}^3$ )	52
Slika 15: Primerjava povprečne koncentracije najpogostejših rodov plesni v zraku treh različnih okolij ( $\text{CFU}/\text{m}^3$ )	52
Slika 16: Povprečna koncentracija plesni iz rodu <i>Aspergillus</i> ( $\text{CFU}/\text{m}^3$ ) na različnih področjih	53
Slika 17: Povprečne koncentracije plesni v zunanjem zraku ( $\text{CFU}/\text{m}^3$ ) glede na čas vzorčenja	54
Slika 18: Odnos med temperaturo in koncentracijo plesni	55
Slika 19: Odnos med relativno zračno vлагo in koncentracijo plesni	55
Slika 20: Povprečna koncentracija plesni ( $\text{CFU}/\text{m}^3$ ) na različnih oddelkih	56
Slika 21: <i>Aspergillus niger</i> in <i>Aspergillus fumigatus</i> (od leve proti desni) na Sabouraud gojišču (Kavčič, 2008)	62
Slika 22 : Prikaz najpogosteje osamljenih plesni v bolnišničnem okolju	62
Slika 23: Prikaz najpogosteje osamljenih plesni v zunanjem okolju, kjer gradbena dela niso potekala	63
Slika 24: Prikaz najpogosteje osamljenih plesni v zunanjem okolju, kjer so potekala gradbena dela	63
Slika 25: Prikaz povprečne koncentracije posamezne vrste plesni ( $\text{CFU}/\text{m}^3$ ) na različnih gojiščih v vseh treh okoljih (bolnišnično, gradbeno, ne gradbeno)	65
Slika 26: RAPD profili izolatov plesni <i>Aspergillus fumigatus</i>	69

Slika 27: RAPD profili izolatov plesni <i>Aspergillus fumigatus</i>	69
Slika 28: RAPD profili izolatov plesni <i>Aspergillus fumigatus</i>	70
Slika 29: RAPD profili izolatov plesni <i>Aspergillus fumigatus</i>	71
Slika 30: RAPD profili izolatov plesni <i>Aspergillus fumigatus</i>	72
Slika 31: RAPD profili izolatov plesni <i>Aspergillus fumigatus</i>	73

**SEZNAM OKRAJŠAV**

ABPA	alergična bronhopulmonalna aspergiloza
AFLP	določanje polimorfizma dolžin pomnoženih fragmentov (angl. amplified fragment length polymorphism)
ALP	serin alkalna proteaza (angl. alkaline serine protease)
Asp-HS	<i>Aspergillus</i> -hemolizin
ATCC	angl. American Type Culture Collection
BAL	bronhoalveolarni izpirek
CFU	angl. colony forming units
CIIM	Klinični oddelek za intenzivno interno medicino
CIT	Klinični oddelek za anesteziologijo in intenzivno terapijo operativnih strok
CYA	Czapek agar s kvasnim izvlečkom (angl. Czapek yeast extract agar)
CZA	Czapek agar
DNK	deoksiribonukleinska kislina
dNTP	deoksinukleotidtrifosfati
EMP	ekstracelularni matrični proteini
ELISA	angl. Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
GVHD	angl. graft-versus-host disease
IA	invazivna aspergiloza
IFN $\gamma$	interferon $\gamma$
IL	interlevkin
HEPA	angl. high efficiency particulate air
HIV	humani imunodeficientni virus
KON	Klinični oddelek za nefrologijo
McF	McFarland
MEA	gojišče z dodanim sladnjem ekstraktom (angl. Malt extract agar)

MEP	metaloproteaza
MLEE	multilokusna encimska elektroforeza (angl. multilocus enzyme electrophoresis)
MLP	mikrosatelitni dolžinski polimorfizem (angl. microsatellite length polymorphism)
MFS	angl. Major facilitator superfamily
NADPH	nikotinamid-adenin-dinukleotid fosfat (angl. nicotinamide adenine dinucleotide phosphate)
OA	gojišče z ovsenimi kosmiči
OTDS	sindrom organskega strupenega prahu (angl. Organic toxic dust syndrom)
PDA	krompirjev agar (angl. Potato dextrose agar)
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. Polymerase chain reaction)
PE	varovalno okolje (angl. protected environment)
PEP	aspergilopepsin F
PKMC	presaditev krvotvornih matičnih celic
RAPD	naključno pomnoževanje polimorfne DNK (angl. random amplification of polymorphic DNA)
RFLP	polimorfizem dolžin restrikcijskih fragmentov (angl. restriction fragment length polymorphism)
rRNA	ribosomalna ribonukleinska kislina
RODAC	angl. Replicate organism detection and counting
ROS	kisikove reaktivne spojine (angl. reactive oxygen species)
SABA	Sabouraud agar
SAS	vzorčevalnik zraka (angl. Surface air system sampler)
SBS	sindrom bolnih zgradb (angl. Sick building syndrom)
SSR	kratka ponovljiva zaporedja (angl. Short-sequence repeats)
STR	kratke tandemske ponovitve (angl. Simple tandem repeats)
TNF $\alpha$	dejavnik tumorske nekroze $\alpha$

## 1 UVOD

V zadnjih desetletjih se incidenca okužb z glivami povečuje, kar je posledica naraščajoče populacije bolnikov z večjim tveganjem za nastanek oportunističnih okužb in neučinkovitih ukrepov za preprečevanje teh okužb. Med pomembne povzročitelje sodijo plesni iz rodu *Aspergillus*. *A. fumigatus* je najbolj patogena vrsta tega rodu in najpogosteši povzročitelj invazivnih okužb. Kot druge vrste *Aspergillus* spp. je tudi *A. fumigatus* močno razširjen v naravi. Naravna ekološka niša te ubikvitarne plesni je zemlja, kjer raste na razpadajočem organskem materialu, spore se nahajajo v zraku in v vodnih virih (Latgé, 1999; Warris in sod., 2003; Voss in sod., 2002).

Hialina plesen *A. fumigatus* je nespolni, anamorfni saprofit, ki povzroča invazivno aspergilozo, pa tudi različna neinvazivna in semi-invazivna stanja (Ruchel in Reichard, 1999). Ob sporulaciji sprosti plesen v zrak številne konidije, ki zaradi svoje velikosti lahko dosežejo pljučne alveole. Kot alergen povzroča alergično bronhopulmonalno aspergilozo (ABPA). Telesna obramba gostitelja temelji na učinkoviti funkciji migetalčnega epitelija dihal ter fagocitozni aktivnosti alveolarnih makrofagov. Pri okvarah te »primarne obrambe«, ki je na primer posledica cistične fibrose ali okvarjene funkcije nevtrofilskih granulocitov pri bolnikih z okrnjenim imunskim odzivom, pride do kolonizacije dihalnih poti, razvoja aspergiloma v pljučih bolnika s tuberkulozo ali sarkoidozo (Rementeria in sod., 2005) ali do invazivne okužbe, ki se kaže v obliki kronične nekrotizirajoče pljučnice ali invazivne aspergiloze. V skupino z večjim tveganjem za nastanek invazivne aspergiloze sodijo bolniki s hemolimfoproliferativnimi obolenji, HIV pozitivne osebe, bolniki z rakavimi obolenji ter bolniki po presaditvi organov in krvotvornih matičnih celic.

Incidenca pri transplantiranih bolnikih varira od 0,7 % do 8,4 %, pri osebah z akutno levkemijo od 5 do 24 %, pri kroničnih granulomatoznih boleznih od 25 % do 40 %, pri HIV pozitivnih osebah do 12 %. Smrtnost varira od 50 % do 90 %, v odvisnosti od časa začetka zdravljenja, razširjenosti bolezni in predvsem od teže okvarjenosti imunskega sistema (Warris in Verweij, 2005).

Za zmanjševanje okužb s plesnimi rodu *Aspergillus* pri imunsko oslabljenih osebah sta ključnega pomena preprečevanje možnosti okužbe z zagotavljanjem ustreznega okolja bivanja bolnikov, ko so ti najbolj ogroženi in preventivno zdravljenje z antimikotiki.

Aspergiloza je namreč eksogeno pridobljena okužba, torej je okolje, v katerem se bolnik nahaja, zelo pomemben dejavnik za razvoj bolezni (Warris in Verweij, 2005).

Na koncentracijo spor vplivajo različni dejavniki, kot so temperatura okolja, vlažnost, vetrovnost, letni čas, prisotnost gradbenih del in številni drugi (Cooper in sod., 2003). Zveza med povečano koncentracijo spor *Aspergillus* spp. v okolju in večim tveganjem za invazivno aspergilozo ni potrjena. Genotipizacija številnih kliničnih in okoljskih izolatov kaže na izredno veliko genomsko raznolikost, kar podpira domnevo, da so okoljski sevi potencialno infektivni (Alberti in sod., 2001). Gradbena ter prenovitvena dela naj bi še posebej povečevala koncentracijo spor v zraku (Curtis in sod., 2005; Pegues in sod., 2002; Panackal in sod., 2002). Z vzorčevalniki zraka lahko spremljamo koncentracijo in spekter plesni v bolnikovem okolju, ter na podlagi rezultatov določamo preventivno zdravljenje. Glede na veliko genetsko raznolikost so se razvile različne metode za natančnejšo opredelitev sevov posameznih vrst plesni (Girardin in sod., 1994; Verweij in sod., 1996; Symoens in sod., 2002; Menotti in sod., 2005; Heinemann in sod., 2004). Razsežnost genetske raznolikosti okoljskih in kliničnih izolatov so prikazali v številnih študijah. Kolonizacija z različnimi sevi *A. fumigatus* je značilna pri bolnikih po presaditvi čvrstih organov ter z aspergilomom (Girardin in sod., 1994; Loudon in sod., 1993; Pegues in sod., 2002), najpogosteje pa je kolonizacija z več sevi opisana pri bolnikih s cistično fibrozo (Mellado in sod., 2000; Debeaupuis in sod., 1997). V eni izmed raziskav so ugotovili, da je bil bolnik s cistično fibrozo koloniziran kar z devetimi različnimi genotipi (Verweij in sod., 1996). V raziskavi, ki je zajela enajst bolnikov z invazivno aspergilozo je bilo dokazano, da so bili trije bolniki kolonizirani z enim sevom, šest bolnikov z dvema sevoma, en bolnik s štirimi in en bolnik s petimi različnimi genotipi plesni *A. fumigatus* (Bertout in sod., 2001). Med genotipizacijskimi metodami so v literaturi najpogosteje omenjene molekularne tehnike, kot je naključno pomnoževanje polimorfne DNK (angl. random amplification of polymorphic DNA, RAPD), metoda določanja polimorfizma dolžin restriktijskih fragmentov (angl. restriction fragment length polymorphism, RFLP),

multilokusna encimska elektroforeza, metoda polimorfizma dolžine pomnoženih fragmentov (angl. amplified fragment length polymorphism, AFLP).

### 1.1 NAMEN DELA

- določiti koncentracijo spor v zraku zunanjega (gradbišče, zunanje okolje brez gradbenih del) in bolnišničnega okolja
- določiti vrstno raznolikost plesni v zraku zunanjega (gradbišče, zunanje okolje brez gradbenih del) in bolnišničnega okolja
- opredeliti izolate *A. fumigatus*, osamljene iz bolnišničnega okolja in iz kliničnih vzorcev bolnikov z metodo naključnega pomnoževanja polimorfne DNK (RAPD)
- uporabiti različna gojišča in jih ovrednotiti

### 1.2 HIPOTEZE

- v zraku zunanjega (gradbišče, zunanje okolje brez gradbenih del) in bolnišničnega okolja pričakujemo različno koncentracijo plesni in domnevamo, da bo koncentracija plesni najvišja na območju, kjer potekajo gradbena dela, nižje koncentracije pričakujemo v zunanjem okolju brez gradbenih del ter najnižje v bolnišničnem okolju
- v zraku pričakujemo širok spekter plesni iz rodov *Absidia*, *Acremonium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Mucor*, *Monilia*, *Paecylomyces*, *Penicillium*, *Stachybotrys*, *Trichoderma*
- v zraku so prisotne različne vrste plesni iz rodu *Aspergillus* (predvsem *A. flavus*, *A. fumigatus* in *A. niger*)
- z genotipizacijo izolatov *A. fumigatus* osamljenih iz kliničnih vzorcev bolnikov in vzorcev okolja, bomo preverili domnevo, da pride do kolonizacije in/ali okužbe bolnikov zaradi bivanja v bolnišničnem okolju
- preverili bomo domnevo, da so gojišča Sabouraud (SABA), s Czapek agarjem (CzA) in krompirjevim agarjem (PDA) enako primerna za osamitev različnih plesni

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1. KLASIFIKACIJA IN GLAVNE LASTNOSTI VRSTE *Aspergillus fumigatus*

Rod *Aspergillus* je bil prvič prepoznan leta 1729 (Mackenzie, 1987). Znotraj tega rodu je opisanih že preko 180 vrst (Pitt, 1994; Denning, 2000; Summerbell, 2003). *A. fumigatus* je najbolj patogena vrsta tega rodu in je v več kot 90 % povzročitelj invazivnih aspergiloz. Po načinu spolnega razmnoževanja ga uvrščamo v deblo *Ascomycota*, red *Eurotiales* in družino *Trichocomaceae*.

*Aspergillus sect. fumigati* vključuje 23 vrst iz rodu *Neosartorya* ter 10 vrst iz rodu *Aspergillus*. Med *Aspergillus sect. fumigati*, prištevamo *A. fumigatus*, *A. brevipes*, *A. duricaulis*, *A. unilateralis*, *A. viridinutans*, *A. fumigatiaffinis*, *A. fumisynnematus*, *A. lentulus*, *A. novofumigatus*, *A. turcosus* ter določene vrste znotraj rodu *Neosartorya*. *A. fumigatus* je morfološko zelo variabilen. Te variacije vodijo v opis različnih različic, kot so: *A. fumigatus* var. *acolumnaris*, *A. fumigatus* var. *albus*, *A. fumigatus* var. *cellulosae*, *A. fumigatus* var. *coeruleus*, *A. fumigatus* var. *ellipticus*, *A. fumigatus* var. *fulviruber*, *A. fumigatus* var. *fumigatus*, *A. fumigatus* var. *griseibrunneus*, *A. fumigatus* var. *helvolus*, *A. fumigatus* var. *lunzinense*, *A. fumigatus* var. *minimus*, *A. neoellipticus*, *A. phialoseptus*, *A. bronchialis*, *A. septatus*, *A. arvi* (Samson in sod., 2007).

*A. fumigatus* je vlknata gliva ali plesen. Identifikacija *A. fumigatus* temelji na makroskopski in mikroskopski morfologiji kolonij.

Na enostavnem gojišču raste hitro. Kolonije *A. fumigatus* zrastejo na gojišču Czapek-Dox pri 25 °C do premera 5 cm v enem tednu. Tipične kolonije so sivo zelene barve, prašnatega ali puhastega reliefsa (Slika 1). Ozadje kolonij je svetlo rumeno do brezbarvno. Zračni micelij se razlikuje glede na starost kolonije, sestavo medija in temperaturo rasti (Matos, 2002; Latgé 1999). Hife so hialine, lahko rahlo pigmentirane, septirane in se dihotomno cepijo pod kotom 45 °.



Slika 1: *Aspergillus fumigatus* na gojišču Sabouraud (Kavčič, 2007)

Za vse vrste plesni iz rodu *Aspergillus* so značilne gladke ali hrapave konidiofore. *A. fumigatus* tvori gladke konidiofore, pogosto rahlo zelene barve v zgornjem delu. To so preoblikovane celice hif, pokončne, v obliki nerazvezjanega steba in so na koncih zadebeljene v široke, kijaste vezikule, premera 20 do 30 µm. Iz zgornjega dela vezikule neposredno izhajajo konidiogene celice, imenovane fialide, dolžine 6 do 8 µm in širine 2 do 3 µm. Fialide so stekleničaste oblike in zelenkaste barve. *A. fumigatus* je uniseriatni, kajti metule niso prisotne. Iz apikalne odprtine konidiogene celice se v bazipentalnem redu tvorijo verižice zelenkastih konidijev, ki niso nikoli razvezjane (Zalar in Gunde-Cimerman, 2002).

Konidiogeneza je semi-endogena, saj se stena novega konidija delno tvori na novo, delno pa iz septuma, ki ločuje posamezne konidije. Infektivne spore, imenovane konidiji, so negibljiva, nespolna oblika razmnoževanja aspergilusov. Konidije obdaja ornamentirana celična stena, so zelenkaste barve, enocelični, kroglasti do elipsoidni, veliki do 3 µm in jih uvrščamo med kserosporne ali suhe konidije. Nanizani v suhe verižice, tvorijo kompaktno stebričasto strukturo na zgornji tretjini vezikla (Zalar in Gunde-Cimerman, 2002; Schmidt in Schmidt, 1999). Obdaja jih hidrofobna površina, ki jim omogoča, da se precej časa obdržijo v okolju, v zraku. Spore so zaradi svoje zgradbe odporne na neugodne vplive okolja in se širijo po zraku. Nekatere nepigmentirane vrste *A. fumigatus* proizvajajo bele konidije. Spolne oblike, teleomorf, naj bi bile neinfektivne (Latgé, 1999). Teleomorfa *A. fumigatus* doslej še niso dokončno potrdili, dopušča pa se možnost, da *Neosartorya fischeri*

predstavlja spolno obliko te plesni. S tremi hipotezami predpostavlajo, zakaj kljub veliki variabilnosti *A. fumigatus* še niso dokazali spolne oblike plesni. Prva hipoteza je, da je do genetskih izmenjav prihajalo preko paraseksualnega cikla, druga trdi, da se je vsa variabilnost ustalila še v času, ko je bil prisoten spolni stadij pri *A. fumigatus*, tretja hipoteza pa zatrjuje, da spolnega stadija plesni še niso odkrili, ampak ta skrivnostni spolni stadij obstaja (angl. Cryptic sexual stage) (Debeaupuis in sod., 1997; Rodriguez in sod., 1996). *A. fumigatus* je termotoleranten, saj je sposoben rasti pri temperaturi do 55 °C ter preživi pri temperaturi do 75 °C. Zaradi svoje termotolerance je esencialna komponenta mikroflore komposta. Do sedaj so odkrili dva gena, ki sta direktno povezana s termotoleranco pri *A. fumigatus*. Minimalna temperatura za rast micelija je 10 do 12 °C, optimalna 37 do 43 °C. Optimalna relativna vlaga za nastanek konidijev je 98 %, za germinacijo spor je optimum 25 °C. Optimalen pH okolja je 3,0 do 8,0 (Rhodes, 2006).

Genom *A. fumigatus* kodira širok spekter glikozilhidrolaz, ki omogočajo plesni razgradnjo komponent rastlinske celične stene. Rezultati primerjave genoma *A. fumigatus* in saprofitnih ali fitopatogenih vrst kažejo na podoben spekter in število encimov, kar potrjuje, da je primarna ekološka niša *A. fumigatus* rastlina. Plesen pa ne proizvaja encimov lignin peroksidaze in mangan peroksidaze, kar kaže na poglavitno vlogo *A. fumigatus* pri razgradnji zelenih delov rastline, ne pa pri razgradnji olesenelih delov. Kot patogen je *A. fumigatus* razvil številne mehanizme za vdor in razrast v gostitelju. Razvil je mehanizme za pridobivanje železa, magnezija, fosfata in cinka od gostitelja (Tekaia in Latgé, 2005). V številnih biokemijskih, molekularnih in imunoloških študijah niso potrdili ključnega dejavnika, odgovornega za patogenost *A. fumigatus*. Vsak sev plesni je potencialno patogen, kar kaže tudi na nespecifičnost gostitelja. Virulenca *A. fumigatus* je multifaktorialna in jo pogojuje aktivacija številnih genov. Ta plesen ne potrebuje humanega gostitelja za svoj popoln biološki cikel, kar potrjuje dejstvo, da je *A. fumigatus* pravi saprofit, ki postane patogen, ko je humani imunski sistem zelo oslabljen. Virulenca predstavlja bolj odpornost plesni na humanega gostitelja kot izražanje specifičnih bolezensko vezanih proteinov (Debeaupuis in sod., 1997).

S sekvenčnimi analizami so predstavili 29,4 Mb velik genom kliničnega izolata *A. fumigatus* Af93, sestavljen iz osmih kromosomov, ki vsebujejo 9,926 genskih zapisov (Nierman in sod., 2005).

### **2.1.1 Virulenčni dejavniki *A. fumigatus***

V zadnjem desetletju je prevalenca okužb, povzročenih s plesnijo *A. fumigatus* močno narasla. Vzrok za to je povečevanje populacije ljudi, ki je ogrožena za nastanek oportunističnih okužb, povečanega števila bolnikov, ki se zdravijo s presaditvijo različnih organov, podaljšane pričakovane življenjske dobe in povečane porabe antibiotikov. Ob povečani uporabi in razvoju novih antimikotikov se je povečalo tudi zanimanje za raziskave na tem področju. Številne izmed njih obravnavajo patogenetski mehanizem nastanka okužbe in virulenčne dejavnike povzročitelja. Za naselitev v gostitelju mora imeti *A. fumigatus* zmožnost pritrditve, penetracije v človeški respiratorni epitelij ter zmožnost uničenja fagocitnih celic. Ekstracelularni matrični proteini (EMP) ali glikoproteini, posebej laminin in fibronektin, delujejo kot mediatorji pri pritrjevanju spor. Patogen izraža površinske adhezine, ki prepoznajo EMP komponente. Spore se s specifičnimi receptorji pritrdirjo na epitelij ali endotelij, krvna telesca in na fibrinske strdke. Domnevajo, da poteka direktno pritrjanje konidijev na alveolarne epitelijske celice preko membranskih glikosfingolipidov pnevmocitov. Adherenca poteka tudi na mestih tesnih medceličnih stikov (Bouchara in sod., 1999).

Celična stena *A. fumigatus* je kompleksna struktura, sestavljena večinoma iz polisaharidov in prispeva k patogenosti plesni. Najpogostejsi polisaharid je  $\beta$  (1-3)-glukan, ki formira skeletno strukturo, deluje kot sidro za polisaharide, kot sta galaktomanan in hitin, sproži aktivacijo komplementa in produkcijo vnetnih mediatorjev. Encimski kompleks  $\beta$  (1-3)-glukan sintaza, je transmembranski proteinski kompleks, sestavljen iz proteinov Rho1, Fks1 ter iz proteina, homolognega ABC bakterijskemu transporterju glukana. Redukcija ekspresije teh genov, ki kodirajo te proteine, se izraža v inhibiciji rasti plesni. Protein Fks1 je esencialen za rast *A. fumigatus*, predstavlja pa tudi osnovo razvoja nove družine antimikotikov, ehinokandinov (Rementeria in sod., 2005).

V celični steni konidijev so različni encimi, ki sodelujejo pri zunajcelični elongaciji in modifikaciji polisaharidov celične stene. Poznane so tri glukanoziltransferaze, ki so odgovorne za elongacijo glukana, imenovane Gel (Rementeria in sod., 2005).

Del celične stene hif in konidijev je tudi galaktomanan, izvencelični antigen, imunoglobulin, ki ga kodira gen *afmp1*. Sodeluje pri prepoznavi in vezavi konidijev na

gostiteljske celice. Predpostavlja, da v konidijih nadomešča funkcijo sialične kisline, ki pogojuje vezavo na fibronektin in laminin. Galaktomanan deluje kot receptor za transport ionov in hrani. Galaktomanan je najbolj uporaben diagnostični kazalec, ki ga lahko določamo v serumu, urinu in likvorju in bronhoalveolarni lavaži pri bolnikih z invazivno aspergilozo. Protein Afmp2 ali manoprotein naj bi bil vključen v nastanek ter sestavljanje celične stene. Tudi ta protein je imunogen in uporaben v serološki diagnostiki (Rementeria in sod., 2005).

Hitin, polisaharidno komponento celične stene, tvorijo hitin sintaze. Družina *chs* genov, ki kodirajo hitin sintaze, vključuje najmanj sedem različnih genov. Med njimi sta najpomembnejša gena *chsE* in *chsG*. Mutacije v teh genih vodijo v nastanek nabreknenih hif, zmanjšano konidiogenezo, znižano aktivnost hitin sintaze in močnega razvejanja hif. Produkti genov *chs* vplivajo na stabilnost celične stene. Pri mutacijah v *chsE* in *chsG* genih plesen primanjkljaj hitina v celični steni nadomesti s povišano koncentracijo  $\alpha$ -glukana (Rementeria in sod., 2005; Horiuchi in Takagi, 1999) .

Negativno nabitи ogljikovi hidrati na površini konidijev posredujejo adherenco na fibronektin in laminin. Zunanji del celične stene konidijev sestavlja hidrofobni proteini, imenovani hidrofobini in pogojujejo hidrofobnost konidijev. Hidrofobini niso prisotni v miceliju in so ekstremno odporni proti kemijski degradaciji. Poznan je protein RodA, ki je pomemben za hidrofobnost konidijev, vezavo na hidrofobne proteine, kot sta albumin in kolagen ter za močan vnetni odgovor gostitelja. Mutacije v genu *rodA* vodijo v nastanek hrapave površine konidijev, v nepopolno vezavo na kolagen in albumin ter dozvetnost konidijev za uničenje s strani alveolarnih makrofagov (Latgé, 1999). Poglavitna funkcija tega hidrofobina naj bi bila v zaščiti konidijev pred alveolarnimi makrofagi. RodB naj bi imel vlogo pri strukturiranju celične stene plesni, nima pa vloge pri zaščiti plesni pred alveolarnimi makrofagi (Paris in sod., 2003).

Nepigmentirane vrste konidijev so manj patogene. Pigment ščiti pred ultravijolično svetlobo, encimsko lizo, oksidanti, ter včasih pred povišano temperaturo. Pigment je pri *A. fumigatus* prisoten le v konidijih ter odsoten v hifah. V sintezi pigmenta melanin-1,8 dihidroksinaftalen ali DHN-melanin je vključena skupina šestih različnih genov. DHN-melanin je pigment, ki inhibira fagocitozo konidijev ter jih ščiti pred kisikovimi prostimi

radikali. Beli konidiji se na komplement vežejo močnejše, njihova celična stena je bolj permeabilna in posledično so bolj občutljivi na protiglivna zdravila. Fagocitoza belih konidijev je kar petkrat intenzivnejša kot fagocitoza pigmentiranih konidijev. Gen *pksP/alb1*, ki kodira DHN-melanin sintazo, je najpomembnejši za pigmentiranost konidijev in posledično za virulenco. Produkt *pksP/alb1* gena ovira zlitje med fagosomom in lizosomom in tako poveča možnost preživetja konidijev (Rementeria in sod., 2005; Brakhage in sod., 1999).

V procesu uničenja spor sodelujejo tudi ROS, kot so  $H_2O_2$  ali superoksidni ion. Detoksifikacijski sistem plesni za nevtralizacijo kisikovih prostih radikalov, ki vključuje katalaze, peroksidaze in superoksid dizmutaze, je esencialen za virulenco plesni, ti encimi pa so smatrani kot virulenčni dejavniki plesni. V *A. fumigatus* so prisotne tri katalaze. Gen *catA* kodira katalazo, prisotno v konidijih. Ta katalaza je odporna proti povišani temperaturi ter detergentom in konidije ščiti pred vplivi okoljskega  $H_2O_2$ , ne nudi pa zaščite pred uničenjem s strani alveolarnih makrofagov. Geni *cat1/catB* in *cat2* kodirajo micelijske katalaze, ki ščitijo plesen pred ROS, niso pa dovolj učinkovite v zaščiti pred polimorfonuklearnimi celicami. Superoksid dizmutaza je učinkovita obramba micelija pred ROS. Plesen ščiti pred oksidativnim mehanizmom fagocitov in je učinkovitejša od katalaz. Pojavlja se v dveh oblikah, MnSOD, ki vsebuje mangan ter v obliki Cu,ZnSOD, ki vsebuje baker in cink. *A. fumigatus* naj bi uporabljal dva razreda membranskih črpalk za črpanje toksičnih komponent imunskega sistema gostitelja iz plesni. Ta dva razreda obsegata MFS črpalko (ang. major facilitator superfamily) ter ABC črpalko (Latgé, 1999).

*A. fumigatus* izloča različne toksične molekule, encime, ki olajšajo adherenco in hidrolizo komponent celic gostitelja ter alergene, ki ovirajo učinkovit imunski odgovor gostitelja. Med degradirajoče encime prištevajo proteaze in fosfolipaze. Med toksine uvrščajo difuzibilno substanco iz konidijev, ki poškoduje komponente makrofagov, inhibira respiratorični izbruh, fagocitozo in ekspresijo citokinov iz makrofagov. Ta substanca je odporna na povišano temperaturo in še ni natančno identificirana. Fumigaklavin C, alkaloidni metabolit, inhibira sintezo DNK in vpliva na limfocite T s preprečevanjem aktivacije, proliferacije in pritrjanja na izvencelični matriks ter z redukcijo produkcije TNF $\alpha$ . Aurasperon C oslabi delovanje živčnega sistema. Vse tri toksine izločajo konidiji. Najbolje preučen je gliotoksin, ki izvira iz hif. Je najmočnejši in najbolje preučevan toksin

iz *A. fumigatus*. Gliotoksin inhibira aktivacijo NADPH oksidaze polimorfnih levkocitov, inhibira makrofagno fagocitozo, blokira aktivacijo T celic in B celic ter generacijo citotoksičnih celic. Deluje kot imunosupresor. In vitro inducira apoptozo makrofagov, inhibira sproščanje IFN $\gamma$  in IL-4, ovira delovanje in povzroča poškodbe na migetalčnem epiteliju. Pri povišani aeraciji poteče hitra produkcija gliotoksina, kar kaže na njegovo vlogo pri respiratornih okužbah z *A. fumigatus*.

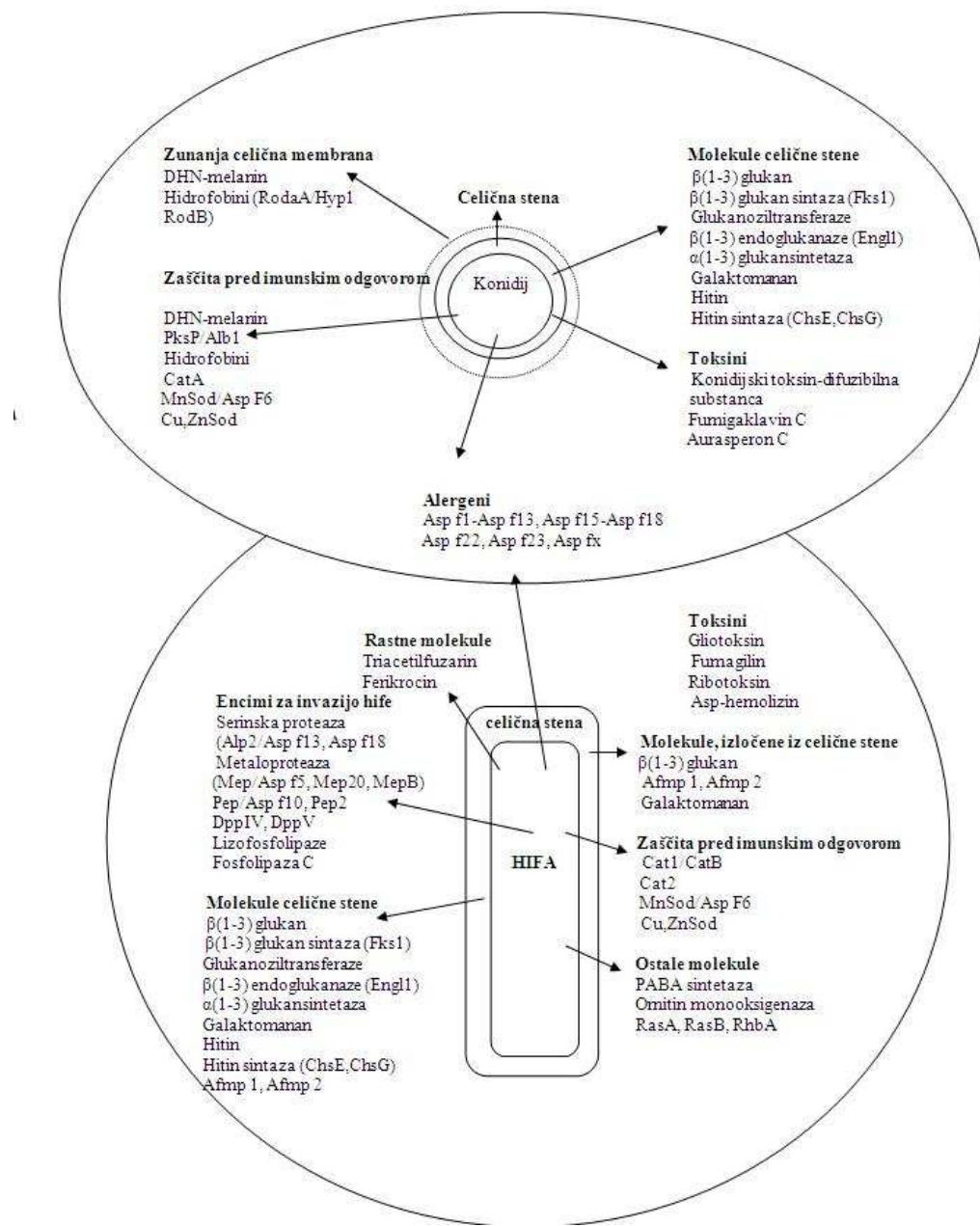
Le nekateri sevi *A. fumigatus* proizvajajo fumigacin, ki pripada družini naravnih steroidnih antibiotikov, imenovanih fuzidani. Vplivajo na oksidativni izbruh makrofagov, na metabolizem oksidiranih lipoproteinov ter povzročajo popoln zastoj migetalčnega epitelija in prekinitev med epitelijskimi celicami. Med toksini je pomemben tudi fumagilin, antitumorski antibiotik, ki je močan inhibitor angiogeneze. Prepreči proliferacijo endotelijskih celic in in vitro inhibicijo migetalčnega epitelija. Ribotoksini so družina inaktivatorjev ribosomov z visoko aktivnostjo proti fosfodiestrski vezi saricin/ricin domene ohranjene na 28S rRNA. Ta RNaza, imenovana tudi Asp f1 ali restriktocin, cepi 28S rRNA evkariontskih ribosomov v specifičnem, ohranjenem, purinsko bogatem zaporedju. Asp f1 v *A. fumigatus* je citotoksičen, inhibira sintezo proteinov ter kot alergen sproži preobčutljivostni odgovor tipa 1. Toksin hemolizin ali Asp-HS deluje citotoksično na makrofage in endotelijske celice in vitro. Delovanje RNaze ali ribotoksina se kaže kot smrt gostiteljskih celic, delovanje hemolizina pa sproži lizo eritrocitov. Ostali sekundarni toksični metaboliti oslabijo delovanje mukociliarnega epitelija, kar podaljša nahajanje plesni na površju epitelija (Latgé, 1999; Rementeria in sod., 2005).

Pri imunsko oslabljenih osebah lahko pride do nastanka alergijske bronhopulmonarne aspergiloze, rinosinuzitisa, astme ali aspergiloma. *A. fumigatus* proizvaja različne alergene. Alergeni od Asp f1 do Asp f23 aktivirajo imunski sistem (Rementeria in sod., 2005).

Za recikliranje organskega materiala in penetracijo v pljučni epitelij, uporablja plesen različne ekstracelularne encime (Tekaia in Latgé, 2005). V humanih in živalskih tkivih so pregrade, ki jih plesen degradira, sestavljeni iz proteinov. *A. fumigatus* izloča različne proteaze, ki olajšajo plesni invazijo v tkiva in omogočajo pridobivanje hrani. Glavni komponenti pljučnega matriksa sta kolagen in elastin. Encimi, s kolagenolitično in elastolinolitično aktivnostjo so tako ključni dejavniki v patogenosti plesni *A. fumigatus*.

*A. fumigatus* s sekrecijo proteaz poškoduje alveolarni epitelij, proteaze preuredijo aktinski citoskelet celic ter onemogočijo pritrjanje celic. Poškodujejo integriteto epithelija, se vežejo na celične receptorje alveolarnih makrofagov in s tem sprožijo izločanje vnetnih kemokinov in citokinov (Latgé, 1999). Plesen naj bi izločala najmanj tri različne proteaze in vivo. Glavna proteaza pri *A. fumigatus* je serin alkalna proteaza, Alp, ki ima elastinolitično aktivnost, razgrajuje kolagen, fibrinogen, kazein, z manjšim vplivom deluje tudi na hemoglobin in serumski albumin. Plesen izloča še Alp2 ali Asp f13 proteazo ter Asp f18 proteazo. Ti dve proteazi sta membransko vezani, plesni olajšajo širjenje med gostiteljevimi tkivi. Od skupne kolagenolitične aktivnosti kar 30 % aktivnosti opravi metaloproteaza, Mep (Latgé, 1999), ki razgrajuje kolagen. Tretja od pomembnejših proteaz, dokazana pri *A. fumigatus*, je proteaza Pep, ektracelularna aspartatna proteaza, Asp f10 ali aspergilopepsin F, ki sodeluje v morfogenezi plesni in deluje kot alergen. Poznana je tudi Pep2 proteaza, ki je vezana na membrano (Latgé, 1999; Rementeria in sod., 2005; Monod in sod., 1999).

Delež v patogenosti plesni prispevata tudi glikoproteina DppIV in DppV, ki razgrajujeta kolagen, hormone in citokine na inaktivne molekule ter fosfolipaze, ki jih kodirajo geni *plb1*, *plb2* in *plb3* (Rementeria in sod., 2005). Virulenčni dejavniki plesni *A. fumigatus* so predstavljeni na sliki 2.

Slika 2: Virulenčni dejavniki plesni *Aspergillus fumigatus* (Rementeria in sod., 2005)

## 2.2 EPIDEMIOLOGIJA PLESNI *A. fumigatus*

*Aspergillus* spp. so ubikvitarne saprofitne plesni, pojavljajo se povsod po svetu, v zelo različnih okoljih. Naravno ekološko nišo predstavlja zemlja, kjer raste na razpadajočem organskem materialu, najdemo pa ga tudi v stanovanjih, v gradbenih elementih, na sobnih rastlinah, v tobaku, hrani in vodi. Število spor se v zraku spreminja zaradi različnih dejavnikov, kot so gradbena dela, prenavljanje, izkopi, čiščenje stanovanj, spremembe temperature, vlažnosti, svetlobe, zračnih tokov. Najpogosteji način okužbe je z vdihovanjem infektivnih konidijev, do okužbe redkeje pride z vstopom povzročiteljev preko ran, opeklín, vsadkov, z zaužitjem ali aspiracijo. V eni izmed študij so dokazali okužbo iz bolnika na bolnika, ki naj bi se prenesla z aerosolizacijo spor *A. fumigatus* pri previjanju in čiščenju rane (Pegues in sod., 2002). Okužba je eksogena, do nje lahko pride v bolnišnici ali v domačem okolju. Inkubacijska doba od okužbe do pojava kliničnih znakov ni znana. V nekaterih raziskavah opredeljujejo okužbo kot bolnišnično okužbo, če je do invazivne aspergiloze prišlo po več kot enem tednu od sprejetja bolnika v bolnišnico, če bolnik ni imel nobenih kliničnih in radioloških znakov invazivne aspergiloze ob sprejemu in je bil v času hospitalizacije stalno na določenem oddelku (Alberti in sod., 2001). *A. fumigatus* sprošča številne konidije, ki so zelo odporni in v okolju preživijo več mesecev. Z zračnimi tokovi se konidiji širijo po zraku in se posedajo po površinah. Vdihane konidije fagocitirajo alveolarni makrofagi, pri imunsko oslabljenih osebah pa pride do invazivne rasti hif v tkivo. Prisotnost plesni v bolnišnični vodi igra pomembno vlogo kot vir invazivne aspergiloze. Plesni so lahko prisotne v pitni vodi, v vodovodnem sistemu. V raziskavi, ki je trajala tri leta, so ugotovljali prisotnost plesni v pitni vodi v bolnišnici. Kar 32 % vzorcev vode je vsebovalo filamentozne plesni. *Aspergillus* spp. je vsebovalo 21 % pozitivnih vzorcev (Warris in sod., 2001). Visoke koncentracije konidijev so zasledili v vlažnih notranjih prostorih, v kopalnicah. Po prhanju v bolnišničnih kopalnicah koncentracija konidijev močno naraste. V raziskavi so preverjali, ali se koncentracija plesni poveča zaradi direktne aerosolizacije iz vodovodnega sistema ali zaradi spiranja kontaminiranih površin s tekočo vodo. Površine ostanejo vlažne, prisotne so visoke temperature, kar ustvarja idealno mikronišo za rast in razvoj plesni. V kopalnicah so vzorčili zrak po prhanju v predhodno očiščenih in v neočiščenih kopalnicah. Ugotovili so,

da je koncentracija plesni v kopalnicah, ki so bile pred prhanjem očiščene, petkrat nižja kot v kopalnicah, ki niso bile očiščene (v čistih kopalnicah je bila koncentracija 2,4 CFU/m<sup>3</sup> v neočiščenih pa 12,22 CFU/m<sup>3</sup>). Koncentracija spor *A. fumigatus* je bila v očiščenih kopalnicah enajstkrat nižja kot v neočiščenih. Iz dobljenih rezultatov so zaključili, da je povečana koncentracija spor po prhanju v veliki meri posledica spiranja kontaminiranih površin z vodo (Anaissie in sod., 2002). Vzorci iz vodovodnih rezervoarjev v bolnišnicah so vsebovali veliko število filamentoznih plesni. Povprečna porazdelitev plesni v bolnišničnem zraku in v vodovodnih sistemih je bila zelo podobna, najpogosteje so izolirali plesen *A. niger*, sledile pa so plesni *A. fumigatus*, *A. terreus* in *A. flavus*. Dokazali so, da se bolnik lahko okuži z vdihovanjem konidijev *Aspergillus* spp., ki izvirajo iz aerosolizirane vode, da se *Aspergillus* spp. lahko podvaja v vodnih rezervoarjih, še posebno v takšnih, ki vsebujejo bakterijske biofilme ter da se koncentracija plesni poveča ob gradbenih in prenovitvenih aktivnostih (Anaissie in sod., 2002). *Aspergillus* spp. je prisoten v površinskih vodah, ki so v stiku z zrakom, v katerem so prisotni konidiji. Iz podtalnih voda niso izolirali plesni. Nižje koncentracije plesni so bile v vodovodnem sistemu, ki izvira iz podtalne vode, kot v vodovodnem sistemu iz površinskih voda (Warris in sod., 2001). Ob zaužitju kontaminirane vode se najpogosteje razvije gastrična ali intestinalna aspergiloza. Primeri primarno tkivne aspergiloze pa so najpogostejši pri nedonošenih novorojenčkih in osebah z opeklinami ali globokimi ranami (Warris in sod., 2001).

## 2.3 SPEKTER KLINIČNIH SINDROMOV, KI JIH POVZROČAJO PLESNI RODU *Aspergillus*

*A. fumigatus*, oportunistična plesen, povzroča širok spekter bolezenskih stanj, imenovanih aspergiloze. Oportunistične okužbe povzroča le okoli 35 vrst iz rodu *Aspergillus*, najpogosteje *A. fumigatus*. Sledita mu vrsti *A. flavus* in *A. niger*, redkeje *A. clavatus*, *A. glaucus*, *A. nidulans*, *A. oryzae*, *A. terreus*, *A. ustus*, *A. versicolor*. Potek bolezni in klinična slika sta različni pri imunsko osabljenih in zdravih osebah, pri slednjih se bolezen pojavi redko. Smrtnost je visoka pri bolnikih, ki se zdravijo s presaditvijo pljuč (17 do 26 %), krvotvornih matičnih celic (5 do 15 %), srca (2 do 13 %), pri bolnikih z akutno levkemijo (5 do 24 %) in pri bolnikih z limfomom (1 do 3 %) (Curtis in sod., 2005).

Do okužbe pride najpogosteje z vdihovanjem konidijev, poznamo pa še druga vstopna mesta, kot so koža, peritonej, ledvica, oči, prebavila. *A. fumigatus* je angioinvazivna plesen, ki lahko predre anatomske pregrade, steno krvnih žil, hrustanec ter povzroči krvavitve, arterijske embolije in posledično infarkte tkiva. Nekatere vrste *Aspergillus* spp. povzročajo zastrupitve z mikotoksini, ki jih zaužijemo s hrano, najpogosteje s kontaminiranimi žiti. *A. fumigatus* naj bi izločal gliotoksin, ki deluje kot inhibitor imunskega sistema. Njegove neposredne vloge pri nastanku obolenja pa še niso dokazali (Ruchel in Reichard, 1999).

*A. flavus* in *A. parasiticus* sta poznana po tvorbi aflatoksinov, hepatokarcinogenih spojin. Tarčni organ aflatoksina B<sub>1</sub> so jetra, aflatoksini pa naj bi imeli tudi tumor promotorsko vlogo v povezavi z drugimi dejavniki (npr. virusom hepatitisa B). Z zaužitjem aflatoksinov naj bi bil povezan tudi Reyev hepatocerebralni sindrom. Domnevajo, da so mikotoksini povzročili veliko smrtnost med arheologi, ki so odpirali grobnice. Bolezen so imenovali Tutankhamonovo prekletstvo (Hedayati in sod., 2007).

Aspergiloza nastopa v različnih oblikah, ki jih lahko razdelimo na: alergije, aspergiloze pri imunsko oslabljenih osebah, kronične diseminirane aspergiloze in aspergiloze pri zdravih osebah. Med alergije, ki jih povzroča *A. fumigatus*, prištevamo aspergilusno astmo, ekstrinzičen alergijski alveolitis ter alergijsko bronhopulmonarno aspergiliozo.

Bolezni, ki jih povzroča *A. fumigatus* pri zdravih ljudeh so kožna aspergiloza, sinuzitis, zunanji otitis, invazivna pljučna aspergiloza, aspergilom, plevritis in empiem, okužbe oči. Pri imunsko oslabljenih osebah povzroča trahealen bronhitis in kronično nekrotizirajočo bronhopnevmonijo, hemoragični infarkt, invazivno pljučnico (Ruchel in Reichard, 1999).

### **2.3.1 Alergije na antigene *Aspergillus* spp.**

Alergijska bronhopulmonarna aspergiloza ali ABPA (angl. Allergic bronchopulmonary aspergillosis) je preobčutljivostna bolezen pljuč, ki nastane najpogosteje pri atopikih, ki imajo značilne epizode bronhialnih obstrukcij (napadi astme) in periferne eozinofilije po vdihovanju spor *Aspergillus* spp. Zanjo so značilni pljučni infiltrati, periferna eozinofilia, povečana koncentracija celotnih IgE, kožna preobčutljivostna reakcija na antigene *Aspergillus* spp., dvig specifičnih IgE in IgG proti antigenom *Aspergillus* spp. (Patterson, 2005). Najprej se zaradi vdihanih spor pojavi preobčutljivostna reakcija tipa 1, posledica pa je vnetje bronhialne stene. Temu po nekaj urah sledi preobčutljivostna reakcija tipa 3, (Matos 2002; Soubani in Chandrasekar, 2002). Pri tem pride do aktivacije komplementa in še hujšega destruktivnega bronhialnega vnetja. Dolgotrajna izpostavljenost manjšim količinam antiga vodi v nastanek pljučne fiboze, proksimalnih resorbcijskih atelektaz ali bronhioloektazij (Matos 2002; Ruchel in Reichard, 1999). Bolnikov sputum je rjavkast, krvav, gnojen, vsebuje mukusne delce z eozinofilci in Charcot-Leydnov-eje kristale. (Latgé, 1999; Patterson, 2005).

*Aspergillus* spp. pogosto povzročajo tudi alergijski sinuzitis. Pojavlja se pri mladih imunokompetentnih odraslih osebah s kroničnimi ponavljačimi rinosinuzitisi, ki slabo odgovorijo na zdravljenje z antibiotiki, antihistaminiki ali kortikosteroidi. Kaže se z enostranskim rumenozelenim nosnim izcedkom, polipozo nosu ali sinusov, ki zaradi ekspanzivne rasti lahko privede celo do nekroze kosti sinusov in poškodbe orbite, kjub temu, da pri tem ne gre za invazivno rast plesni. Tudi tu so laboratorijski znaki podobni kot pri ABPA, periferna eozinofilia, povečana koncentracija celotnih IgE, kožna preobčutljivostna reakcija na antigene *Aspergillus* spp., dvig specifičnih IgE in IgG proti antigenom *Aspergillus* spp.

### **2.3.2 Okužbe pri zdravih osebah**

Aspergiloze pri zdravih osebah večinoma predstavljajo saprofitno kolonizacijo plesni.

Kožna aspergiloza, ki se kaže s hemoragičnimi nekrozami tkiva, nastane pri poškodbah epidermisa, ob opeklinah, na mestu vstavitve intravenoznega katetra in na vsadkih (Ruchel in Reichard, 1999).

Aspergilusni sinuzitis, obolenje zgorjih dihal, je neinvazivna aspergiloza obnosnih votlin. Gliva se ne naseli v sluznici sinusov, ampak se razraste v obliki vlaknatega klobčiča, aspergiloma. Aspergilom moti drenažo sinusa in povzroča vnetje sluznice (Matos, 2002).

Pri starejših bolnikih z diabetesom ali drugimi kroničnimi boleznimi pride do nastanka invazivne aspergiloze, kar vodi v nastanek orbitalne flegmone, slepoto, trombozo ter invazijo v možgane (Ruchel in Reichard, 1999).

Vnetje zunanjega ušesa ali otitis eksterna je kot posledica okužbe z aspergili pogostejše v vlažnih podnebjih. V večini primerov je povzročitelj otomikoze *A. niger* (Patterson, 2005). Okužbo spremlja slabši sluh, kljuvajoča bolečina in izcedek iz sluhovoda (Matos, 2002).

*A. fumigatus* se podobno kot v obnosnih votlinah razraste v obliki aspergiloma v pljučnih votlinah, ki so nastale kot posledica tuberkuloze, sarkoidoze, bonhiektažij, histoplazmoze (Patterson, 2005). Ob tem nastane zračni obroč, ki obdaja steno votline, kar je značilno za aspergilom. Plesen se v steno votline pecljato vrašča. Bolezen je lahko asimptomatska, lahko pa bolniki produktivno kašljajo, imajo občasne hemoptize in oteženo dihanje. Resen zaplet bolezni je masivna hemoptiza (Matos, 2002). Smrtnost zaradi masivne hemoptize je 2 % do 14 % (Soubani in Chandrasekar, 2002).

Infekcija oči ali keratitis je pogosta v ruralnih območjih s tropskim podnebjem, lahko vodi v ulkus roženice. Okužba se lahko pojavi po poškodbah oči ali po operacijah roženice (Patterson, 2005; Ruchel in Reichard, 1999).

### **2.3.3 Okužbe pri imunsko oslabljenih osebah**

Traheobronhitis (vnetje sapnika in bronhusov) s kolonizacijo dihalnih poti s plesnijo *A. fumigatus* ter ulceracijo sluznice se ponavadi razvije pri bolnikih z diabetes mellitus, zdravljenih s kortikosteroidi ali s predhodnimi boleznimi kot je tuberkuloza. Traheobronhitis lahko nastane tudi kot posledica transplantacije pljuč ali se razvije pri bolnikih z AIDS-em. Nastajajo ulcerativne lezije nekrotične psevdomembrane. Bolniki

težje dihajo, kašljajo in imajo povišano telesno temperaturo (Patterson 2005; Ruchel in Reichard, 1999).

Invazivna pljučna aspergiloza je najpogostejsa oblika invazivne aspergiloze pri nevtropeničnih bolnikih, bolnikih po transplantacijah krvotvornih matičnih celic, po transplantacijah čvrstih organov, bolnikih zdravljenih s kortikosteroidi, pri HIV pozitivnih osebah. Pri nevtropeničnih bolnikih z manj kot 500 nevtrofilcev/mm je bolezen smrtna. Značilna je infiltracija parenhima, penetracija anatomskeh pregrad, krvnih žil ter hematogena razširitev. Hemoragični infarkt pljučnega tkiva lahko nastane kot posledica trombembolije pljučnih žil (Ruchel in Reichard, 1999; Soubani in Chandrasekar, 2002; Soubani in Qureshi, 2002).

Invazija v pljučni parenhim se začne z inhalacijo infektivnih konidijev, temu sledi širjenje hif v pljučni parenhim in prodiranje v žile, kar vodi v nastanek trombov, pljučnih infarktov in krvavitev. Bolezen se kaže kot akutna pljučnica, s povišano telesno temperaturo, kašljem, hemoptizami in plevralnimi bolečinami (Matos, 2002).

Diseminirana aspergiloza nastane pri približno 1/3 nevtropeničih bolnikov z aspergilusno pljučnico. Plesen se hematogeno širi v možgane, srce, ledvica, jetra, vranico. Kožne metastaze se kažejo v obliki nekrotičnih ulkusov, prekritih s krasto. Aspergiloza centralnega živčnega sistema je glavna manifestacija hematogenega širjenja (Ruchel in Reichard, 1999). Smrtnost cerebralne aspergiloze je 90 % (Patteson, 2005). Klinični znaki encefalitisa in možganskega infarkta pri neutropeničnih bolnikih kažejo na cerebralne hemoragije in nekroze, ki nastanejo zaradi poškodb krvnih žil. Gastrointestinalni trakt predstavlja drugo najpomembnejše mesto širjenja plesni. Pri hematogeni razširitvi plesni v srce pride do poškodb endokarda, nastanejo trombembolične nekroze in fokalni miokarditis. Multifokalna razširitev vključuje tudi prizadetost drugih organov kot so ledvice, jetra, ščitnica idr. (Ruchel in Reichard, 1999).

#### **2.3.4 Dejavniki tveganja za nastanek aspergiloz**

*A. fumigatus* je ubikvitarna plesen. Inokulum za nastanek okužbe še ni opredeljen, vendar ljudje z normalnim obrambnim sistemom izredno redko razvijejo bolezen, kljub stalni izpostavljenosti konidijem v zraku, vodi in hrani. Za razliko od teh pa so bolniki, ki prejemajo kortikosteroide, ki inhibirajo aktivnost prve obrambe v pljučih to je aktivnost

alveolarnih makrofagov in nevtropenični bolniki, veliko bolj občutljivi za razvoj težko potekajočih okužb. Med njimi so na prvem mestu bolniki, ki se zdravijo s presaditvijo krvotvornih matičnih celic (PKMC), in tisti, ki prejemajo kortikosteroidno zdravljenje ali druge imunosupresive (Warris in sod., 2001). Bolniki z dolgo trajajočo in težko nevtropenijo (manj kot 100 nevtrofilcev/ $\mu$ l) imajo največje tveganje za razvoj invazivne aspergiloze (Latgé 1999; Burwen in sod., 2001; Vandewoude in sod., 2006). Dolgotrajna nevtropenija v povezavi s trajanjem temperature več kot 96 ur nad 38 °C ali pod 36 °C močno poveča možnost nastanka IA (invazivna aspergiloza) (Cooper in sod., 2003). V zadnjem času so se sheme zdravljenja rakavih bolnikov precej spremenile, več uporabljajo rastne faktorje, kar priomore k skrajšanju časa nevtropenije. Pri hematoloških bolnikih, ki se zdravijo s PKMC je prišlo zaradi tega do spremembe v epidemiologiji invazivne aspergiloze. Večje tveganje za IA je časovno razdeljeno v dva dela. Zgodaj po presaditvi, to je prvih 20 dni in kasneje, 100 dni po presaditvi (Wald in sod., 1997; Marr in sod., 2002). Eden od razlogov za to je uporaba nemieloablativne kemoterapije, ki ne vodi več v tako hudo nevtropenijo, pač pa v ospredje prihaja zdravljenje akutne in kronične zavnitvene reakcije (GVHD), iz angl. graft-versus-host disease, z visokodognimi odmerki kortikosteroidov in posledično njihovimi stranskimi učinki (Wald in sod., 1997), kar močno podaljša periodo povečanega tveganja za nastanek IA.

Večje tveganje za nastanek okužb z *A. fumigatus* imajo tudi bolniki po presaditvah čvrstih organov, zlasti pljuč. Tveganje je zelo veliko, saj je incidenca IA pri tej skupini bolnikov kar 10-15 % (Patterson in sod., 2000). Pljuča so neprestano v stiku z zrakom, sposobnost čiščenja dihalnih poti je zmanjšana in mnogi so kolonizirani z *Aspergillus* spp., bodisi po presaditvi, ali pa že od prej. Klinično se IA pri teh bolnikih kaže od ulcerativnega traheobronhitisa, invazivne aspergiloze do diseminirane okužbe. Drugi bolniki z večjim tveganjem so še tisti s kroničnimi pljučnimi boleznimi, cistično fibrozo, kronično granulomatozno boleznijo, bolniki, ki se zdravijo s kortikosteroidi, bolniki z aidsom, nevtropenični bolniki z aplastično anemijo. Med dejavnike tveganja sodijo različne poškodbe pljučnega epitelija, tuberkuloidne kaverne ali poškodbe, nastale kot posledica kemoterapije. Bolniki s cistično fibrozo imajo oslabljeno delovanje mukociliarnega epitelija, posledica je ujetje inhaliranih konidijev v viskozne mukozne izločke. Povprečno so okužbe z *A. fumigatus* pri takšnih bolnikih pogoste v starosti 12 let (Latgé, 1999).

Predhodne epitelijske lezije, nastale kot posledica kroničnih bakterijskih okužb in inducirane z bakterijskimi proteinazami ali z neutrofilnimi elastazami, vodijo v naselitev plesni. Pogostost pljučne aspergiloze se povečuje s podaljševanjem preživetja bolnikov z AIDS-om, pomemben predisponirajoči faktor so tudi pretekle bronhopulmonarne okužbe s citomegalovirusom, *Mycobacterium avium* ali s *Pneumocystis carinii*. Lezije vodijo v nastanek vnetne reakcije ter v izpostavitev membrane med epitelijem in endotelijem, ki je bogata z lamininom. Posledica je dostopnost laminina, fibronektina, kolagena tipa I in tipa IV. Depoziti proteinov ekstracelularnega matriksa in fibrinogena, ki nastajajo na površini ranjenega epitelija kot odgovor na vnetno reakcijo, naj bi posredovali adherenco konidijev na površino celic (Latgé, 1999). Tveganje za razvoj IA je večje tudi pri nedonošenih novorojenčkih in bolnikih s sistemskim eritematoznim lupusom (Kontoyiannis in Bodey, 2002). Visoko tveganje za nastanek IA pri imunsko oslabljenih osebah nastane, če je povprečna koncentracija spor *Aspergillus* spp. višja od 0,9 CFU/m<sup>3</sup> (Alberti in sod., 2001).

## 2.4 ZDRAVLJENJE IN PREPREČEVANJE

Za zdravljenje alergičnih oblik aspergiloze se uporabljajo kortikosteroidi, pri ABPA je učinkovito dodatno zdravljenje z itrakonazolom. Aspergilome je potrebno čim hitreje kirurško odstraniti in nadaljevati zdravljenje z antimikotiki. Smrtnost je lahko kljub zdravljenju 7 do 23 % (Soubani in Chandrasekar, 2002). Za zdravljenje okužb zunanjega sluhovoda se lokalno uporabljajo antimikotične raztopine, kot je nistatin in amfotericin B. Pri invazivni aspergilozi moramo pri bolniku čim hitreje začeti z zdravljenjem, to pomeni že ob sumu na to okužbo. Do nedavnega je bilo zdravilo izbora amfotericin B, ki povzroča pri bolnikih različne stranske učinke. Lipidne oblike amfotericina B so veliko manj toksične in se uporablja pri bolnikih, ki klasično obliko težko prenašajo ali imajo okrnjejo delovanje ledvic in bi jim klasične oblike amfotericina B lahko stanje še poslabšalo. Učinkovitost zdravljenja z lipidno obliko amfotericina B je 40 % do 60 %. V zadnjih letih se je uveljavilo še več novih protigliivičnih zdravil, vorikonazol, posaconazol in antimikotiki iz skupine ehnokandinov, kot je kaspofungin. Teža bolezni je odvisna od

imunskega stanja bolnika in tarčnega organa, ki ga prizadene plesen (Kontoyiannis in Bodey, 2002; Matos 2002).

Ključnega pomena je preprečevanje možnosti okužb z *Aspergillus* spp. z zagotavljanjem ustreznega okolja bivanja bolnikov, ko so ti najbolj ogroženi in preventivno zdravljenje z antimikotiki.

Za preprečevanje okužb in zmanjšanje izpostavitve imunsko oslabljenih oseb sporam plesni, je potrebno vzpostaviti »zaščiteno okolje« ali PE (angl. Protected environment). Takšne sobe se uporablajo zlasti za bolnike, ki se zdravijo s presaditvijo krvotvornih matičnih celic v obdobju hude nevtropenije. PE vključuje (Barnes, 2000; CDC, 1997):

- visoko učinkovito filtracijo zraka z uporabo HEPA filterov, katerih učinkovitost je 99,97 % in filtrirajo delce do velikosti 0,3 µm
- vzdrževanje direktnega toka zraka
- vzdrževanje pozitivnega sobnega zračnega pritiska glede na hodnik pred sobo PE
- dobro tesnenje sobe
- visoko stopnjo izmenjave sobnega zraka, od 15 do 400 izmenjav na uro.

V PE je potrebno stalno izvajanje nadzora nad učinkovitostjo ventilacije in filtracije zraka ter spremljanje zračnega pritiska (Barnes, 2000; CDC, 1997). Uporaba HEPA filterov v kombinaciji z uporabo pozitivnega zračnega pritiska naj bi drastično znižala možnost okužbe s sporami *Aspergillus* spp. V raziskavi so dokazali, da se je incidanca invazivne aspergiloze z uvedbo HEPA filterov znižala iz 24,4 % na 7,1 %. Ko imunsko oslabljeni bolniki niso v PE, priporočajo uporabo filtracijskih mask, ki zadržijo delce do 0,1 µg (Humphreys in sod., 2004; Thio in sod., 2000). V študiji so primerjali navadne sobe in sobe s HEPA filtri in laminarnim zračnim tokom. Ugotovili so, da je ob uporabi HEPA filterov in laminarnega zračnega toka koncentracija spor plesni 0 CFU/m<sup>3</sup>, v sobah s HEPA filteri in brez laminarnega zračnega toka koncentracija 0,8 CFU/m<sup>3</sup>, v navadnih sobah pa od 2,8 do 6 CFU/m<sup>3</sup> (Alberti in sod., 2001). Tveganje za invazivno aspergilozo pri imunsko oslabljenih osebah se zelo poveča, če je povprečna koncentracija spor *Aspergillus* spp. večja od 0,9 CFU/m<sup>3</sup> (Alberti in sod., 2001). Odsvetujejo prhanje bolnikov ter priporočajo uporabo sterilnih vlažnih gob s katerimi se bolnika obriše (Anaissie in sod., 2002). Bolniki z ranami, okuženimi z *A. fumigatus*, morajo biti v ločenih sobah, z negativnim zračnim

pritiskom in z visoko učinkovitostjo filtracije zraka, saj plesen v ranah lahko sporulira in spore okužijo ostale imunsko oslabljene osebe (Pegues in sod., 2002).

Med drugimi higienskimi ukrepi priporočajo vlažno čiščenje horizontalnih površin s predpisanimi čistilnimi sredstvi, uporabo sesalcev s HEPA filtri, v prostorih z bolniki naj ne bi bilo preprog, oblazinjenega pohištva ter rastlin. Klorinacija vode ne uniči vseh plesni, učinkovita je destilacija vode, ki je namenjena pitju ali za osebno higieno bolnikov ali uporaba ustekleničene vode (Warris in Verweij, 2005). Ob obnovi objekta v katerem so imunsko oslabljene osebe, je potrebno upoštevati posebne ukrepe ter med PE in gradbiščem postaviti neprepustno bariero, ločiti vhode/izhode v bolnišnico za osebje bolnišnice in delavce ter še dodatno čistiti prostore, kjer potekajo dela. Ob upoštevanju določenih varnostnih predpisov v času gradnje v bolnišnici se koncentracija plesni v prostorih, kjer prenova ne poteka ali so prisotni imunsko oslabljeni bolniki, ne sme povečati (Cooper in sod., 2003). V raziskavi, ki so jo izvajali v času gradbenih del, so ugotovili, da so bila gradbena dela v 23 % najverjetnejše vzrok za nastanek invazivne aspergiloze pri imunsko oslabljenih bolnikih (Vonberg in Gastmeier, 2006).

V primeru pojava dokazane pljučne aspergiloze je potrebno oceniti ali je do invazivne aspergiloze prišlo doma ali v bolnišnici, določiti število bolnikov z invazivno aspergilozo ter ugotoviti pomankljivosti v filtracijskem in prezračevalnem sistemu. Kemoprofilaksa ni specifično določena (CDC, 1997).

Izven bolnišnice se morajo občutljivejši posamezniki izogibati področjem, kjer je koncentracija plesni povečana (kompost, pokošena trava, veliko lesa). V domačem okolju relativna vлага ne sme presegati 60 %, potrebno je ustrezno zračenje kopalnic in kuhinj, dodajanje inhibitorjev plesni v stenske barve, redno čiščenje prostorov.

## 2.5 DIAGNOSTIKA

Mikrobiološka diagnostika okužb, ki jih povzročajo plesni *A. fumigatus* temelji na mikroskopskem pregledu kužnin, osamitvi in identifikaciji ter na serološki diagnostiki. Z mikroskopskim pregledom lahko ugotovimo prisotnost dihotomno razvejanih hif. Te strukture lahko opazujemo tudi v kliničnih vzorcih, kot so izmeček, izpirek sinusov, bronhoalveolarni izpirek (BAL) in nekrotični material kožnih lezij. Glivične elemente lahko prikažemo z barvanjem po Gramu, specifično pa je barvanje s Calcofluor white barvilom, ki zahteva pregled preparata z UV mikroskopom. Za dokončno diagnozo ne zadošča le pozitiven izvid mikroskopiranja direktnega razmaza vzorca ali histološke rezine, ampak sta nujni tudi osamitev in identifikacija plesni. Za osamitev uporabljamo običajno gojišče po Sabouraud-u (SABA) (Slika 3).



Slika 3: *Aspergillus fumigatus* na Sabouraud gojišču (Kavčič, 2007)

Vrsto *A. fumigatus* identificiramo glede na makroskopske značilnosti kolonije ter glede na mikroskopske morfološke značilnosti (Matos, 2002). Plošče s SABA gojiščem inkubiramo pri temperaturi 37 °C, značilne makroskopske strukture nastanejo po 48-72 urni inkubaciji (Kappe in Rimek, 1999).

Pri imunsko kompetentnih osebah, pri bolnikih z aspergilomom ali ABPA uporablajo v diagnostiki serološke teste za dokaz protiteles proti antigenom *A. fumigatus*. Poznanih je več kot 20 različnih diagnostičnih postopkov za dokaz protiteles, najpogosteje sta v uporabi metodi dvojne imunodifuzije in imunoelektroforeza. Pomankljivost naštetih metod je v kvantifikaciji imunskega odgovora, kar so izboljšali z uvedbo metode ELISA, ki omogoča kvantifikacijo protitelesnega odgovora (Latgé, 1999). Pri ABPA naraste titer protiteles IgE in IgG, skupna serumska koncentracija IgE naraste za več kot 1000 ng/ml (Soubani in Chandrasekar, 2002).

Pri imunsko oslabljenih osebah rast *A. fumigatus* v tkivu gostitelja, ne korelira s povečanjem titra protiteles, zato pri tej skupini bolnikov določanje titra protiteles nima velikega pomena. Velik pomen v diagnostiki invazivne aspergiloze pa ima dokazovanje krožečih antigenov v serumu, urinu ali v bronhoalveolarni tekočini. Galaktomanan je bil prvi dokazan antigen pri bolnikih z IA, dokazujejo še  $\beta$  (1-3) glukan, Asp f1. Metodi za dokaz krožečih antigenov sta lateksna aglutinacija (Kappe in Rimek, 1999) in veliko bolj občutljiva metoda ELISA, ki dokaže že 1 ng galaktomanana v ml seruma (Latgé, 1999). Galaktomanan dokazujejo tudi v vzorcih BAL (Kontoyiannis in Bodey, 2002).

V diagnostiki se razvijajo tudi molekularne metode in dokazovanja DNK plesni v vzorcih. Priporoča se uporaba seruma ali plazme kot kliničnega materiala, kar zmanjša število lažno pozitivnih rezultatov, saj so BAL in drugi vzorci dihal pogosto pozitivni zaradi prisotnosti konidijev v zraku (Chazalet in sod., 1998; Kontoyiannis in Bodey, 2002). Pri diagnostiki invazivne aspergiloze in aspergiloma imajo velik pomen tudi slikovne diagnostične metode, med katerimi so pomembne klasično rentgensko slikanje in zlasti CT (Latgé 1999; Soubani in Chandrasekar, 2002).

### **2.5.1 Genotipizacija *Aspergillus* spp.**

Identifikacija plesni iz rodu *Aspergillus* na ravni fenotipa je pogosto nezanesljiva, kajti na preučevane lastnosti vplivajo pogoji gojenja. Fenotipske lastnosti so lahko genetsko nestabilne ali pa jih kodirajo izvenkromosomski elementi, ki so prenosljivi med sevi. Zanesljivejše za določanje posameznih vrst, so molekularno genetske metode, ki vključujejo analizo celotnega genoma ali preučevanje specifičnih genov ali genskih

sklopov. Stopnja hibridizacije med genomoma je široko uporabna metoda identifikacije na nivoju vrste. Velja, da sevi, ki kažejo DNK-DNK hibridizacijo več kot 70 %, pripadajo isti vrsti, med 40 % in 70 % so sevi ozko sorodne vrste. RFLP je poleg RAPD najpogosteje uporabljeni metoda v molekularni diagnostiki *A. fumigatus* (Zalar in Gunde-Cimerman, 2002). Izolirano genomske DNK razgradimo z restrikcijskimi encimi ter nastale fragmente DNK ločimo glede na velikost z elektroforezo v agarskem gelu. Ločene fragmente prenesemo iz gela na nitrocelulozno ali najlonsko membrano z vakuumskim ali kapilarnim postopkom, kot je Southern blotting (Girardin in sod., 1994; Chazalet in sod., 1998). Hibridizacijo na membrani opravimo z označeno lovko, npr. *Afut* 1, ki je označena radioaktivno ali neradioaktivno z digoksigeninom (Pegues in sod., 2002; Panackal in sod., 2002; Debeaupuis in sod., 1997; Bart-Delabesse in sod., 2001). Če je zaporedje nukleotidov lovke komplementarno specifičnemu odseku preiskovane DNK, bo lovka hibridizirala s specifičnim odsekom DNK. Zaznavanje položaja odsekov DNK, ki so hibridizirali z lovko omogoča avtoradiografija, rezultate pa analiziramo z računalniškim programom (Varga, 2006; Olive in Bean, 1999; Soll in sod., 2007). RFLP profil lahko analiziramo vizualno. Če se profila izolatov razlikujeta za eno ali več lis, smatramo profila kot indikatorja dveh različnih genotipov (Verweij in sod., 1996). Sevi so določeni kot identični, če med njimi ni razlik v hibridizacijskih profilih, kot visoko sorodni, če se razlikujejo v eni do treh lis ali sorodstveno nepovezani, če se razlikujejo v več kot štirih lisah (Pegues in sod., 2002; Verweij in sod., 1996). Metoda RFLP omogoča dobro ločljivost med sevi, dobro ponovljivost ter preprosto interpretacijo rezultatov. Postopek je daljši, zahtevnejši ter zahteva dobro poznavanje tehnike (Lasker, 2002; Verweij in sod., 1996; Symoens in sod., 2002). V uporabi je tudi metoda MLEE (angl. multilocus enzyme electrophoresis). Metoda temelji na fenotipskem polimorfizmu, ki je posledica različne proteinske strukture. Struktura proteinov odraža sekvenco strurnih genov, ki nosijo zapis za te proteine. Pri elektroforezi se proteini ločijo na poliakrilamidnem gelu glede na njihovo elektroforetsko mobilnost, ki je posledica naboja proteinov ter glede na njihovo velikost (Soll in sod., 2007). Uporabo tehnike MLEE priporočajo v kombinaciji z uporabo ostalih tehnik (RAPD, MLP) (Varga, 2006; Bertout in sod., 2000; Rodriguez in sod., 1996). Metoda MLP (angl. microsatellite length polymorphism) temelji na dokazovanju mikrosatelitov, nukleotidnih zaporedij, sestavljenih iz enostavnih, največ šest nukleotidov dolgih, ponavljajočih se zaporedij, ki so razporejena po celotnem genomu. Metoda se

imenuje tudi STR (angl. simple tandem repeats) ali SSR (angl. short repetitive sequences). Genomsko DNK razrežejo z restriktijskimi encimi, izberejo manjše fragmente (300 do 700 bp), jih klonirajo v plazmid ter plazmid s fragmenti vnesejo v bakterijske celice, ki se razmnožijo. S sondami, ki vsebujejo pripadajoče nukleotidno zaporedje, ugotavljajo prisotnost mikrosatelitnega zaporedja. Kolonije z mikrosatelite se precepi na novo gojišče ter ponovno potrdi prisotnost mikrosatelitev s sondom. Nato sledi identifikacija fragmentov DNK s potrjenim nukleotidnim zaporedjem mikrosatelitev ter na osnovi identificiranih mikrosatelitev se izbere specifične začetne oligonukleotide. Sledi pomnoževanje mikrosatelitnih zaporedij s polimerazno verižno reakcijo (Jug, 2002; Varga, 2006). Metoda MLP je glede tehnike in interpretacije rezultatov zahtevnejša kot RAPD, ločljivost metode MLP je dobra, ponovljivost rezultatov je boljša kot pri metodi RAPD (Varga, 2006; Lasker, 2002; Symoens in sod., 2002; Bart-Delabesse in sod., 1998). V raziskavi, v kateri so primerjali metode RAPD, RFLP in MLP, priporočajo uporabo MLP kot prvo tehniko izbora, kljub relativno visokim stroškom, zaradi zelo dobre ločljivosti in ponovljivosti. Za dodatno potrditev dobre ločljivosti priporočajo še uporabo metode RFLP (Bart-Delabesse in sod., 2001).

Za razlikovanje med sevi *A. fumigatus*, se uporablja tudi novejša metoda AFLP (angl. amplified fragment length polymorphism). Metoda AFLP temelji na določanju polimorfizma dolžin pomnoženih fragmentov. Tehnika nam omogoča detekcijo velikega števila DNK polimorfizmov, ima visoko ponovljivost in ločljivost, je precej zahtevna, cenovno sodi tehnika med najdražje, je primerna za rutinske analize (Varga, 2006; Vos in sod., 1995) ne potrebujemo predhodnega znanja o sekvenkah genoma preučevanega organizma. Metoda zajame celoten genom in je primerna za ločevanje ozko sorodnih organizmov, znotraj vrste. Genomsko DNK razrežemo z različnima restriktijskima endonukleazama (*Eco*RI, *Mse*I), nato dodamo specifične adapterje, ki jih z ligacijo vežemo na restriktijske fragmente. Sledi selektivna PCR amplifikacija restriktijskih fragmentov. Adapterji predstavljajo tarčno mesto za začetne oligonukleotide z dvema selektivnima bazama na 3' koncu. PCR pomnožke nato ločimo z gelsko elektroforezo (Olive in Bean, 1999; Singh in sod., 2006; Vos in sod., 1995; Warris in sod., 2003). Metoda AFLP naj bi bila trenutno najboljša metoda za genotipizacijo *A. fumigatus*, ker naj bi imela najboljšo ločljivost in ponovljivost (Valk in sod., 2007; Warris in sod., 2003).

### 2.5.1.1 Tehnika naključno pomnožene polimorfne DNK–RAPD

Tehnika naključno pomnožene polimorfne DNK (angl. random amplification of polymorphic DNA) je zelo učinkovita pri ugotavljanju genetske raznolikosti med zelo sorodnimi taksoni. RAPD omogoča namnoževanje predelov osamljene DNK verige z uporabo posameznih začetnih nukleotidov z naključnim zaporedjem. Osnova RAPD tehnike je verižna reakcija s polimerazo, v katero sta vključena genomska DNK, ki služi kot matrica in začetni oligonukleotid s poljubnim nukleotidnim zaporedjem. V reakciji se v nekaj urah določen DNK segment *in vitro* namnoži tudi do 108-krat. Pri tem nastane veliko število fragmentov DNK. Reakcija poteka s ponavljanjem ciklov sestavljenih iz treh stopenj:

- denaturacije dvojnih verig DNK
- prileganja začetnih oligonukleotidov na komplementarna zaporedja matrične DNK molekule
- sinteza DNK

Pri RAPD tehniki ni potrebno predhodno poznavanje DNK zaporedja, na podlagi katerega bi sintetizirali komplementarne začetne oligonukleotide, saj uporabimo krajše začetne oligonukleotide s poljubnim zaporedjem, kar nam omogoča analizo tudi ne dobro poznanih vrst. Dolžina začetnih oligonukleotidov, ki se najpogosteje uporablja v RAPD analizi, je 10 nukleotidov (Aufauvre-Brown in sod., 1992; Mellado in sod., 2000; Thio in sod., 2000). Začetni oligonukleotid z najvišjo ločljivostjo, ki da najboljši profil lis na gelu glede na njihovo število, razporeditev in intenziteto obarvanja, je bil na podlagi različnih študij R-108 (5'-GTATTGCCCT-3') (Aufauvre-Brown in sod., 1992; Lasker, 2002; Mellado in sod., 2000; Thio in sod., 2000; Lin in sod., 1995; Lutz in sod., 2003; Menotti in sod., 2005). Med testiranimi začetnimi oligonukleotidi so le z R-108 določili različne seve izolatov kot vse različne (Raclavsky in sod., 2006).

Pri reakciji uporabimo večinoma le en začetni oligonukleotid in če se le-ta veže na komplementarna mesta DNK, ki niso oddaljena več kot 3000 baznih parov, se regija med obema mestoma prileganja začetnega nukleotida podvoji. Produkti se na osnovi različnih dolžin ločijo in razporedijo z gelsko elektroforezo na gelih. Polimorfizem med posameznimi organizmi se kaže kot prisotnost ali odsotnost posamezne črte na gelu.

RAPD polimorfizem je posledica različnosti nukleotidnega zaporedja na enem ali obeh mestih prileganja začetnega nukleotida in prepreči prileganje začetnega oligonukleotida. Lahko nastane med posamezniki zaradi (Jakše, 2006):

- nukleotidnih sprememb na mestu prileganja začetnega oligonukleotida
- delecije mesta prileganja začetnega oligonukleotida
- insercije, ki oddaljijo mesta prileganja začetnih oligonukleotidov do take mere, da podvojevanje ni več mogoče
- insercij in delecij, ki spremenijo dolžino namnoženega fragmenta
- kot posledica tvorbe sekundarnih struktur ob mestu prileganja začetnih oligonukleotidov, ki so posledica mutacije

Glavne prednosti metode RAPD so (Fritsch in Rieseberg 1996):

- predhodno poznavanje nukleotidnega zaporedja matrične DNK ni potrebno
- dobljene informacije so enakomerno porazdeljene po celotnem genomu
- možno je pridobiti neomejeno število lokusov
- protokol je relativno hiter in enostaven za izvedbo
- nizka cena
- ne uporabljamo radioaktivnih snovi
- dovolj so že nanogramske količine DNK
- prednosti RAPD markerjev so njihovo veliko število in dejstvo, da jih lahko identificiramo v DNK iz organizmov pri vseh stopnjah razvoja

Pri ponovitvah RAPD so lahko prisotne občasne lise, katerih interpretacija je težavna. Nastanejo zaradi razlik ob različni intenzivnosti obarvanja fragmentov, intenzivnejše obarvane lise pa so lahko sestavljene iz komigracijskih, nehomolognih amplikonov. Homoplazija lahko še dodatno poveča težavnost interpretacije. Izolati kažejo enak RAPD profil, toda njihovi predniki so različni, kar je lahko vzrok v konvergenci, paralelizmu ali evolucijskem obratu. Stopnja homoplazije naj bi bila pri *A. fumigatus* nizka, zaradi prisotnosti klonske populacije (Lasker, 2002). Opozarjajo tudi na nejasno homologijo lokusov, na različno učinkovitost pomnoževanja fragmentov, kar je posledica prileganja

začetnih oligonukleotidov na različna mesta v genomu, ki se lahko različno učinkovito pomnožujejo (Jug, 2002).

Glavne slabosti metode RAPD so (Fritsch in Rieseberg 1996; Lasker, 2002):

- dominanten značaj označevalcev RAPD
- težave s ponovljivostjo rezultatov
- nezanesljivost homologije med DNK fragmenti iste dolžine
- slabo poznavanje narave pomnoženih regij in vzrokov za različno količino pomnoženih fragmentov

Dejavniki, ki vplivajo na rezultate RAPD (Soll in sod., 2007; Lasker 2002; Jug, 2002):

- koncentracija magnezijevih ionov
- koncentracija matrične DNK
- koncentracija encima *Taq* polimeraze
- koncentracija začetnega oligonukleotida
- temperatura prileganja začetnih oligonukleotidov
- čas denaturacije matrične DNK, čas prileganja začetnih oligonukleotidov in čas podaljševanja
- število ciklov pomnoževanja

Vzorci fragmentov DNK se lahko zelo razlikujejo glede na različne koncentracije matrične DNK. Z naraščanjem koncentracije matrične DNK v reakcijskem volumnu se lahko pojavi več fragmentov, spremeni se lahko tudi njihova velikost. Naslednji kritični dejavnik je koncentracija  $Mg^{2+}$ . Spremembe v koncentraciji  $Mg^{2+}$  vplivajo na profile naključno pomnoženih produktov PCR. Pri povišani koncentraciji  $Mg^{2+}$  se nekateri fragmenti pomnožujejo bolj učinkovito, drugi manj. Potrebna je tudi ustrezna količina  $Mg^{2+}$ , ki omogoča delovanje encima *Taq* polimeraze. Med *Taq* polimerazami različnih proizvajalcev so lahko velike razlike, kar vpliva na RAPD profil. Začetni oligonukleotidi imajo velik vpliv na število pomnoženih fragmentov, njihovo intenziteto in ločljivost. Pri večjih koncentracijah izbranega oligonukleotida naj bi bili prisotni manjši fragmenti, ki

nastopajo v večjem številu, pri nižjih koncentracijah pa so prisotni večji fragmenti. Temperatura prileganja je med 30 °C in 55 °C, priporočljiva temperatura je 36 °C (Jug, 2002; Soll in sod., 2007). Pri uporabi začetnega oligonukleotida R-108 (5'-GTATTGCCCT-3') je priporočena temperatura prileganja začetnih oligonukleotidov 27 °C (Mellado in sod., 2000). Od temperature prileganja je odvisno število fragmentov, njihova dolžina pa je odvisna od trajanja podaljševanja. Povprečno število ciklov je od 30 do 45 saj premajhno število ciklov ne da dovolj velike količine produktov (Jug, 2002). RAPD profil lis na gelu lahko odčitamo vizualno. V interpretacijo rezultatov vključimo vse lise, tiste slabše obarvane in tiste intenzivno obarvane. Profili izolatov, ki se razlikujejo za eno liso ali več, se razlikujejo v genotipu (Verweij in sod., 1996; Thio in sod., 2000; Leenders in sod., 1996; Lin in sod., 1995; Bart-Delabesse in sod., 2001). Različen genotip med posameznimi sevi določamo na podlagi prisotnosti ali odsotnosti fragmentov RAPD (Bertout in sod., 2001). Fragmenti RAPD z različno molekulsko maso predstavljajo različne lokuse. Predvidevajo, da lokus poseduje dva alela, alel ki se pomnoži in predstavlja fragment RAPD in alel, ki se ne pomnoži (ničelni alel) (Fritsch in Rieseberg 1996 ).

## 2.6 PATOGENEZA IN GOSTITELJEV OBRAMBNI MEHANIZEM

Vdihovanje konidijev *A. fumigatus* iz zraka je najpogostejsa pot nastanka okužbe s to plesnijo. V zadnjem času povdarjajo tudi pomen vdihovanja okuženih aerosolov vode (Anaissie in Costa, 2001; Anaissie in sod., 2003), redki so opisi invazivne aspergiloze po vstopu povzročitelja preko kirurških ran in opeklin in preko okuženih žilnih katetrov (Walsh, 1998; Allo in sod., 1987; Gentleman in sod., 1999). Konidiji *A. fumigatus* predstavljajo infektivne delce pri različnih oblikah nastanka okužbe. Ko konidiji dosežejo pljučne alveole, se morajo adherirati na proteine bazalne membrane kar predstavlja ključni korak za začetek okužbe. Ob neučinkoviti obrambi gostitelja začnejo konidiji nabrekat, germinirati in se preoblikujejo v hife, ki začnejo invadirati krvne žile, kar lahko vodi do diseminacije okužbe v oddaljene organe. Ob invaziji v krvne žile prihaja do motenj prekrvavitve, kar se kaže v obliki infarktov tkiva. Inkubacijska doba germinacije konidijev

je zelo variabilna, od dveh dni do več mesecev. Nespecifična ali naravna imunost igra pomembno vlogo pri obrambi proti *A. fumigatus*. Pri imunsko zdravih osebah je pomembna pri prepoznavi in odstranjevanju plesni iz gostitelja. Gostitelj na takšen način popolnoma odstrani plesen, kar je vzrok, da so okužbe z *A. fumigatus* pri tej populaciji zelo redke. Zdrave laboratorijske živali, okužene z *A. fumigatus*, odstranijo večino inokuluma konidijev v nekaj urah. Nespecifična imunost vključuje tri poglavitne vrste obrambe; anatomske bariere, humoralne komponente ter fagocitne celice in njihove protimikrobne produkte. Večina konidijev *A. fumigatus* je izločena iz pljuč z mukociliarnim sistemom. To odstranjevanje je slabše kot pri drugih saprofitnih organizmih, ki se prenašajo po zraku, zaradi toksičnih produktov, ki jih izloča plesen in inhibirajo migetalčno aktivnost. K temu prispeva tudi proteaza, ki poškoduje epitelijske celice. V prvi stopnji se konidiji adherirajo na epitelijske celice ter sprožijo začetni kontakt z imunskim sistemom. Ko konidiji dosežejo alveole, najpomembnejšo obrambo predstavljajo alveolarni makrofagi, ki so sposobni ubiti konidije. V posameznih študijah so dokazali interakcijo med komponentami seruma in *Aspergillus* spp. Serumski nivo fibrinogena naraste med invazivno aspergilozo ter se lahko veže na komponente *A. fumigatus*. Učinkovitost gostiteljeve obrambe poveča opsonizacija konidijev s komponentami komplementa ali drugimi molekulami. Vlogo komplementa v patogenezi *A. fumigatus* so dokazali s pomočjo mišk, ki so brez komponente komplementa C5. Te miške so bile veliko bolj občutljive na okužbo (Latgé, 1999).

S poskusi *in vivo* ter *in vitro* so dokazali poglavitno vlogo fagocitnih celic v obrambi proti plesni. Pljuča, mesto infekcije *A. fumigatus*, s pomočjo alveolarnih makrofagov in nevtrofilcev zamejijo vnetje preko fagocitoze konidijev ter preprečijo germinacijo konidijev. Za vezavo in zajetje konidijev s strani alveolarnih makrofagov, naj bi bile ključne vezavi lektina podobne interakcije. Ta interakcija je zelo verjetna, kajti alveolarno okolje rezidentnih makrofagov najbrž ne vsebuje opsonizirajočih faktorjev kot sta komplement ali imunoglobulini. Vezavo konidijev naj bi posredoval manozil-fukozilni receptor ter še druga dva receptorja. Specifičnih receptorjev pa še niso odkrili (Latgé, 2001). Uničenje konidijev s strani alveolarnih fagocitov in fagocitov, ki izvirajo iz krvi, se začne šele po nekaj urah z zelo nizko stopnjo uničenja, 90 % vseh konidijev je uničenih v

24 urah. Antimikrobnii sistem, odgovoren za uničenje konidijev, še ni dokazan. Domnevajo, da za uničenje niso odgovorni kisikovi reaktivni intermediati (Latgé, 1999).

Uničenje konidijev se začne šest do dvanajst ur po vdihovanju konidijev, 100 % uničenja konidijev s strani alveolarnih makrofagov niso dokazali, konidiji lahko germinirajo znotraj monocitov. V takšnih primerih je pomembna sekundarna obramba nevtrofilcev. Nabrekle konidije in hife z ekstracelularnim ubijanjem uničujejo polimorfonuklearni levkociti (Schaffner in sod., 1982). Kontakt med hifami in nevtrofilci sproži respiratorni vnetni izbruh, sekrecijo reaktivnih kisikovih intermediatov in degranulacijo. Uničenje hif s pomočjo nevtroficev je precej hitro, 50 % hif je uničenih po dveh urah inkubacije (Latgé, 1999; Latgé, 2001). Encimi, ki so odgovorni za uničenje celične stene plesni, še niso bili identificirani, predpostavlja pa, da imajo esencialno vlogo pri uničenju hife, hidrolaze izolirane iz fagocitov. V uničenje hife naj bi bili vključeni najmanj dve oksidativni poti ter neoksidativno uničenje z defenzini. Učinkovita je tudi obramba s krvnimi ploščicami. Invazija krvnih teles s strani hif privede do tromboze in hemoragičega infarkta. Krvne ploščice se pritrđijo na celično steno hife ter se aktivirajo. Za optimalno aktivacijo je potrebna predhodna opsonizacija hife (Latgé, 1999). Izpostavitev plesni *A. fumigatus* lahko inducira  $T_{H1}$  ali  $T_{H2}$  odgovor celic T  $CD4^+$  (Latgé, 2001). Pri tipu 1 imunskega odgovora celice  $T_{H1}$  sintetizirajo IL-2, IFN- $\gamma$ , ki favorizirajo odpornost proti mikotičnim okužbam, makrofagi pa sintetizirajo IL-12. IFN- $\gamma$  naj bi okreplil mikrobicidno aktivnost makrofagov (Latgé, 1999).  $T_{H2}$  sintetizirajo citokine kot so IL-4, IL-5, IL-10, ki pomagajo celicam B izdelovati protitelesa (Vozelj, 2000; Rivera in sod., 2006). Protitelesa niso zaščitna in tudi niso uporabna pri diagnostiki bolnikov z visokim tveganjem zaradi obrambne nesposobnosti serokonverzije.

## 2.7 UGOTAVLJANJE PRISOTNOSTI SPOR *Aspergillus* spp. V ZRAKU

Aspergiloza je eksogeno pridobljena okužba, ki najpogosteje nastane zaradi vdihovanja spor *Aspergillus* spp., ki so lahko prisotne v domačem ali v bolnišničnem okolju bolnika. Vzorčenje bolnišničnega zraka je še posebej pomembno za ugotavljanje vira okužbe to je v primeru, ko je skupno število spor v notranjih prostorih večje, kot je skupno število spor v zunanjem zraku, ko so v notranjem zraku prisotni organizmi, ki jih ni v zunanjem zraku in ko so stalno prisotne visoke koncentracije organizmov v notranjih prostorih (Ocvirk, 2005). V literaturi priporočajo vzorčenje zraka ko (Morris in sod., 2000):

- ugotavljamo povezanost med gradbenimi deli v bolnišnici in v bolnišničnem okolju ter epidemijo invazivne aspergiloze
- odkrivamo vire *Aspergillus* spp. v prezračevalnih in filtracijskih sistemih ali ugotavljamo učinkovitost teh sistemov
- nadzorujemo postopke čiščenja

Pri izbiri vzorčevalnika in gojišča, kamor se ujamejo spore med vzorčenjem, je potrebno upoštevati biološke in fizikalne lastnosti plesni. Za vzorčenje zraka so na voljo različni vzorčevalniki. Vzorčevalnik Surface Air System (SAS) Sampler (Cherwell Laboratories, Bicester, Velika Britanija) deluje po načelu prestrežanja mikroorganizmov neposredno na plošče z gojiščem. Na osnovi kliničnih in laboratorijskih podatkov je SAS vzorčevalnik najustreznejši, saj z zmogljivostjo 180 l/min dosledno lovi spore *Aspergillus* spp. SAS vzorčevalnik je enostopenjski, pri katerem vstopa zrak skozi preluknjen zunajski pokrov z 219 luknjicami premera 1mm. Pod zunanjim pokrovom je nameščena z agarjem napolnjena RODAC plošča, kamor se med vzorčenjem ujamejo delci iz zraka. Po končanem vzorčenju se plošče odstranijo iz vzorčevalnika, zaprejo ter ikubirajo. Sledi štetje in identifikacija zraslih kolonij. Volumne vzorčenega zraka določimo z večkratnim poskusnim vzorčenjem. V kontaminiranem okolju (zunanji zrak, gradbišča) vzorčimo manjše volumne zraka, v bolnišničnem, kjer pričakujemo nižjo koncentracijo spor, pa večje volumne zraka (Morris in sod., 2000). Med izbruhom invazivne aspergiloze priporočajo vzorčenje 300 litrov do 1000 litrov zraka. Pri vzorčenju z večjimi volumni

obstaja večja verjetnost zajetja spor *Aspergillus* spp. iz zraka. V bolnišničnem okolju priporočajo vzorčenje najmanj 1000 litrov zraka (Thio in sod., 2000).

## 2.8 PLESNI V ZUNANJEM ZRAKU IN ZRAKU NOTRANJIH PROSTOROV TER NJIHOV VPLIV NA POČUTJE IN ZDRAVJE LJUDI

Na koncentracije in spekter plesni v zunanjem in notranjem prostoru vplivajo različni geografski in fiziološki dejavniki. Koncentracija plesni je višja v področjih z zmerno klimo, v jesenskem in poletnem času. Vzrok naj bi bile višje temperature, vlažnost ter razgradnja vegetacije. V notranjih prostorih koncentracije varirajo sorazmerno z zunanjim zrakom ter predstavljajo približno 1/3 zunanje koncentracije plesni (Shelton in sod., 2002).

Ugotavljajo, da je nihanje koncentracije spor *A. fumigatus* manjše, kot je značilno za ostale plesni v različnih letnih časih (Lendeers in sod., 1999).

V notranjih prostorih se pojavljajo plesni v večjih koncentracijah v prostorih z visoko relativno vlogo. Takšni prostori so kopalnice, kuhinje in kleti. Visoka relativna vлага (več kot 50 %), neustrezno prezračevanje, vlažilci zraka, klimatske naprave ter zbiralniki vode pospešujejo rast in razmnoževanje plesni v stavbah. Najpogosteje se pojavljajo plesni iz rodov *Cladosporium*, *Penicillium*, *Alternaria* in *Aspergillus* (Shelton in sod., 2002). V prostore pridejo iz zunanjega zraka preko ventilacijskega sistema, klimatskih naprav, skozi vrata in okna ter z gradbenim materialom in opremo.

Povprečne koncentracije v notranjih prostorih so za plesni  $80 \text{ CFU/m}^3$ , za *Aspergillus* spp. pa  $20 \text{ CFU/m}^3$  (Shelton in sod., 2002).

V »plesnivih hišah«, lahko dosegajo plesni precej višje koncentracije, od 600 do 450 000  $\text{CFU/m}^3$  (Nevalainen in sod., 1991).

V bolnišničnem okolju so koncentracije nižje. Navedene povprečne koncentracije plesni se v različnih študijah precej razlikujejo, odvisno od bolnišnične enote ter načinov preprečevanja okužb (prisotnost HEPA filterov, pozitiven zračni pritisk). V hematoloških

enotah so povprečno izmerili 7 CFU/m<sup>3</sup> plesni, v sobah s HEPA filtri pa manj kot 2 CFU/m<sup>3</sup>.

Klonska populacija plesni lahko perzistira v nekem notranjem okolju več kot leto, saj so precej odporne na negativne vplive okolja (Leenders in sod., 1999; Girardin in sod., 1994). V študiji s 700 izolati iz okolja in bolnikov so dokazali, da so 85 % različnih genotipov izolirali samo enkrat, 15 % genotipov pa so dokazali večkrat, kar pomeni da so perzistirali v okolju (Chazalet in sod., 1998).

V številnih raziskavah so določali in primerjali koncentracije plesni v zunanjem in bolnišničnem okolju ter spremembe v koncentracijah plesni med gradbenimi deli. V eni izmed raziskav so določili povprečno koncentracijo plesni v zunanjem okolju 257,8 CFU/m<sup>3</sup> in 6,8 CFU/m<sup>3</sup> *Aspergillus* spp., v zraku notranjih prostorov pa 53,2 CFU/m<sup>3</sup> vseh plesni in 12,1 CFU/m<sup>3</sup> *Aspergillus* spp. V notranjih prostorih so bile najvišje koncentracije plesni *A. niger* (7,57 CFU/m<sup>3</sup>), sledili so *A. candidus*, *A. flavus*, *A. fumigatus* in *A. glaucus*. V času prenavljanja bolnišnice so koncentracije plesni *Aspergillus* spp. med rezanjem lesa narasle na 160 CFU/m<sup>3</sup>, koncentracije *A. niger* pa na 155 CFU/m<sup>3</sup>. Zaradi razpok v stropnih vodnih ceveh je koncentracija *A. niger* narasla na 680 CFU/m<sup>3</sup> v prostorih za transplantacije, zaradi razpok v strehi nad oddelkom za transplantacije pa je koncentracija *Aspergillus* spp. narasla na 77 CFU/m<sup>3</sup> (Curtis in sod., 2005).

V bolnišničnem okolju je nadzor nad vzdrževanjem učinkovitosti prezračevalnih sistemov zelo pomemben. Visoke koncentracije plesni v operacijskih prostorih so lahko posledica direktne povezave operacijskih prostorov in prostorov za sterilizacijo, kjer sta relativna vlaga in temperatura precej visoki in tako prostori nudijo idealno mikronišo za rast in razvoj plesni. Ugodne pogoje za rast plesni nudijo tudi kuhinje v bolnišnicah, zaradi ugodne temperature, vlage ter hrane, ki je lahko kontaminirana s sporami plesni (Perdelli in sod., 2006). V bolnišnicah moramo biti še posebej pozorni na povečane koncentracije plesni *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Alternaria* spp., *Curvularia* spp., *Cladosporium* spp. ter na plesni skupine *Mucorales*. Te plesni se najpogosteje pojavljajo v okolju notranjih prostorov in v večjih koncentracijah ogrožajo zdravje ljudi (De Lucca, 2007).

Optimalno delovanje prazračevalnega sistema v bolnišnicah, še posebno v operacijskih sobah, je zelo pomembno. V eni izmed bolnišnic je izbruhnila IA zaradi pokvarjenega

prezračevalnega sistema v operacijskih sobah. Kar šest bolnikov je imelo okužene rane, ki so bile odprte med operacijo (Lutz in sod., 2003).

V zunanjem zraku se plesni pogosteje in v večjih koncentracijah pojavljajo v senčnih, vlažnih prostorih. Povprečne koncentracije plesni v zunanjih prostorih so  $500 \text{ CFU/m}^3$ , koncentracije *Aspergillus* spp.  $20 \text{ CFU/m}^3$  (Shelton in sod., 2002).

Koncentracije *A. fumigatus* naj ne bi bile v takšni meri odvisne od letnih časov, temperature, deževnosti in zračnega pritiska, kot so ostale plesni. Njihove koncentracije naj bi nihale od 67 do  $185 \text{ CFU/m}^3$ . Najvišje koncentracije pa dosegajo v bližini komposta in skednjev s senom, do  $10^6 \text{ CFU/m}^3$  (Warris in sod., 2001).

Neugodni vplivi plesni na zdravje ljudi, kot posledica bivanja v plesnivih stavbah, se odražajo v obliki SBS sindroma (angl. Sick building syndrom), OTDS sindroma (angl. Organic toxic dust syndrom), preobčutljivostne reakcije in okužbe. Klinični znaki SBS sindroma so konjunktivitis, epistaksa, kongestija nosne sluznice in sinusov, kronični kašelj, glavobol, utrujenost in motnje koncentracije. Poznan je tudi OTDS sindrom, ki ga povezujejo z mikotoksini ali pa kot posledico masivnega izpostavljanja sporam plesni. Klinični znaki OTDS sindroma so kašelj, vročina, respiratorna insuficienca (Singh, 2005). Pri osebah, ki so preobčutljive na plesni, se lahko pojavijo znaki kot so rinitis, konjunktivitis, astma. Alergiye na plesni lahko vodijo v resnejše zaplete, ki so pogosti pri osebah, izpostavljenih višjim koncentracijam plesni. Pri kmetih, ki prihajajo v stik z vlažnim, razpadajočim senom, se kot posledica visoke koncentracije plesni pojavi vročina in zasoplost. Farmska pljuča ali hipersenzitivni pneumonitis lahko vodita v pljučno fibrozo in pljučno hipertenzijo.

V bolnišničnem okolju lahko plesni pri bolnikih s povečanim tveganjem za nastanek oportunističnih okužb (bolniki po presaditvi krvotvornih matičnih celic, bolniki po presaditvi čvrstih organov) povzročajo resnejše okužbe, katerih smrtnost je lahko 50 % do 100 % (Warris in sod., 2001).

### 3 MATERIAL IN METODE

#### 3.1 VZORČENJE ZRAKA V BOLNIŠNIČNEM IN ZUNANJEM OKOLJU

Od oktobra 2007 do marca 2008 smo z vzorčevalnikom Surface air system (SAS) sampler (Cherwell Laboratories, Bicester, Velika Britanija) vzorčili zrak v bolnišničnem okolju Univerzitetnega kliničnega centra v Ljubljani in sicer v prostorih Kliničnega oddelka za nefrologijo (KON), Kliničnega oddelka za intenzivno interno medicino (CIIM) in Kliničnega oddelka za anesteziologijo in intenzivno terapijo operativnih strok (CIT). Zrak smo vzorčili v bolniških sobah, kopalnicah, hodnikih pred sobami, prostorih za pripravo infuzij ter pomivalnicah. Za vzorčenje zraka v KON, CIIM in CIT smo se odločili, ker so bili na vseh treh oddelkih bolniki z IA. V KON, kjer je bil hospitaliziran bolnik P1 smo vzorčili zrak pet dni po odvzemu kliničnega vzorca bolnika P1, v CIT, kjer je bil hospitaliziran bolnik P3 devet dni po odvzemu kliničnega vzorca bolnika P3, v CIIM, kjer je bil hospitaliziran bolnik P2 pa 18 dni po odvzemu kliničnega vzorca bolnika P2. V bolnišničnem okolju smo opravili 17 vzorčenj zraka. Na oddelku KON smo dne 12.10.2007 opravili enajst vzorčenj zraka. Dve vzorčenji zraka smo opravili v bivalnem delu sobe. Zrak smo vzorčili ob postelji in ob oknu sobe, kjer je bil nameščen bolnik P1. Vzorčenje zraka smo nadaljevali na hodniku, pred sobo bolnika P1, v dveh sosednjih sobah, na hodniku ter v prostoru za pripravo infuzij. V prostorih CIIM smo dne 24.10.2007 opravili tri vzorčenja zraka. Zrak smo vzorčili v bivalnem delu sobe bolnika P2, v sosednji sobi ter na hodniku pred sobama. V prostorih CIT smo dne 24.10.2007 vzorčili zrak trikrat. Vzorčenje zraka je potekalo v bivalnem delu sobe bolnika P3, v sosednji sobi ter v pomivalnici oddelka CIT (Priloge A-E).

Za vzorčenje na gradbenem področju smo izbrali gradbišče nove Pediatrične klinike ter gradbišče novega urgentnega bloka Univerzitetnega kliničnega centra, kjer smo opravili deset vzorčenj zraka (Prilogi G-H). Za vzorčenje na ne gradbenem področju smo izbrali prostor pred vhodom v Univerzitetni klinični center, vhod v Ginekološko kliniko ter park Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo, kjer smo opravili skupno pet vzorčenj zraka (Priloga F).

Vzorčenja zraka v bolnišničnem, gradbenem področju in v zunanjem okolju brez gradbenih del niso vedno potekala na isti dan (Preglednica 1). Na dan vzorčenja zraka smo določali temperaturo zraka in zračno vlogo glede na meritve vremenske postaje Bežigrad-Ljubljana.

Preglednica 1: Datumi vzorčenja zraka v bolnišničnem okolju, v zunanjem okolju kjer gradbena dela niso potekala in v zunanjem okolju kjer so potekala gradbena dela

	Bolnišnično okolje	Zunanji zrak	Zunanji zrak-gradbišče
12.10.2007	x		
24.10.2007	x	x	
12.12.2007			x
04.01.2008		x	x
04.03.2008		x	x
10.03.2008		x	x
31.03.2008		x	x

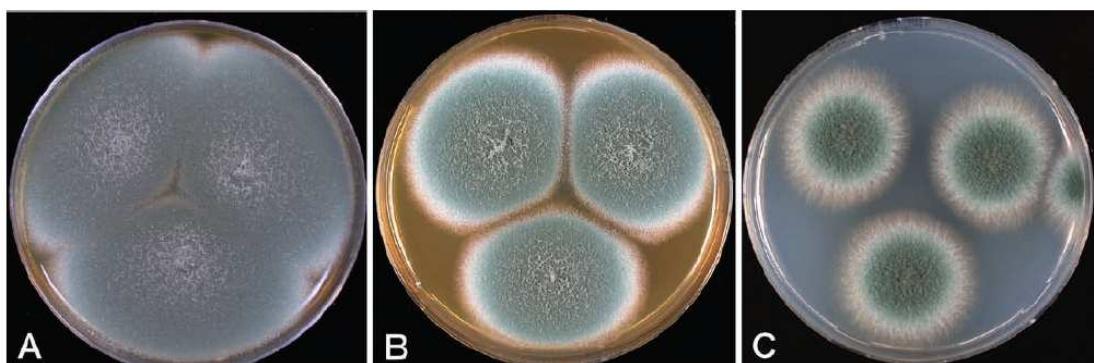
Zrak smo pri vsakem vzorčenju vzorčili dvakrat zaporedoma na RODAC plošče. Uporabili smo gojišče po Sabouraudu (SABA), gojišče po Czapku (CZA) in krompirjev agar (PDA). Volumen vzorčenega zraka je bil v bolnišničnem okolju 1020 l na RODAC ploščo, na gradbenem in ne gradbenem področju pa 420 l na RODAC ploščo.

### 3.2 MIKROBIOLOŠKA OBRAVNAVA

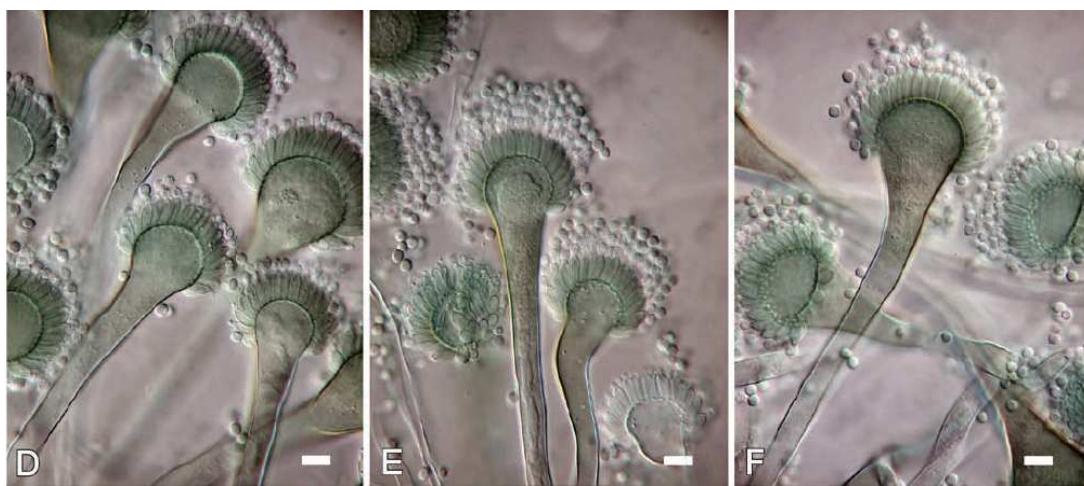
Po končanem vzorčenju smo RODAC plošče z gojiščem zaprli s parafilmom in jih inkubirali 48 ur pri sobni temperaturi. Plošče smo dnevno pregledovali ter določali število zraslih kolonij. Število kolonij na posamezni plošči smo izrazili kot koncentracijo spor na volumsko enoto zraka. To je CFU (angl. colony forming units) na m<sup>3</sup> (CFU/ m<sup>3</sup>), ki smo jo določili s formulo in korekcijskimi tabelami, ki so priložene vzorčevalniku in jih priporoča tudi proizvajalec.

$$CFU/m^3 = \text{število preštetih kolonij na plošči (z upoštevanjem korekcijskega koeficiente)} \times 1000 / V \text{ vzorčenega zraka} \text{ (Morris in sod., 2000)}$$

Po 48 urah smo zrasle kolonije precepili na gojišče SABA ter inkubirali pri 30 °C. Identifikacija kolonij je potekala po dihotomnem ključu z makroskopsko analizo kultur in s prepoznavanjem značilnih morfoloških struktur v mikroskopskem preparatu (Slika 4-5). Preparate smo pripravili s samolepilnim trakom in jih obarvali s kapljico modrila (angl. Lactophenol-Cotton Blue). Tako pripravljeni preparate smo pregledovali pri 400 in 1000 kratni povečavi. Kolonije, ki so na SABA slabo rasle, ali jih nismo uspeli identificirati, smo precepili na CZA ali gojišče z ovsenimi kosmiči (OA), ki pospešuje konidiogenezo plesni, ki je osnova mikroskopske identifikacije.



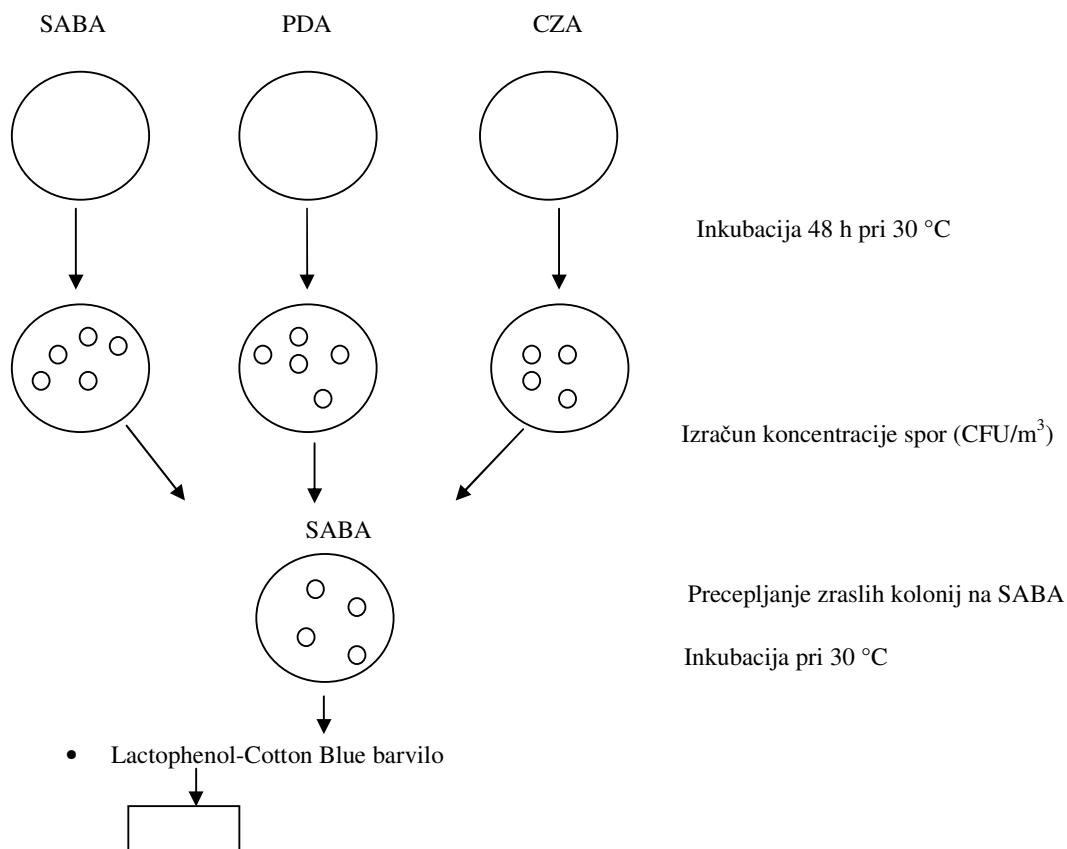
Slika 4: Kolonije *Aspergillus fumigatus* na gojišču CYA (angl. Czapek yeast extract agar) po sedmih dneh pri temperaturi 25 °C (A), kolonije *Aspergillus fumigatus* na gojišču MEA (angl. Malt extract agar) po sedmih dneh pri temepraturi 25 °C (B), kolonije *Aspergillus fumigatus* na gojišču CYA po treh dneh pri temepraturi 37 °C (Samson in sod., 2007)



Slika 5: Konidiofore plesni *Aspergillus fumigatus* (E-F, velikost merila je 10 µm) (Samson in sod., 2007)

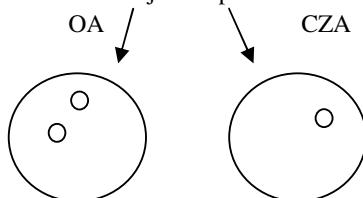
Izolate *A. fumigatus* bolnikov P1, P2 in P3 smo vzeli iz zbirke Laboratorija za diagnostiko glivičnih infekcij Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo. Pri vsakem izmed treh bolnikov je bil odvzet en vzorec kužnine iz katere smo osamili plesen *A. fumigatus*. Vrsta kužnine je bila pri vseh treh bolnikih aspirat traheje. Izolati so bili shranjeni na stalnih gojiščih v skrinji pri -70 °C. Dodatne klinične podatke o bolnikih smo pridobili iz zdravstvene dokumentacije bolnikov. Shematski prikaz metode dela je prikazan na sliki 6.

- Vzorčenje zraka (420-1020 l) s SAS vzorčevnikom (angl. Surface air system sampler) na RODAC (angl. Replicate organism detection and counting) plošče z gojišči:



Pregled preparata pri 400 in 1000 kratni povečavi pod mikroskopom

- Identifikacija neuspešna



Pregled preparata pri 400 in 1000 kratni povečavi pod mikroskopom

- Shranjevanje zbirke izolatov *Aspergillus fumigatus* na stalnih gojiščih pri -70 °C

Slika 6: Shematski prikaz metode dela; (SABA=Sabouraud, PDA=angl. Potato dextrose agar, CZA=Czapek agar, OA=gojišče z ovsenimi kosmiči, CFU=angl. colony forming units)

### 3.3 STATISTIČNA ANALIZA

Statistično analizo podatkov smo naredili s testom  $t$ , s katerim ugotavljamo razliko med povprečjema dveh majhnih neodvisnih vzorcev. Pred testom  $t$  smo potrdili homogenost varianc obeh vzorčenih skupin s testom  $F$ . Vrednost  $p$  izraža, v kolikšni meri so vzorčni podatki v skladu z ničelno domnevo. Če je bila  $p$ -vrednost opredeljena manjša od 0,05 smo ničelno domnevo zavrnili, če pa je bila vrednost  $p$  opredeljena večja od 0,05, smo ničelno domnevo obdržali (Košmelj 2001). Statistično smo primerjali koncentracije plesni v različnih okoljih, koncentracije plesni med različnimi bolnišničnimi oddelki (KON, CIIM in CIT) ter koncentracije plesni glede na uporabo različnih gojišč za osamitev plesni.

### 3.4 MOLEKULARNA GENOTIPIZACIJA PLESNI *A. fumigatus*

#### 3.4.1 Izolacija DNK plesni *A. fumigatus* iz okoljskih in kliničnih vzorcev

Izolate *A. fumigatus*, ki so bili shranjeni v zbirki na stalnih gojiščih pri -70 °C, smo odmrznili, stalno gojišče dobro premešali ter izolat s cepilno zanko nacepili na plošče s PDA gojiščem. Plošče smo nato inkubirali 48 ur pri temperaturi 37 °C, da je v tem času plesen dobro sporulirala. Po 48 urah smo z bombažnim brisom, ki smo ga predhodno navlažili v fiziološki raztopini, odstranili spore plesni s površine kolonije. Bombažni bris s sporami smo nato oželi v epruveto s fiziološko raztopino. Počakali smo, da so se prisotne hife v raztopini posedle ter nato v novi epruveti pripravili suspenzijo gostote 1,2 McF (McFarland). Gostoto smo izmerili z ATB Densitometrom (bioMerieux, Lyon, Francija). Iz tako pripravljenih suspenzij smo 1 ml plesni odpipetirali v sterilno epruvetko.

#### 3.4.2 Preverjanje koncentracije konidijev *A. fumigatus* pred izolacijo DNA

Suspenzija konidijev *A. fumigatus* v fiziološki raztopini gostote 1,2 McF naj bi vsebovala  $1\text{-}5 \times 10^6$  konidijev/ml, kar naj bi predstavljalo približno 20 do 30 µg DNK plesni. Da bi preverili to trditev smo iz suspenzije konidijev 1,2 McF pripravili redčitveno vrsto do redčitve  $10^{-5}$ . Iz redčitve  $10^{-4}$  in redčitve  $10^{-5}$  smo prenesli po 100 µl razredčine na vsako ploščo z gojiščem PDA ter razmazali s hokejko. Plošče smo inkubirali 48 ur pri

temperaturi 37 °C. Po 48 urah smo prešteli kolonije. Suspenzija konidijev gostote 1,2 McF je ustrezala gostoti 1-6 x 10<sup>6</sup> konidijev/ml.

Iz vzorcev smo izolirali DNK z izolacijskim sistemom PureLink Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen, Carlsbad, ZDA) po postopku izolacije DNK iz tkiva sesalcev. 1 ml suspenzije plesni smo deset minut centrifugirali pri 20,000 x g. Supernatant smo odlili, v epruvetko dodali 180 µl pufra PureLink Genomic Digestion Buffer in 20 µl encima proteinaze K ter dobro premešali. Sledila je 1-urna inkubacija pri temperaturi 55 °C. Po inkubaciji smo vzorce 3 minute centrifugirali pri 20,000 x g ter nato supernatant prenesli v novo sterilno epruvetko. Supernatantu smo dodali 20 µl RNaze A, vzorec blago premešali ter inkubirali 2 minuti pri sobni temperaturi. Po inkubaciji smo vzorcu dodali 200 µl PureLink Genomic Lysis/Binding Buffer, dobro premešali, dodali 200 µl etanola (96-100 %) ter ponovno dobro premešali. V mikrokolono vloženo v zbiralno epruvetko, smo prenesli 640 µl mešanice, ter 1 minuto centrifugirali pri 10,000 x g. Izpirek smo zavrgli in prestavili mikrokolono v novo zbiralno epruvetko ter dodali 500 µl pufra za spiranje (angl. Wash buffer 1). Mešanico smo ponovno centrifugirali 1 minuto pri 10,000 x g, izpirek zavrgli, mikrokolono prestavili v novo zbiralno epruveto in dodali 500 µl pufra za spiranje (angl. Wash buffer 2). Vzorec smo centrifugirali 3 minute pri 20,000 x g. Mikrokolono smo prestavili v sterilno 1,5 ml epruvetko in dodali 100 µl elucijskega pufra (angl Elution buffer), s katerim dosežemo elucijo DNK, ki je vezana na filter. Vzorec smo inkubirali 1 minuto pri sobni temperaturi. Sledilo je enominutno centrifugiranje pri 20,000 x g Koncentracijo izolirane DNK smo izmerili s spektrofotometrom (NanoDrop Technologies, Wilmington, ZDA). Izolirano DNK smo nato shranili na -20 °C.

### **3.4.3 Sestava reakcijske mešanice in pogoji PCR reakcije**

Sestava reakcijske mešanice je prikazana v Preglednici 2. Pripravili smo 45 µl reakcijske mešanice v sterilni epruvetki v hladnem bloku v prostoru brez proste DNK po postopku QIAGEN Multiplex PCR Kit (QIAGEN, Hilden, Nemčija). V sterilno epruvetko smo dodali 25 µl QIAGEN Multiplex PCR Master Mix, ki vsebuje HotStarTaq DNK polimerazo, Multiplex PCR pufer ter dNTP (deoksinukleotidtrifosfati). Multiplex PCR pufer vsebuje MgCl<sub>2</sub>, ter faktor MP, ki poveča lokalno koncentracijo začetnih

oligonukleotidov ob matrični DNK ter stabilizira vezi med začetnimi oligonukleotidi in matrično DNK. Mešanici Multiplex PCR Master Mix smo nato dodali 2,5 µl začetnega oligonukleotida R-108 (5'-GTATTGCCCT-3') (TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH, Berlin, Nemčija) v končni koncentraciji 1 µM ter 17,5 µl sterilne vode (QIAGEN). V ločenem prostoru smo dodali 5 µl DNK plesni *A. fumigatus* do skupnega volumna reakcijske mešanice 50 µl.

Preglednica 2: Sestava reakcijske mešanice za verižno reakcijo s polimerazo

	Volumen (µl)	Končna koncentracija
2x Multiplex PCR Master Mix	25	1x
R-108 (20 µM)	2,5	1µM
H <sub>2</sub> O	17,5	
Skupaj MMX	45	
DNK vzorca plesni	5	
Končni volumen	50	

Pomnoževanje DNK plesni *A. fumigatus* smo izvedli v inštrumentu T3 Thermocycler (Biometra biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen, Nemčija). Potek reakcija PCR je prikazan v Preglednici 3:

1. Prvi korak reakcije PCR je aktivacija HotStarTaq DNK polimeraze, ki poteka 15 minut pri temperaturi 95 °C.
2. Pomnoževanje odsekov DNK je potekalo v širidesetih temperturnih ciklih
  - Denaturacija tarčne DNK je potekala 30 sekund pri temperaturi 94 °C
  - Pripenjanje začetnega oligonukleotida na komplementarna mesta matrične DNK je pri temperaturi 27 °C trajalo 60 sekund
  - Sinteza nove verige DNK je potekala 90 sekund pri temperaturi 72 °C
3. Končni podaljšan cikel je trajal 10 minut pri temperaturi 72 °C

Preglednica 3: Potek verižne reakcije s polimerazo

	Čas (s)	Temperatura (°C)	Število ciklov
Začetni aktivacijski korak	900	95 °C	1
Denaturacija tarčne DNK	30	94 °C	40
Pripenjanje začetnih oligonukleotidov	60	27 °C	
Sinteza nove verige DNK	90	72 °C	
Končni podaljšan korak	600	72 °C	1

Produkte PCR smo shranili na -20 °C do nadaljne uporabe.

#### 3.4.4 Dokaz produktov PCR

Gelsko elektroforezo za ločevanje fragmentov DNK in primerjavo RAPD profilov smo izvedli na 2 % agaroznem E-Gelu (Invitrogen, Carlsbad, ZDA) (Slika 7). V gel z dvanajstimi jamicami smo v prvo luknjico vnesli 18 µl sterilne vode in 2 µl raztopine fragmentov DNK znanih velikosti-123 bp DNA Ladder (Invitrogen), ki smo ju predhodno združili in premešali na parafilmu. V naslednjo jamico smo vnesli 20 µl referenčnega seva *A. fumigatus* ATCC 14110, v ostale jamice pa PCR produkte. Elektroforeza je potekala 25 minut pri sobni temperaturi, nato smo agarozne gele slikali s programom GelDoc TS Imaging System (UVP, Upland, ZDA).



Slika 7: Sistem elektroforeze z E-gelom (Invitrogen) za dokaz produktov verižne reakcije s polimerazo

### 3.4.5 Primerjava RAPD profilov

RAPD profile izolatov plesni *A. fumigatus* na E-Gelu smo primerjali vizualno. V interpretacijo rezultatov smo vključili vse lise, tiste slabše obarvane in tiste intenzivnejše obarvane. Profile izolatov, ki so se razlikovali za eno liso ali več, smo določili kot različne. Različen genotip med posameznimi sevi smo določali na podlagi prisotnosti ali odsotnosti fragmentov RAPD. Na agarozni gel smo najprej nanesli vzorec DNK iz kliničnega materiala ter vzorce DNK iz okoljskih vzorcev. Najprej smo primerjali profile bolnikovih izolatov in izolate iz bolnikovega okolja. Nato smo na gele zaporedno nanesli vse različne in vse enake izolate ter ponovno potrdili, da se razlikujejo oziroma da so enaki. RAPD profile smo razvrstili v RAPD tipe (a-n). V končni fazi smo preverili še ponovljivost metode RAPD. Izolate smo naključno izbrali ter z vsakim izolatom izvedli PCR reakcijo (11 reakcij za vsak izolat). PCR produkte izolata smo nanesli na posamezen gel (en izolat na en gel).

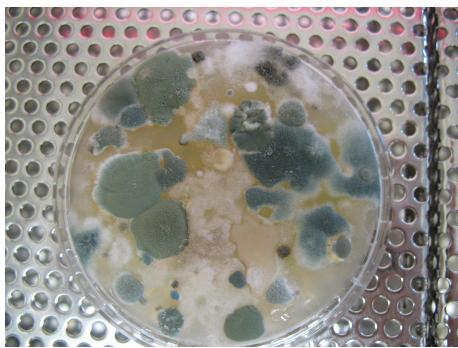
## 4 REZULTATI

Rezultati diplomske naloge so razdeljeni na dva dela. V prvem delu so prikazani rezultati vzorčenj zraka v bolnišničnem okolju, v zunanjem okolju in v zunanjem okolju-gradbišče ter odvisnost koncentracije plesni glede na vrsto gojišča.

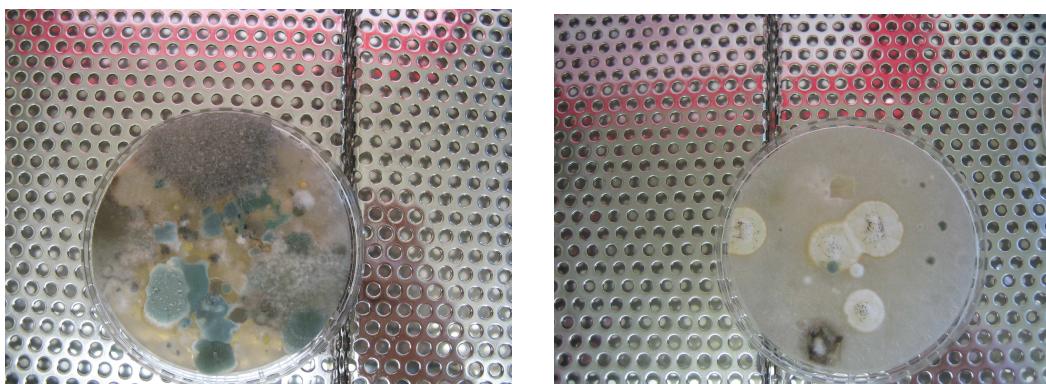
V drugem delu so predstavljeni rezultati genotipizacije plesni *A. fumigatus* z metodo RAPD ter primerjava med kliničnimi in okoljskimi izolati plesni *A. fumigatus*.

### 4.1 PRIMERJAVA MED KONCENTRACIJO SPOR PLESNI V BOLNIŠNIČNEM OKOLJU, V ZUNANJEM OKOLJU IN V ZUNANJEM OKOLJU-GRADBIŠČE

V času od oktobra 2007 do marca 2008 smo opravili 17 vzorčenj zraka v bolnišničnem okolju, 10 vzorčenj v zunanjem okolju-gradbišče in 5 vzorčenj v zunanjem okolju, kjer gradbena dela niso potekala (Priloge A-H). Volumen vzorčenega zraka je bil v bolnišničnem okolju 1020 l na RODAC ploščo, na gradbenem in ne gradbenem področju pa 420 l na RODAC ploščo. Na Sliki 8, 9 in 10 so prikazane plesni, ki smo jih osamilili iz zraka s SAS vzorčevalnikom.



Slika 8: Osamljene plesni iz zraka s SAS vzorčevalnikom (angl. Surface air system sampler) na gradbišču nove pediatrične bolnišnice na RODAC (angl. Replicate organism detection and counting) plošči z gojiščem Sabouraud (Kavčič, 2008)



Slika 9: Osamljene plesni iz zraka s SAS vzorčevalnikom (angl. Surface air system sampler) na gradbišču novega vhoda v urgentni blok Kliničnega centra na RODAC (angl. Replicate organism detection and counting) plošči s Sabouraud gojiščem (levo) ter na RODAC plošči s Czapek gojiščem (desno) (Kavčič, 2008)

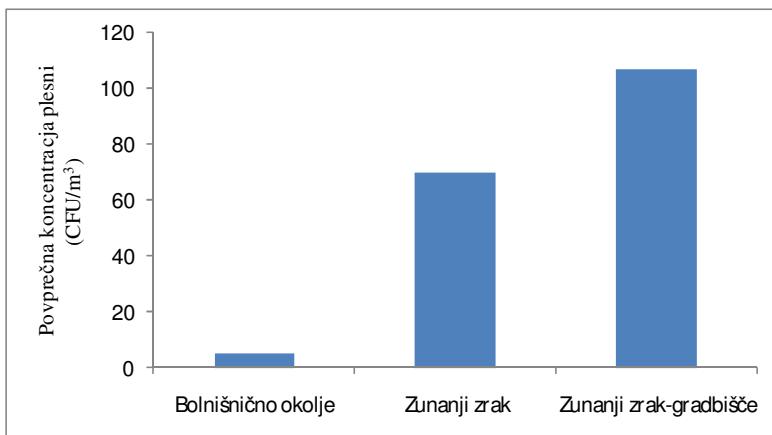


Slika 10: Osamljene plesni iz zraka s SAS vzorčevalnikom (angl. Surface air system sampler) v zunanjem okolju na RODAC (angl. Replicate organism detection and counting) plošči s Sabouraud gojiščem (Kavčič, 2008)

Koncentracija plesni je bila najvišja v zunanjem okolju-gradbišče, nižja koncentracija je bila v zunanjem okolju brez gradbenih del in najnižja v bolnišničnem okolju. Rezultati so prikazani s Preglednico 4 in Sliko 11.

Preglednica 4: Razpon in povprečna koncentracija plesni ( $\text{CFU}/\text{m}^3$ ) v bolnišničnem okolju, v zunanjem okolju in v zunanjem okolju-gradbišče

Področje vzorčenja	Razpon in povprečna koncentracija plesni $\text{CFU}/\text{m}^3$
Bolnišnično okolje	(1-21,1) 5,3
Zunanji zrak	(22,8-111,9) 69,8
Zunanji zrak-gradbišče	(61,9-164,9) 106,9

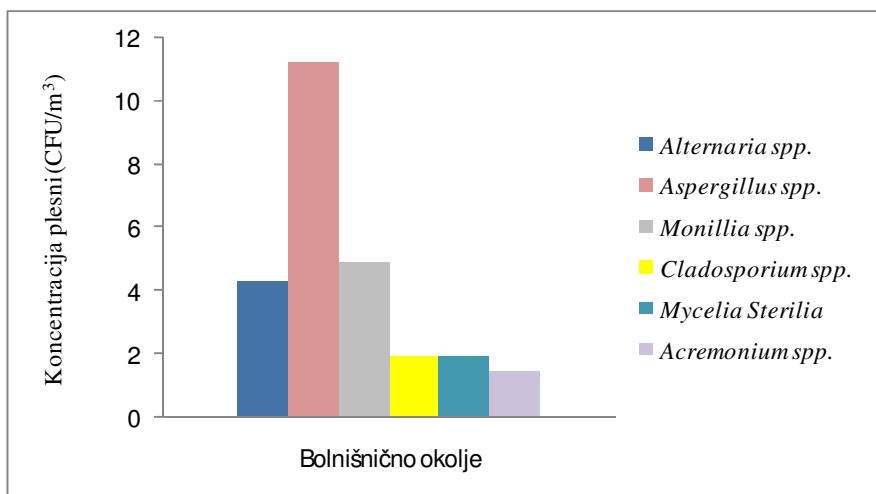
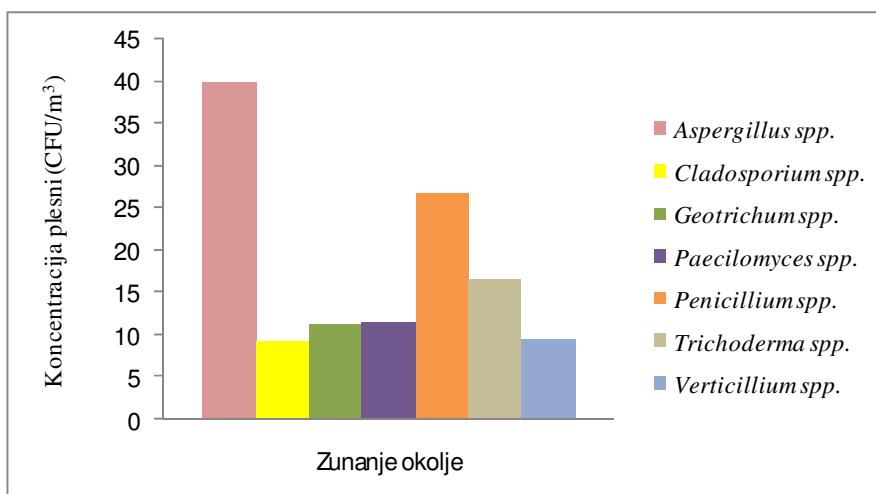


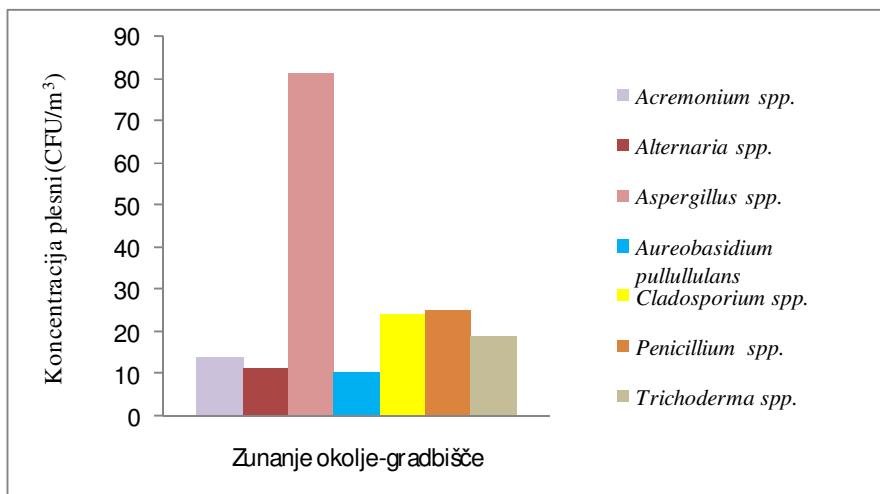
Slika 11: Povprečna koncentracija plesni ( $\text{CFU}/\text{m}^3$ ) v bolnišničnem okolju, v zunanjem okolju in v zunanjem okolju-gradbišče

Z najvišjimi povprečnimi koncentracijami so se v vseh treh okoljih pojavljale plesni iz rodu *Aspergillus* (Preglednica 5, Slike 12-15). V bolnišničnem okolju mu sledita rodova *Monilia* in *Alternaria* (Slika 12), v zunanjem okolju pa *Penicillium*, *Cladosporium* in *Trichoderma* (Preglednica 5, Sliki 13-14). S t-testom smo potrdili, da je bila povprečna koncentracija plesni v bolnišničnem okolju precej nižja od povprečne koncentracije plesni v zunanjem okolju, kjer so potekala gradbena dela ( $p=0,000$ ) ter prav tako statistično pomembno nižja od povprečne koncentracije plesni v zunanjem okolju, kjer gradbena dela niso potekala ( $p=0,046$ ). Med povprečno koncentracijo spor v zunanjem okolju kjer so in kjer niso potekala gradbena ni bilo statistično pomembnih razlik ( $p=0,287$ ).

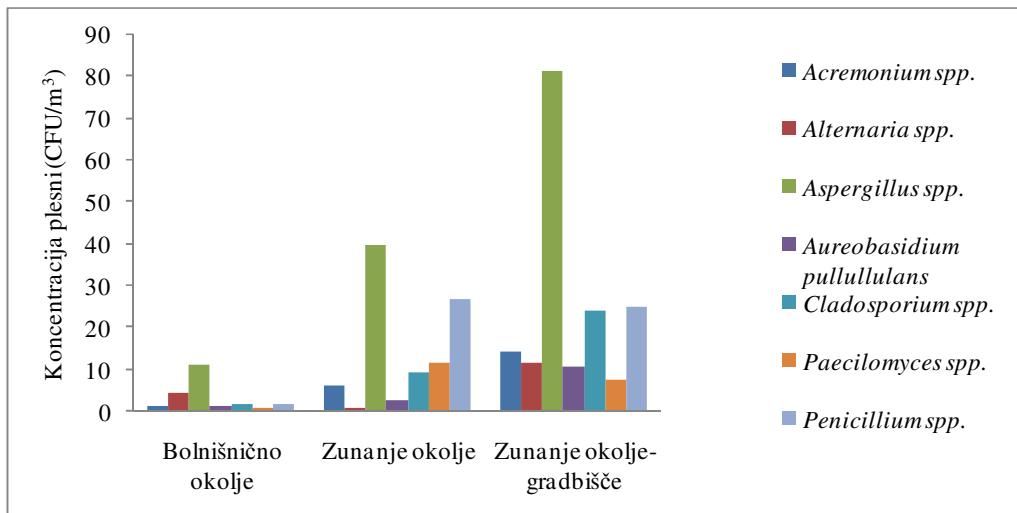
Preglednica 5: Povprečna koncentracija posameznih plesni ( $\text{CFU}/\text{m}^3$ ) v bolnišničnem okolju, v zunanjem okolju in v zunanjem okolju-gradbišče

Vrsta plesni	Bolnišnično okolje	Zunanje okolje	Zunanje okolje-gradbišče
<i>Acremonium</i> spp.	1.5	6.2	14.3
<i>Alternaria</i> spp.	4.3	1.0	11.6
<i>Aspergillus flavus</i>	1.0	16.7	11.9
<i>Aspergillus fumigatus</i>	3.1	5.7	31.4
<i>Aspergillus nidulans</i>	1.5	7.9	0
<i>Aspergillus niger</i>	3.9	0	35.7
<i>Aspergillus</i> spp.	1.7	0	0
<i>Aspergillus terreus</i>	0	9.5	0
<i>Aspergillus versicolor</i>	0	0	2.4
<i>Aureobasidium pullullulans</i>	1.3	2.9	10.7
<i>Beauveria</i> spp.	1.0	0	0
<i>Cladosporium</i> spp.	2.0	9.4	24.3
<i>Chrysonilla</i> spp.	0	0	2.4
<i>Fusarium</i> spp.	1.0	0	0
<i>Geotrichum</i> spp.	1.0	11.2	7.5
<i>Madurella</i> spp.	0	0	4.8
<i>Monilia</i> spp.	4.9	0	0
<i>Mycelia Sterilia</i>	2.0	2.0	0
<i>Paecilomyces</i> spp.	1.0	11.4	7.6
<i>Penicillium</i> spp.	1.6	26.7	25.1
<i>Stachybotrys</i> spp.	0	0	4.8
<i>Trichoderma</i> spp.	1.5	16.7	19.1
<i>Trichophyton</i> spp.	0	5.6	2.4
<i>Verticillium</i> spp.	0	9.5	0

Slika 12: Povprečna koncentracija najpogostejših plesni v zraku bolnišničnega okolja (CFU/m<sup>3</sup>)Slika 13: Povprečna koncentracija najpogostejših plesni v zraku zunanjega okolja kjer niso potekala gradbena dela (CFU/m<sup>3</sup>)

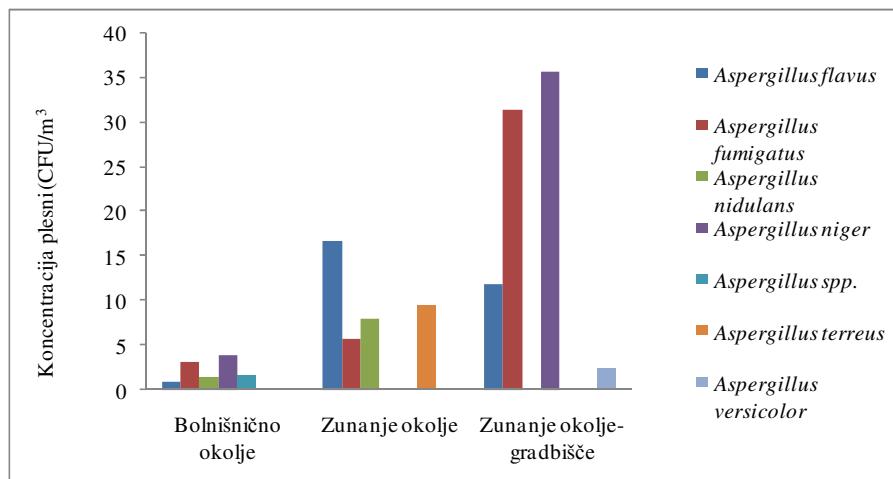


Slika 14: Povprečna koncentracija najpogostejših plesni v zraku zunanjega okolja kjer so potekala gradbena dela (CFU/m<sup>3</sup>)



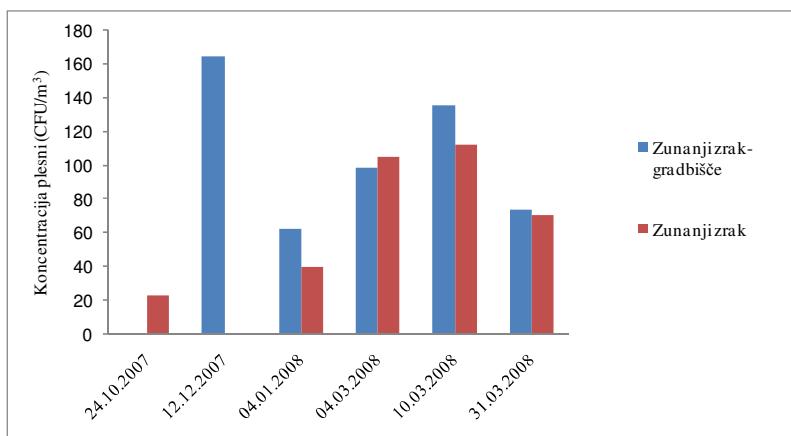
Slika 15: Primerjava povprečne koncentracije najpogostejših rodov plesni v zraku treh različnih okolij (CFU/m<sup>3</sup>)

Rod *Aspergillus* smo identificirali do vrste, ostale plesni do rodu. Med vrstami iz rodu *Aspergillus* sta v zunanjem okolju-gradbišče in v bolnišničnem okolju prevladovali vrsti *A. niger* in *A. fumigatus*, v zunanjem okolju brez gradbenih del pa vrsta *A. flavus*. Vrsto *A. terreus* smo osamili samo iz okolja, kjer gradbena dela niso potekala, vrsto *A. versicolor* pa le iz gradbenega področja (Slika 16).



Slika 16: Povprečna koncentracija plesni iz rodu *Aspergillus* ( $\text{CFU}/\text{m}^3$ ) na različnih področjih

V naši raziskavi so bile povprečne koncentracije plesni najvišje dne 12.12.2007 v zunanjem okolju, kjer so potekala gradbena dela, najnižje pa 24.10.2007 v zunanjem okolju, kjer gradbena dela niso potekala (Slika 17). Na gradbišču so bile najvišje povprečne koncentracije dne 12.12.2007, najnižje pa 04.01.2008. V zunanjem okolju, kjer gradbena dela niso potekala, so bile najvišje povprečne koncentracije plesni dne 10.03.2008, najnižje pa dne 24.10.2007 (Slika 17).



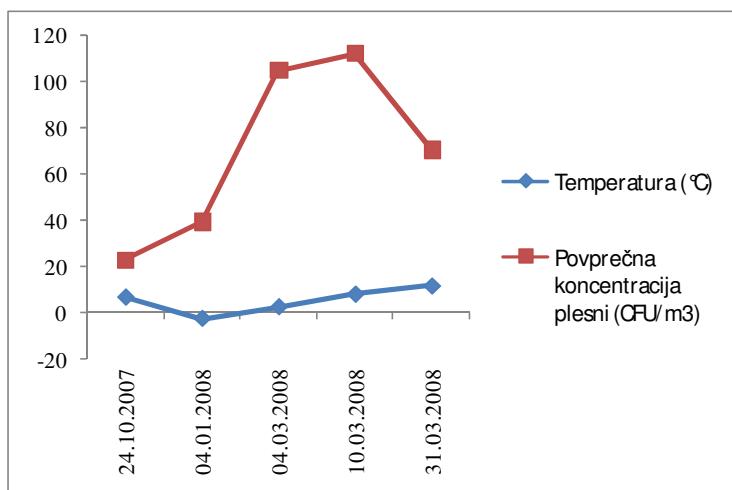
Slika 17: Povprečne koncentracije plesni v zunanjem zraku ( $\text{CFU}/\text{m}^3$ ) glede na čas vzorčenja

Dne 24.10.2007 smo vzorčili zrak v zunanjem okolju samo na področju, kjer gradbena dela niso potekala, dne 12.12.2007 pa samo v zunanjem okolju, kjer so potekala gradbena dela.

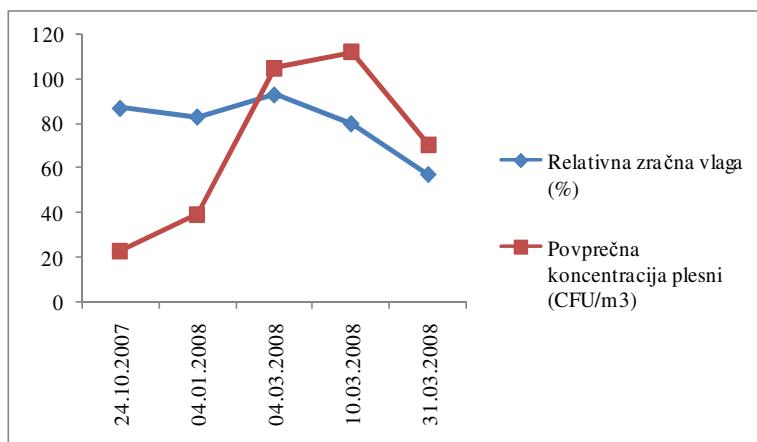
Na povišano koncentracijo plesni vpliva visoka relativna vlaga, višje temperature ter razgradnja vegetacije. Najvišja koncentracija plesni je bila pri temperaturi  $-2^\circ\text{C}$  in 83 % relativni vlagi, najnižja koncentracija pa pri temperaturi  $6,7^\circ\text{C}$  in relativni vlagi 87 % (Preglednica 6). Sliki 18 in 19 prikazujeta odnos med temperaturo in relativno zračno vlogo ter koncentracijo spor v zraku.

Preglednica 6: Pogoji okolja v času vzorčenja zraka

Datum vzorčenja	Temperatura ( $^\circ\text{C}$ )	Relativna vлага (%)	Povprečna koncentracija plesni ( $\text{CFU}/\text{m}^3$ )
24.10.2007	6,7	87	22,8
04.01.2008	-2,8	83	39,3
04.03.2008	2,4	93	104,8
10.03.2008	8	80	111,9
31.03.2008	11,6	57	70,2

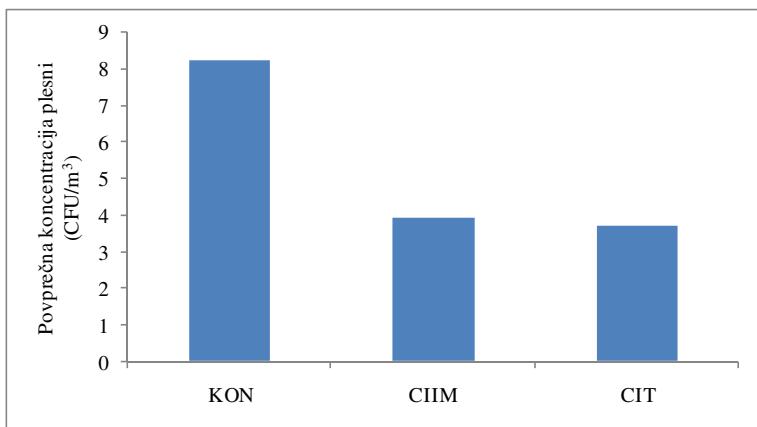


Slika 18: Odnos med temperaturo in koncentracijo plesni



Slika 19: Odnos med relativno zračno vlagom in koncentracijo plesni

V bolnišničnem okolju ni bilo statistično pomembnih razlik med povprečnimi koncentracijami plesni na oddelkih KON in CIT ( $p=0,326$ ), KON in CIIM ( $p=0,169$ ) ter CIIM in CIT ( $p=1,575$ ) (Slika 20).



Slika 20: Povprečna koncentracija plesni (CFU/m<sup>3</sup>) na različnih oddelkih

V bolnišničnem okolju je bila najvišja koncentracija spor *Aspergillus* spp. na oddelku KON, najnižja pa na oddelkih CIIM in CIT (Preglednica 7).

S t-testom smo potrdili, da je bila povprečna koncentracija spor v bolnišničnem okolju precej nižja ( $5,3$  CFU/m<sup>3</sup>) od povprečne koncentracije spor v zunanjem okolju ( $88,4$  CFU/m<sup>3</sup>) ( $p=0,000$ ) (Preglednica 7). Med povprečno koncentracijo spor v zunanjem zraku, kjer gradbena dela niso potekala ( $69,8$  CFU/m<sup>3</sup>) in v zunanjem zraku-gradbišče ( $106,9$  CFU/m<sup>3</sup>) nismo ugotovili statistično pomembnih razlik ( $p=0,286$ ). Koncentracija spor *Aspergillus* spp. je bila najvišja v zunanjem okolju na področju gradbišča ( $35,4$  CFU/m<sup>3</sup>), najnižja pa v bolnišničnem okolju na oddelkih CIIM in CIT ( $2,4$  CFU/m<sup>3</sup>). S t-testom smo potrdili statistično značilno razliko med koncentracijami spor *Aspergillus* spp. v bolnišničnem in zunanjem okolju ( $p=0,001$ ) (Preglednica 7).

Preglednica 7: Povprečna koncentracija in razpon plesni ( $\text{CFU}/\text{m}^3$ ) na vseh področjih vzorčenja ter delež plesni *Aspergillus* spp. glede na vse plesni

Mesto vzorčenja	Področje	Število vzorčenj	Povprečje, (rang) za vse plesni $\text{CFU}/\text{m}^3$	Povprečje, (rang) za vse <i>Aspergillus</i> spp. $\text{CFU}/\text{m}^3$	Delež pozitivnih vzorcev za vse <i>Aspergillus</i> spp. (%)	Delež <i>Aspergillus</i> spp. glede na vse osamljene plesni (%)
KON	Bolniške sobe	7	9,0 (2,0-21,1)	5,6 (2,0-9,8)	41,7	36,4
	Izven bolniških sob	4	8,2 (2,0-10,8)	6,5 (4,4-8,8)	59,1	41,7
CIM in CIT	Bolniške sobe	4	5,0 (1,30-7,8)	2,8 (1,0-5,4)	33,3	22,2
	Izven bolniških sob	2	1,5 (1,0-2,0)	2,0	50,0	50,0
Zunanje okolje	Gradbeno področje	10	106,9 (61,9-164,9)	35,4 (26,2-45,2)	21,4	25,0
	Ne gradbeno področje	5	69,8 (22,8-111,9)	152 (59-250)	26,1	26,7
	Bolnišnično okolje - vsi skupaj	17	5,3 (1,0-21,1)	4,1 (1-8,8)	46,4	29,4
	Zunanje okolje - vsi skupaj	15	88,4 (22,8-164,9)	25,3 (5,9-45,2)	23,1	30,0

Med vrstami *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. nidulans* in *A. flavus*, ki smo jih osamili iz bolnišničnega okolja, se je v najvišjih koncentracijah pojavljala vrsta *A. fumigatus*. V zunanjem okolju smo določili najvišje povprečne koncentracije za plesen *A. niger*. *A. terreus* in *A. versicolor* smo osamili samo v zunanjem okolju. Koncentracije spor *A. fumigatus* so bistveno višje v zunanjem okolju ( $p=0,004$ ), vrednosti koncentracij spor plesni *A. niger*, *A. nidulans* in *A. flavus* pa se statistično ne razlikujejo med zunanjim in bolnišničnim okoljem ( $p>0,05$ ) (Preglednica 8).

Preglednica 8: Povprečna koncentracija spor iz rodu *Aspergillus* (CFU/m<sup>3</sup>) v bolnišničnem in zunanjem okolju

Mesto vzorčenja	Področje	Število vzorčenj	Povprečje, za <i>Aspergillus</i> spp. – vse CFU/m <sup>3</sup>	Povprečje, za <i>Aspergillus fumigatus</i> CFU/m <sup>3</sup>	Povprečje, za <i>Aspergillus niger</i> CFU/m <sup>3</sup>	Povprečje, za <i>Aspergillus flavus</i> CFU/m <sup>3</sup>	Povprečje, za <i>Aspergillus nidulans</i> CFU/m <sup>3</sup>
KON	Bolniške sobe	7	5.6	3.2	2.7	1.0	2.0
	Izven bolniških sob	4	6.5	2.8	0	2.9	1.0
CIM in CIT	Bolniške sobe	4	2.8	5.4	0	0	1.5
	Izven bolniških sob	2	2.0	2.0	0	0	0
Zunanje okolje	Gradbeno področje	10	35.4	31.5	35.7	11.9	0
	Ne gradbeno področje	5	15.2	6.5	0	16.7	7.1
Bolnišnično okolje - vsi skupaj		17	4.1	3.3	3.1	2.0	1.5
Zunanje okolje - vsi skupaj		15	25.3	19.0	35.3	14.3	4.3
p vrednost (t-test) statistične primerjave povprečne koncentracije plesni v bolnišničnem in zunanjem okolju				0.001	0.004	0.177	0.225
						0.509	

Plesni iz rodov *Alternaria*, *Penicillium*, *Acremonium*, *Aureobasidium* in *Trichoderma* so se poleg plesni iz rodu *Aspergillus* pojavljale v najvišjih koncentracijah v bolnišničnem in zunanjem okolju (Preglednica 9).

Preglednica 9: Povprečne koncentracije spor (CFU/m<sup>3</sup>) v notranjem in zunanjem okolju, ki so se pojavljale v najvišjih koncentracijah

Rodovi plesni, brez <i>Aspergillus</i> spp.	Povprečje–bolnišnično okolje (CFU/m <sup>3</sup> )	Povprečje–zunanje okolje (gradbeno in ne gradbeno področje) (CFU/m <sup>3</sup> )
<i>Alternaria</i>	4,3	9,2
<i>Cladosporium</i>	2,0	19,8
<i>Penicillium</i>	1,6	26,0
<i>Monilia</i>	4,9	0
<i>Trichoderma</i>	1,5	17,9
<i>Acremonium</i>	1,5	8,2
<i>Aureobasidium</i>	1,3	5,5

## 4.2 PRIMERJAVA VRSTNE RAZNOLIKOSTI PLESNI V BOLNIŠNIČNEM OKOLJU, GRADBENEM PODROČJU IN V ZUNANJEM OKOLJU

V bolnišničnem okolju smo pri sedemnajstih vzorčenjih najpogosteje osamili plesni iz rodov *Aspergillus* in *Penicillium* (Preglednica 10, Slika 22). Tudi v zunanjem okolju brez gradbenih del smo najpogosteje osamili zgoraj omenjene plesni (Preglednica 10, Slika 23). Na gradbenem področju smo najpogosteje osamili plesni iz rodov *Aspergillus*, *Cladosporium* in *Penicillium* (Preglednica 10, Slika 24).

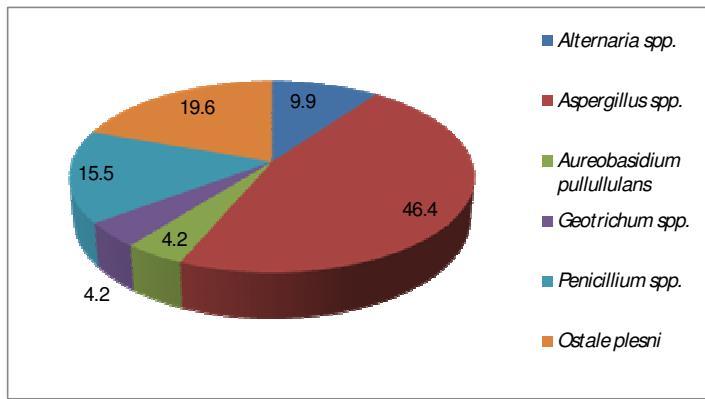
Preglednica 10: Vrstna raznolikost in pogostost osamljenih plesni iz različnih okolij, izražena v absolutnih številkah (n) in deležu posameznih osamljenih plesni glede na vse osamljene plesni (%)

Vrsta plesni	Bolnišnično okolje 17 vzorčenj (71 osamljenih plesni)		Zunanje okolje 5 vzorčenj (46 osamljenih plesni)		Zunanje okolje- gradbišče 10 vzorčenj (84 osamljenih plesni)	
	n	%	n	%	n	%
<i>Acremonium</i> spp.	2	2.8	3	6.5	1	1.2
<i>Alternaria</i> spp.	7	9.9	1	2.2	8	9.5
<i>Aspergillus flavus</i>	1	1.4	2	4.3	2	2.4
<i>Aspergillus fumigatus</i>	16	22.5	6	13.0	11	13.1
<i>Aspergillus nidulans</i>	4	5.6	3	6.5	0	0
<i>Aspergillus niger</i>	9	12.7	0	0	4	4.8
<i>Aspergillus</i> spp.	4	5.6	0	0	0	0
<i>Aspergillus terreus</i>	0	0	1	2.2	0	0
<i>Aspergillus versicolor</i>	0	0	0	0	1	1.2
<i>Aureobasidium pullullulans</i>	3	4.2	2	4.3	2	2.4
<i>Beauveria</i> spp.	1	1.4	0	0	0	0
<i>Cladosporium</i> spp.	1	1.4	3	6.5	14	16.7
<i>Chrysonilla</i> spp.	0	0	0	0	2	2.4
<i>Fusarium</i> spp.	2	2.8	0	0	0	0
<i>Geotrichum</i> spp.	3	4.2	4	8.7	7	8.3
<i>Madurella</i> spp.	0	0	0	0	1	1.2
<i>Monilia</i> spp.	1	1.4	0	0	0	0
<i>Mycelia Sterilia</i>	2	2.8	1	2.2	0	0
<i>Paecilomyces</i> spp.	2	2.8	5	10.9	10	11.9
<i>Penicillium</i> spp.	11	15.5	9	19.6	18	21.4
<i>Stachybotrys</i> spp.	0	0	0	0	1	1.2
<i>Trichoderma</i> spp.	2	2.8	1	2.2	1	1.2
<i>Trichophyton</i> spp.	0	0	3	6.5	1	1.2
<i>Verticillium</i> spp.	0	0	2	4.3	0	0

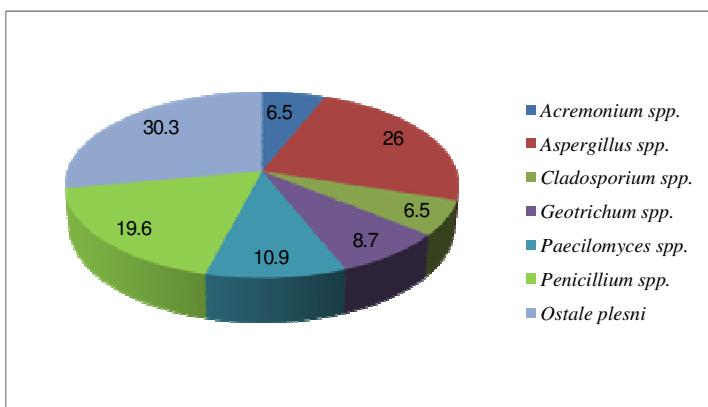
Med vrstami iz rodu *Aspergillus* sta v bolnišničnem okolju in na gradbenem področju prevladovali vrsti *A. fumigatus* in *A. niger* (Slika 21). Od skupno 71 osamljenih plesni v bolnišničnem okolju smo *A. fumigatus* osamili 16-krat (22.5 %), *A. niger* pa devetkrat (12.5 %). V zunanjem okolju, kjer gradbena dela niso potekala, smo najpogosteje osamili vrsti *A. fumigatus* in *A. nidulans* (Preglednica 10).



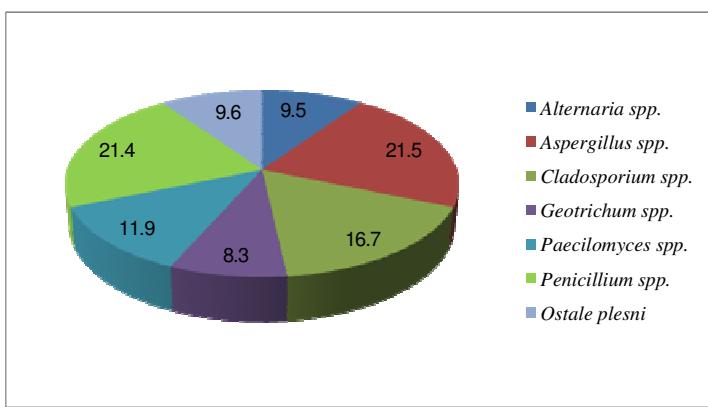
Slika 21: *Aspergillus niger* in *Aspergillus fumigatus* (od leve proti desni) na Sabouraud gojišču (Kavčič, 2008)



Slika 22: Prikaz najpogosteje osamljenih plesni v bolnišničnem okolju



Slika 23: Prikaz najpogosteje osamljenih plesni v zunanjem okolju, kjer gradbena dela niso potekala



Slika 24: Prikaz najpogosteje osamljenih plesni v zunanjem okolju, kjer so potekala gradbena dela

Na oddelku KON so se v najvišjih povprečnih koncentracijah pojavljale plesni iz rodov *Aspergillus*, *Monillia* in *Alternaria*, na oddelku CIT iz rodov *Aspergillus*, *Acremonium* in *Cladosporium*, na oddelku CIIM pa plesni iz rodov *Aspergillus*, *Penicillium* in *Aureobasidium*. Plesni *Alternaria* spp., *Beauveria* spp., *Geotrichum* spp., *Monillia* spp. in *Trichoderma* spp. smo osamili samo iz oddelka KON, kjer je bila prisotna tudi največja raznolikost plesni. Vrsta *A. fumigatus* je bila prisotna na vseh treh oddelkih, vrsti *A. flavus* in *A. niger* pa smo osamili samo na oddelku KON (Preglednica 11).

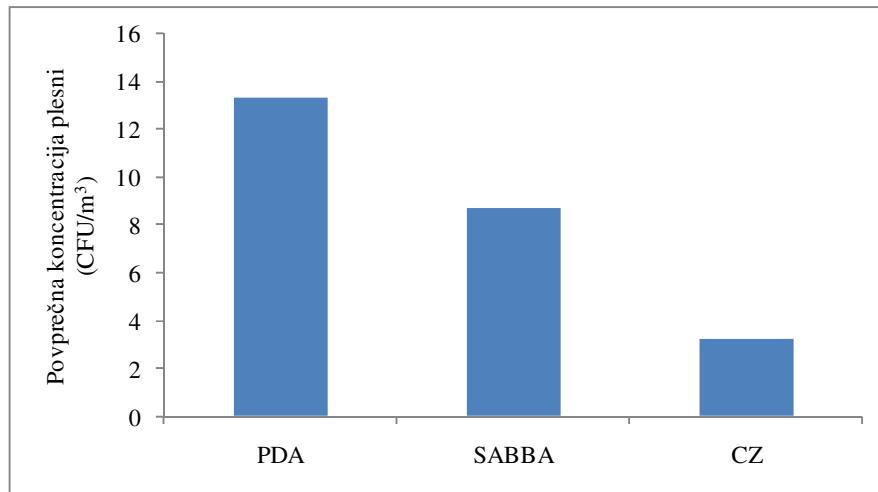
Preglednica 11: Povprečne koncentracije posameznih vrst plesni CFU/m<sup>3</sup> v zraku treh različnih bolnišničnih oddelkov

Vrsta plesni	KON	CIT	CIIM
<i>Acremonium</i> spp.	1,0	2,0	0
<i>Alternaria</i> spp.	4,3	0	0
<i>Aspergillus flavus</i>	1,0	0	0
<i>Aspergillus fumigatus</i>	3,0	1,5	5,3
<i>Aspergillus nidulans</i>	1,5	1,5	0
<i>Aspergillus niger</i>	3,5	0	0
<i>Aspergillus</i> spp.	1,7	0	0
<i>Aureobasidium pullulans</i>	1,0	1,0	2,0
<i>Beauveria</i> spp.	1,0	0	0
<i>Cladosporium</i> spp.	0	2,0	0
<i>Fusarium</i> spp.	1,0	1,0	0
<i>Geotrichum</i> spp.	1,0	0	0
<i>Monillia</i> spp.	4,9	0	0
<i>Mycelia Sterilia</i>	2,9	1,0	0
<i>Paecilomyces</i> spp.	1,0	0	1,0
<i>Penicillium</i> spp.	2,2	1,0	2,0
<i>Trichoderma</i> spp.	1,5	0	0

#### 4.3 PRIMERJAVA RODAC PLOŠČ Z RAZLIČNIMI GOJIŠČI

Na raznolikost in koncentracijo plesni na RODAC plošči vpliva vrsta izbranega gojišča. Najvišje koncentracije plesni ter največjo raznolikost smo določili ob uporabi gojišč SABA in PDA. Ob primerjavi povprečnih koncentracij plesni osamljenih na SABA in PDA nismo ugotovili statistično značilnih razlik ( $p=0,214$ ). Povprečne koncentracije plesni so bile statistično značilno nižje ob primerjavi s PDA in SABA ( $p=0,000$ ) (Slika 25).

Plesni iz rodov *Beauveria* in *Monilliopsis* ter vrste *A. versicolor* smo osamili samo na ploščah s CZA gojiščem. Plesen iz rodu *Madurella* in plesen vrste *A. terreus* smo osamili samo na PDA, plesen iz rodu *Stachybotrys* pa samo na SABA gojišču (Preglednica 12).



Slika 25: Prikaz povprečne koncentracije plesni ( $\text{CFU}/\text{m}^3$ ) na različnih gojiščih v vseh treh okoljih  
(bolnišnično, gradbeno, ne gradbeno)

Preglednica 12: Prikaz vrstne raznolikosti in povprečne koncentracije posamezne vrste plesni (CFU/m<sup>3</sup>) na različnih gojiščih v vseh treh okoljih

Vrsta plesni	PDA	SABBA	CZA
<i>Acremonium</i> spp.	8,3	7,6	2,0
<i>Alternaria</i> spp.	16,7	6,2	13,5
<i>Aspergillus flavus</i>	6,0	22,6	1,0
<i>Aspergillus fumigatus</i>	15,7	11,3	2,4
<i>Aspergillus nidulans</i>	16,7	12,2	1,6
<i>Aspergillus niger</i>	39,3	4,8	2,6
<i>Aspergillus</i> spp.	0	2,9	1,6
<i>Aspergillus terreus</i>	9,5	0	0
<i>Aspergillus versicolor</i>	0	0	2,4
<i>Aureobasidium pullulans</i>	19,1	3,6	1,3
<i>Beauveria</i> spp.	0	0	1,0
<i>Cladosporium</i> spp.	17,4	18,4	2,1
<i>Chrysonilla</i> spp.	2,4	2,4	2,4
<i>Fusarium</i> spp.	0	1,0	1,0
<i>Geotrichum</i> spp.	12,5	6,3	1,8
<i>Madurella</i> spp.	4,8	0	0
<i>Monilia</i> spp.	0	0	4,9
<i>Mycelia Sterilia</i>	0	2,9	1,5
<i>Paecilomyces</i> spp.	6,4	9,6	1,0
<i>Penicillium</i> spp.	21,1	23,9	14,0
<i>Stachybotrys</i> spp.	0	4,8	0
<i>Trichoderma</i> spp.	16,7	10,3	0
<i>Trichophyton</i> spp.	2,4	7,1	0
<i>Verticillium</i> spp.	11,9	7,1	0
povprečno	13,3	8,7	3,2

#### 4.4 OPREDELITEV IZOLATOV *A. fumigatus*, OSAMLJENIH IZ KLINIČNIH VZORCEV BOLNIKOV IN IZ BOLNIŠNIČNEGA OKOLJA S TIPIZACIJSKO METODO RAPD

V raziskavo smo vključili izolate *A. fumigatus*, ki smo jih osamili iz kliničnih vzorcev dihal pri bolnikih P1, P2 in P3, ki so imeli klinično dokazano invazivno aspergilozu pljuč. Bolnik P1 je bil hospitaliziran v prostorih KON, v sobi 1, bolnik P2 v CIIM v sobi 2, bolnik P3 pa v prostorih CIT v sobi 3. Bolniku P1 je bil odvzet vzorec aspirata traheje dne 07.10.2007, bolniku P2 dne 06.10.2007, bolniku P3 pa 15.10.2007. Vzorčenje zraka je potekalo v bolnišničnem okolju, kjer je bil hospitaliziran bolnik P1 dne 12.12.2007, v bolnišničnem okolju, kjer sta bila hospitalizirana bolnika P2 in P3 pa dne 24.10.2007. V sobi bolnika P1 je bila povprečna koncentracija plesni *A. fumigatus* 4,2 CFU/m<sup>3</sup>. Plesni *A. fumigatus* v sobah bolnikov P2 in P3 nismo osamili (Preglednica 13 ).

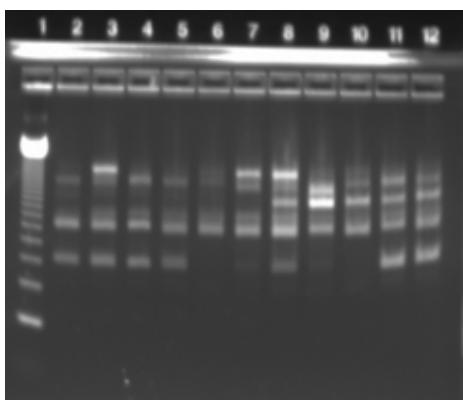
Preglednica 13: Vrstna raznolikost in koncentracija plesni (CFU/m<sup>3</sup>) v sobah in na hodnikih pred sobami bolnikov P1, P2 in P3

Vrsta plesni	P1		P2		P3
	Soba 1	Hodnik	Soba 2	Hodnik	Soba 3
<i>Acremonium</i> spp.	0	0	0	0	2,0
<i>Alternaria</i> spp.	2,5	0	0	0	0
<i>Aspergillus fumigatus</i>	4,2	3,4	0	0	0
<i>Aspergillus nidulans</i>	0	0	0	0	1,0
<i>Aspergillus niger</i>	1,0	1,0	0	0	0
<i>Aspergillus</i> spp.	1,5	0	0	0	0
<i>Aureobasidium pullulans</i>	0	0	2,0	0	0
<i>Cladosporium</i> spp.	0	0	0	0	2,0
<i>Fusarium</i> spp.	0	0	0	0	1,0
<i>Mycelia Sterilia</i>	0	0	0	0	1,0
<i>Penicillium</i> spp.	2,0	2,0	2,5	1,0	1,0

V bolnišničnem okolju KON oddelka smo pridobili skupaj 24 izolatov plesni *A. fumigatus*. Z metodo RAPD smo od sedemnajstih izolatov iz sobe 1 določili devet različnih RAPD tipov plesni *A. fumigatus*, iz hodnika pred sobo 1 smo od skupno sedmih izolatov opredelili dva seva plesni *A. fumigatus*. Klinični izolat P1(a) ni bil enak nobenemu izmed okoljskih izolatov v prostorih KON (Preglednica14, Slika 26-28).

Preglednica 14: Izolati *Aspergillus fumigatus*, osamljeni iz kliničnega vzorca bolnika in iz bolnišničnega okolja

Oznaka	Datum izolacije	Izvor izolata	Slika	Št. stolpca na sliki	RAPD tip izolata
P1	16.10.2007	Bolnik na KON	26, 27, 28	3	a
1/S/1	24.10.2007	Soba P1	28	4	k
1/C/1	24.10.2007	Soba P1	28	5	k
1/S/2	24.10.2007	Soba P1	26	4	b
1/S/3	24.10.2007	Soba P1	26	5	b
1/S/4	24.10.2007	Soba P1	26	6	c
2/C/1	24.10.2007	Ob oknu sobe P1	26	7	d
2/C/9	24.10.2007	Ob oknu sobe P1	26	8	j
2/S/2	24.10.2007	Ob oknu sobe P1	26	9	f
2/S/3	24.10.2007	Ob oknu sobe P1	26	10	f
2/S/4	24.10.2007	Ob oknu sobe P1	26	11	g
2/S/5	24.10.2007	Ob oknu sobe P1	26	12	g
2/S/6	24.10.2007	Ob oknu sobe P1	27	4	h
2/S/7	24.10.2007	Ob oknu sobe P1	27	5	i
2/S/8	24.10.2007	Ob oknu sobe P1	27	6	j
2/S/9	24.10.2007	Ob oknu sobe P1	27	7	j
2/S/10	24.10.2007	Ob oknu sobe P1	27	8	j
2/S/11	24.10.2007	Ob oknu sobe P1	27	9	j
3/C/1	24.10.2007	Hodnik pred sobo P1	27	10	i
3/C/4	24.10.2007	Hodnik pred sobo P1	27	11	i
3/S/2	24.10.2007	Hodnik pred sobo P1	27	12	j
3/S/3	24.10.2007	Hodnik pred sobo P1	28	6	i
3/S/4	24.10.2007	Hodnik pred sobo P1	28	7	i
3/S/5	24.10.2007	Hodnik pred sobo P1	28	8	i
3/S/6	24.10.2007	Hodnik pred sobo P1	28	9	i



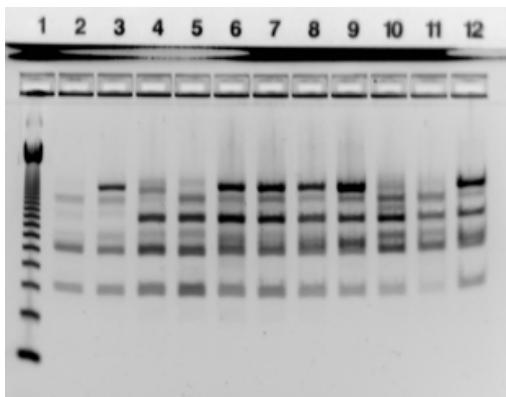
Slika 26: RAPD profili izolatov plesni *Aspergillus fumigatus*

Stolpec 1: Fragmenti DNK znanih velikosti-123 bp DNA Ladder (Invitrogen)

Stolpec 2: Referenčni sev *A. fumigatus* ATCC 14110

Stolpec 3: Izolat *A. fumigatus*, osamljen iz kliničnega vzorca bolnika P1

Stolpec 4 do 12: Okoljski izolati *A. fumigatus*, osamljeni iz oddelka KON (1/S/2, 1/S/3, 1/S/4, 2/C/1, 2/C/9, 2/S/2, 2/S/3, 2/S/4, 2/S/5) (Preglednica 14)



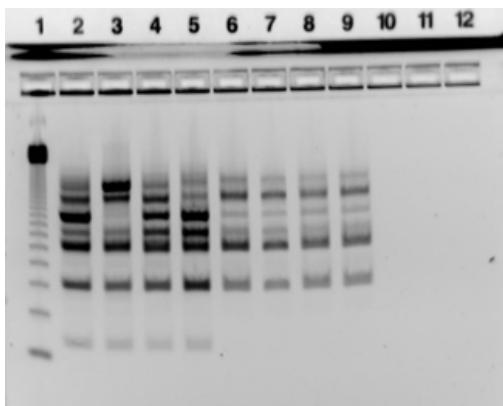
Slika 27: RAPD profili izolatov plesni *Aspergillus fumigatus*

Stolpec 1: Fragmenti DNK znanih velikosti-123 bp DNA Ladder (Invitrogen)

Stolpec 2: Referenčni sev *A. fumigatus* ATCC 14110

Stolpec 3: Izolat *A. fumigatus*, osamljen iz kliničnega vzorca bolnika P1

Stolpec 4 do 12: Okoljski izolati *A. fumigatus*, osamljeni iz oddelka KON (2/S/6, 2/S/7, 2/S/8, 2/S/9, 2/S/10, 2/S/11, 3/C/1, 3/C/4, 3/S/2) (Preglednica 14)



Slika 28: RAPD profili izolatov plesni *Aspergillus fumigatus*

Stolpec 1: Fragmenti DNK znanih velikosti-123 bp DNA Ladder (Invitrogen)

Stolpec 2: Referenčni sev *A. fumigatus* ATCC 14110

Stolpec 3: Izolat *A. fumigatus*, osamljen iz kliničnega vzorca bolnika P1

Stolpec 4 do 9: Okoljski izolati *A. fumigatus*, osamljeni iz oddelka KON (1/S/1, 1/C/1, 3/S/3, 3/S/4, 3/S/5, 3/S/6) (Preglednica 14)

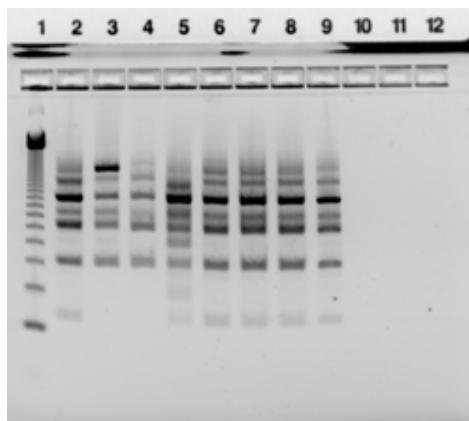
Izolat plesni *A. fumigatus* iz kliničnega vzorca bolnika P2, smo primerjali z enajstimi okoljskimi izolati iz sobe 1 na oddelku CIIM. V sobi 2 v prostorih CIIM, kjer je bil bolnik P2 hospitaliziran, nismo osamili plesni *A. fumigatus*. Izolat P2 (j) ni bil enak nobenemu okoljskemu izolatu iz prostorov CIIM. Enakost pa smo potrdili med kliničnim izolatom P2 (j) in izolati (j) iz sobe 1 ob oknu ter iz hodnika pred sobo 1 v prostorih KON (Preglednica 14).

S tipizacijsko metodo RAPD smo ugotovili identičnost za okoljske izolate (g), ki smo jih osamili iz sobe bolnika P1 ob oknu na oddelku KON, iz sobe 1 na oddelku CIIM ter iz pomivalnice na oddelku CIT (Preglednica 14-16, Slike 26, 29-31).

Izolat plesni *A. fumigatus* iz kliničnega vzorca bolnika P3 (n), ni bil enak nobenemu okoljskemu izolatu (Preglednica 16).

Preglednica 15: Izolati *Aspergillus fumigatus*, osamljeni iz kliničnega vzorca bolnika in iz bolnišničnega okolja

Oznaka	Datum izolacije	Izvor izolata	Slika	Št. stolpca na sliki	RAPD tip izolata
P2	11.10.2007	Bolnik na CIIM	29, 30	3	j
12/C/1	05.11.2007	Soba na oddelku CIIM	29	4	g
12/C/2	05.11.2007	Soba na oddelku CIIM	29	5	l
12/C/3	05.11.2007	Soba na oddelku CIIM	30	4	g
12/C/4	05.11.2007	Soba na oddelku CIIM	30	5	g
12/C/5	05.11.2007	Soba na oddelku CIIM	30	6	g
12/C/6	05.11.2007	Soba na oddelku CIIM	30	7	g
12/C/7	05.11.2007	Soba na oddelku CIIM	30	8	g
12/S/1	05.11.2007	Soba na oddelku CIIM	29	6	m
12/S/2	05.11.2007	Soba na oddelku CIIM	29	7	m
12/S/3	05.11.2007	Soba na oddelku CIIM	29	8	m
12/S/4	05.11.2007	Soba na oddelku CIIM	29	9	m



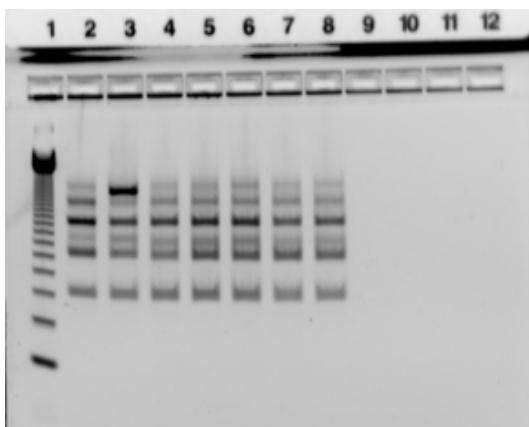
Slika 29: RAPD profili izolatov plesni *Aspergillus fumigatus*

Stolpec 1: Fragmenti DNK znanih velikosti-123 bp DNA Ladder (Invitrogen)

Stolpec 2: Referenčni sev *A. fumigatus* ATCC 14110

Stolpec 3: Izolat *A. fumigatus*, osamljen iz kliničnega vzorca bolnika P2

Stolpec 4 do 9: Okoljski izolati *A. fumigatus*, osamljeni iz oddelka CIIM (12/C/1, 12/C/2, 12/S/1, 12/S/2, 12/S/3, 12/S/4) (Preglednica 15)

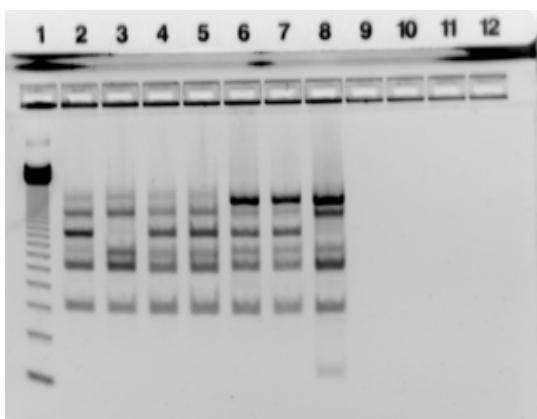
Slika 30: RAPD profili izolatov plesni *Aspergillus fumigatus*

Stolpec 1: Fragmenti DNK znanih velikosti-123 bp DNA Ladder (Invitrogen)

Stolpec 2: Referenčni sev *A. fumigatus* ATCC 14110Stolpec 3: Izolat *A. fumigatus*, osamljen iz kliničnega vzorca bolnika P2Stolpec 4 do 8: Okoljski izolati *A. fumigatus*, osamljeni iz oddelka CIIM (12/C/3, 12/C/4, 12/C/5, 12/C/6, 12/C/7) (Preglednica 15)

Preglednica 16: Izolati *Aspergillus fumigatus*, osamljeni iz kliničnega vzorca bolnika in iz bolnišničnega okolja

Oznaka	Datum izolacije	Izvor izolata	Slika	Št. stolpca na sliki	RAPD tip izolata
P3	20.10.2007	Bolnik na CIT	31	3	n
16/C/1	05.11.2007	Pomivalnica na oddelku CIT	31	4	g
16/C/2	05.11.2007	Pomivalnica na oddelku CIT	31	5	g
P2	11.10.2007	Bolnik na CIIM	31	6,7	j
P1	16.10.2007	Bolnik na KON	31	8	a



Slika 31: RAPD profili izolatov plesni *Aspergillus fumigatus*

- Stolpec 1: Fragmenti DNK znanih velikosti-123 bp DNA Ladder (Invitrogen)
- Stolpec 2: Referenčni sev *A. fumigatus* ATCC 14110
- Stolpec 3: Izolat *A. fumigatus*, osamljen iz kliničnega vzorca bolnika P3
- Stolpec 4 in 5: Okoljski izolati *A. fumigatus*, osamljeni iz oddelka CIT (16/C/1, 16/C/2)  
(Preglednica 16)
- Stolpec 6 in 7: Izolat *A. fumigatus*, osamljen iz kliničnega vzorca bolnika P2
- Stolpec 8: Izolat *A. fumigatus*, osamljen iz kliničnega vzorca bolnika P1

## 5 RAZPRAVA

Zaradi vse večjega števila imunsko oslabljenih bolnikov z večjim tveganjem za nastanek oportunističnih okužb posledično narašča incidenca okužb s plesnimi. *A. fumigatus* je postal v zadnjih desetletjih najpogosteji povzročitelj invazivne aspergiloze pri imunsko oslabljenih osebah, IA pa poglaviten vzrok visoke stopnje smrtnosti pri bolnikih z levkemijo, bolnikih, ki so zdravljeni s presaditvijo krvotvornih matičnih celic ali čvrstih organov (Curtis in sod., 2005). Takšni bolniki lahko pridobijo aspergilozo kot eksogeno okužbo v domačem ali v bolnišničnem okolju, kar nakazuje, da je zelo pomemben dejavnik za razvoj invazivne aspergiloze bolnikovo okolje. Spremljanje koncentracije spor plesni je v bolnišničnem okolju zelo pomembno za določitev izvora izbruhotvornih invazivne aspergiloze, za ugotavljanje učinkovitosti delovanja prezračevalnih in filtracijskih sistemov in za nadzorovanje uspešnosti postopkov čiščenja bolnišničnih prostorov (Morris in sod., 2000).

V bolnišničnem okolju priporočajo vzorčenje najmanj 1000 litrov zraka (Thio in sod., 2000), v naši raziskavi je bil volumen zraka, vzorčenega v bolnišničnem okolju, 1020 litrov, v zunanjem okolju pa 420 litrov. V zunanjem okolju smo vzorčili precej manjše volumne zraka, saj smo predpostavljali, da je v zunanjem zraku koncentracija plesni precej višja kot v notranjih prostorih. Če so volumni vzorčenega zraka v okolju z višjimi koncentracijami spor preveliki, lahko to vodi v konfluentno rast organizmov na RODAC plošči z gojiščem, kar onemogoča določitev števila kolonij plesni. Uporabili smo RODAC plošče z gojišči CZA, PDA in SABA z namenom, da bi opredelili najprimernejše gojišče za osamitev plesni. S t-testom smo potrdili, da je gojišče PDA enako primerno za osamitev plesni kot SABA gojišče ( $p=0,214$ ). Kot manj primerno gojišče glede na gojišča PDA in SABA za osamitev plesni se je izkazalo gojišče CZA, na katerem smo določili nižje koncentracije plesni ter osamili manjše število vrst plesni ( $p=0,000$ ) (Preglednica 12, Slika 25).

Zrak smo vzorčili, na gradbišču nove pediatrične bolnišnice in urgentnega bloka Univerzitetnega kliničnega centra, ter v zunanjem okolju, kjer gradbena dela niso potekala,

to je pred glavnim vhodom v UKC in na vrtu Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo. Želeli smo ugotoviti v kolikšni meri gradbena dela vplivajo na koncentracijo plesni v zraku.

Domnevo, da bo koncentracija plesni najvišja na območju, kjer potekajo gradbena dela, smo potrdili, saj so bile najvišje povprečne koncentracije plesni na gradbišču nove pediatrične bolnišnice in na gradbišču urgentnega bloka Univerzitetnega kliničnega centra (Preglednici 4-5, Slike 11, 15-16). Na gradbiščih, kjer so potekala aktivna gradbena dela, je bila povprečna koncentracija plesni  $106,9 \text{ CFU/m}^3$ , koncentracije so nihale od  $61,9 \text{ CFU/m}^3$  do  $164,9 \text{ CFU/m}^3$ . V zunanjem okolju, kjer gradbena dela niso potekala, je bila povprečna koncentracija plesni  $69,81 \text{ CFU/m}^3$ , koncentracije so nihale od  $22,8$  do  $111,9 \text{ CFU/m}^3$ . Rezultati so v skladu z opisanimi v literaturi. V eni izmed raziskav so izmerili povprečno koncentracijo plesni v zunanjem okolju  $257,8 \text{ CFU/m}^3$  (Curtis in sod., 2005), kar je precej višje od meritve v naši raziskavi. Vzrok je najbrž v zimskem letnem času, saj smo vse meritve opravili pozno jeseni, pozimi in zgodaj spomladi, v študiji (Curtis in sod., 2005) pa so meritve koncentracije spor potekale čez celo leto. Statistično pomembnih razlik med zunanjim zrakom na gradbišču in v okolju brez gradbenih del nismo dokazali ( $p=0,287$ ). Vzrok za takšen rezultat je lahko več. Mesta vzorčenja zunanjega zraka brez gradbenih del so bila od gradbišč oddaljena le okoli  $800 \text{ m}$ , kar ne izključuje popolnoma vpliva gradbenih del. V literaturi navajajo, da naj bi bila ta razdalja najmanj  $1000 \text{ m}$  (Curtis in sod. 2005). Na povišano koncentracijo pa so lahko vplivali tudi velik transport osebja in obiskovalcev pred vhodom v UKC ter vpliv bližine vrtnarije s kompostom.

V bolnišničnem okolju smo zrak vzorčili na oddelkih KON, CIIM in CIT Univerzitetnega kliničnega centra (Preglednica 7-8, Slika 20). Oddelka CIT in CIIM smo obravnavali kot enoten oddelek, saj sta locirana v istem nadstropju brez vmesne pregradne stene. Za vzorčenje zraka na teh oddelkih smo se odločili zato, ker so bili na vseh treh prisotni bolniki s potrjeno invazivno pljučno aspergilozo.

Povprečna koncentracija spor plesni v bolnišničnem okolju je bila  $5,3 \text{ CFU/m}^3$ , vrednosti so nihale od  $1,0 \text{ CFU/m}^3$  do  $21,1 \text{ CFU/m}^3$  (Preglednici 4, 7, Slika 11). S t-testom smo potrdili statistično pomembne razlike med povprečno koncentracijo v bolnišničnem in zunanjem okolju ( $p=0,000$ ). Koncentracije plesni v zunanjem zraku so bile približno 14-

krat višje kot v notranjih prostorih (Preglednica 7). V raziskavi, ki je potekala dve leti, so ugotovili, da se kljub precejšnjim nihanjem koncentracij plesni v zunanjem zraku, ki so bile predvsem posledica klimatskih sprememb, razmerje med koncentracijo plesni v zunanjem in v notranjem zraku, ni bistveno spremenjalo. To govori v prid dejству, da koncentracije spor v zunanjem zraku posredno vplivajo na koncentracije v notranjih prostorih (Shelton in sod., 2002). V naši raziskavi smo vzorčenje izvajali v časovnem obdobju šestih mesecev, zato zgoraj omenjenega vpliva ne moremo potrditi.

V zunanjem zraku smo najpogosteje osamili plesni iz rodov *Aspergillus* in *Penicillium*. *Aspergillus* spp. je bil prisoten na vseh področjih vzorčenja in v najvišjih koncentracijah, kar kaže na ubikvitarnost te plesni (Preglednica 10, Slike 22-24). V literaturi navajajo, da koncentracije spor *Aspergillus* spp. v zunanjem okolju lahko močno nihajo, od 1 do 185 CFU/m<sup>3</sup> (Warris in sod., 2001, Richardson in sod., 2003). V naši raziskavi je koncentracija *Aspergillus* spp. nihala od 1,0 do 45,2 CFU/m<sup>3</sup> (Preglednica 7). Povprečne koncentracije plesni *Aspergillus* spp. so bile najvišje v zunanjem okolju na gradbišču 35,4 CFU/m<sup>3</sup>, najnižje pa v bolnišničnem okolju, 4,1 CFU/m<sup>3</sup> (Preglednica 8). S t-testom smo potrdili statistično pomembne razlike med povprečno koncentracijo spor *Aspergillus* spp. v bolnišničnem in zunanjem okolju ( $p=0,001$ ). Statistično pomembno razliko v povprečni koncentraciji med zunanjim in bolnišničnim okoljem smo potrdili tudi za vrsto *A. fumigatus* ( $p=0,004$ ).

V bolnišničnem okolju je bila najvišja koncentracija plesni v KON, kjer smo izmerili povprečno 8,3 CFU/m<sup>3</sup> (Slika 20). V času vzorčenja so bila okna v sobah odprta, kar predstavlja tudi edini način zračenja sob in vpliva na povišano koncentracijo in raznolikost plesni v sobah KON. Povprečne koncentracije plesni so bile v sobah preden smo odprli okna 5,1 CFU/m<sup>3</sup>, ob odprtih oknih pa so povprečne koncentracije v sobah narastle na 14,4 CFU/m<sup>3</sup> (Priloge A-C). Ob vzorčenju zraka v teh prostorih so potekala istočasno manjša gradbena dela na oddelku, kar je verjetno tudi vplivalo na povišano koncentracijo plesni. Na oddelku KON je bila prisotna tudi največja raznolikost plesni glede na druga dva bolnišnična oddelka. Plesni *Alternaria* spp., *Beauveria* spp., *Geotrichum* spp., *Monilia* spp. in *Trichoderma* spp. smo osamili samo iz oddelka KON. Vrsta *A. fumigatus* je bila prisotna na vseh treh oddelkih, vrsti *A. flavus* in *A. niger* pa samo na oddelku KON. S t-testom smo potrdili, da ni statistično pomembne razlike v povprečni koncentraciji plesni

med oddelki KON in CIT ( $p=0,326$ ), KON in CIIM ( $p=0,169$ ) ter CIIM in CIT ( $p=1,575$ ) (Slika 20).

Razlika v koncentracijah in vrstni raznolikosti je lahko posledica gradbenih del, ki so potekala znotraj oddelka KON ali posledica vdora plesni iz zunanjega zraka.

Najvišje koncentracije v bolnišničnem okolju so dosegale plesni iz rodov *Aspergillus*, *Monilia*, *Alternaria* in *Cladosporium* (Preglednica 5, Slika 12). Tudi v drugih raziskavah poročajo o podobnem spektru osamljenih plesni iz notranjih bolnišničnih prostorov (Shelton in sod., 2002).

V raziskavi Albertini-ja in sodelavcev (2001) so se v navadnih sobah povprečne koncentracije plesni gibale od 2,8 do 6,0 CFU/m<sup>3</sup>, kar je primerljivo z našo raziskavo, kjer je bila povprečna koncentracija 5,3 CFU/m<sup>3</sup> (1,0 do 21,1 CFU/m<sup>3</sup>) (Preglednica 7). V sobah s HEPA filtri pa poročajo o koncentracijah spor nižjih od 2 CFU/m<sup>3</sup> (Leenders in sod., 1999; Alberti in sod. 2001). Najpomembnejše plesni, ki ogrožajo imunsko oslabljene bolnike, so vrste iz rodu *Aspergillus*. Meril ali normativov za najvišje dovoljene vrednosti spor *Aspergillus* spp. v zraku ni. Priporočajo, da naj bi bila koncentracija spor v sobah, kjer so prisotni imunsko oslabljeni, obvezno manjša od 5 CFU/m<sup>3</sup> (Perdelli in sod., 2006), nekateri pa priporočajo celo koncentracijo nižjo od 1 CFU/m<sup>3</sup> (Alberti in sod., 2001), saj za okužbo imunsko oslabljenih zadošča že koncentracija 1-3 CFU/m<sup>3</sup> (Richardson in sod., 2003).

V naši raziskavi so povprečne koncentracije plesni v bolnišničnem okolju skoraj v vseh prostorih presegale 1,0 CFU/m<sup>3</sup>. Na oddelkih CIT in CIIM, ki sta intenzivni enoti Univerzitetnega kliničnega centra, se zdravijo tudi imunsko oslabljeni bolniki, bolniki po presaditvi čvrstih organov. Znano je, da se tveganje za invazivno aspergilozu pri teh bolnikih poveča, če je povprečna koncentracija spor *Aspergillus* spp. večja od 0,9 CFU/m<sup>3</sup> (Alberti in sod., 2001). Oddelek nima učinkovitega filtracijskega in prezračevalnega sistema, kar povečuje tveganje za nastanek različnih oportunističnih okužb pri bolnikih, ko so ti najbolj ogroženi. Koncentracije spor *Aspergillus* spp. so se na teh oddelkih gibale od 1,0 do 5,4 CFU/m<sup>3</sup>. Invazivna pljučna aspergiliza v prvi vrsti ogroža bolnikovo življenje. Diagnostični posotopki so težavni za bolnika, interpretacija rezultatov je zapletena, zdravljenje je dolgotrajno in drago in se v mnogih primerih konča s smrtjo. Iz vsega omenjenega je zato ključnega pomena preprečevanje možnosti nastanka okužb z

zagotavljanjem ustreznega okolja bivanja bolnikov, ko so ti najbolj ogroženi in preventivno zdravljenje z antimikotiki za skupine bolnikov za katere se je takšno zdravljenje pokazalo za smotrno.

V drugem delu diplomske naloge smo želeli ugotoviti, ali IA pri bolnikih P1, P2 in P3 izvira iz bolnišničnega okolja. V ta namen smo primerjali med sabo RAPD profile kliničnih in okoljskih izolatov. Glede na veliko genetsko raznolikost *A. fumigatus* so se razvile različne metode za natančnejšo opredelitev sevov posameznih vrst plesni ter za določitev izvora izbruhovalnih invazivnih aspergiloze (Girardin in sod., 1994; Verweij in sod., 1996; Symoens in sod., 2002; Menotti in sod., 2005; Heinemann in sod., 2004). Protokol metode RAPD je glede na podatke iz literature relativno hiter in enostaven za izvedbo, predhodno poznavanje nukleotidnega zaporedja matrične DNK ni potrebno, tehnika pa je tudi cenovno ugodna. Problem RAPD je v slabši ponovljivosti rezultatov ter v interpretaciji rezultatov. Za vsak izolat smo tako večkrat ponovili RAPD ter produkte različnih in enakih izolatov primerjali na gelu (Slike 26-31).

V bolnišničnem okolju KON smo osamili 24 izolatov plesni *A. fumigatus*. Od teh smo v sobi 1, kjer je bil hospitaliziran bolnik P1 od 17-ih izolatov z metodo RAPD opredelili kar devet različnih RAPD tipov (Preglednica 14). Na hodniku pred sobo 1 smo opredelili dva različna tipa plesni *A. fumigatus* od skupno sedmih tipov. Oba tipa sta bila prisotna tudi v sobi 1. Naši rezultati (Preglednice 14-16) potrjujejo že znano genetsko raznolikost izolatov *A. fumigatus* (Girardin in sod. 1994; Verweij in sod. 1996; Symoens in sod. 2002; Menotti in sod 2005; Heinemann in sod. 2004).

Klinični izolat plesni *A. fumigatus* bolnika iz sobe 1 KON (P1) ni bil enak nobenemu izmed devetih različnih sevov okoljskih izolatov KON (Preglednica 14, Slike 26-28). Povezanosti izolatov iz bolnišničnega okolja z bolnikovim izolatom tako nismo dokazali. Vzorčenje zraka v teh prostorih smo opravili šest dni po odvzemu kliničnega vzorca bolnika P, iz katerega smo osamili *A. fumigatus*. Rezultati ne izključujejo možnosti, da je izviral sev iz bolnišničnega okolja, vendar je prav tako tudi mogoče, da je bil bolnik s plesnijo koloniziran že pred prihodom v bolnišnico in se je ob padcu imunske odpornosti razvila klinična slika invazivne aspergiloze. Inkubacijska doba od okužbe do pojava kliničnih znakov, značilnih za aspergilozo, ni znana (Alberti in sod. 2001).

Vzorčenje zraka na CIT smo opravili devet dni po odvzemu kliničnega vzorca bolnika P3, iz katerega smo osamili *A. fumigatus* (RAPD tip-n). Na tem oddelku smo osamili le dva izolata *A. fumigatus*, izvirala sta iz pomivalnice in sta imela enak RAPD profil (g). Iz zraka v sobi, kjer je bil hospitaliziran bolnik P3 nismo osamili plesni *A. fumigatus*. Tudi v tem primeru povezanosti izolatov iz bolnišničnega okolja z bolnikovim izolatom nismo dokazali. Prav tako kot za izolat bolnika P1 tudi pri bolniku P3 ne moremo z gotovostjo izključiti možnosti, da je bil vir okužbe bolnišnično okolje. V obeh primerih smo vzorčenje opravili nekaj dni po tem, ko smo odvzeli klinične vzorce bolnikoma, iz katerih smo osamili plesen. Znano pa je, da koncentracije in s tem tudi pojavljanje različnih sevov v zraku precej nihajo zaradi različnih dejavnikov okolja in je mogoče, da so se spore *A. fumigatus* v tem obdobju posedle po površinah in jih nismo zajeli z vzorčenjem (Shelton 2002). V takšnih primerih bi bilo zato smiselno vzorčiti tudi brise površin (Heinemann in sod. 2004).

Klinični izolat *A. fumigatus* (RAPD tip-j) smo osamili iz kliničnega vzorca bolnika P2, ki je bil hospitaliziran na CIIM v sobi 2 s klinično diagnozo sepsa in astma. Vzorčenje zraka na tem oddelku smo opravili 13 dni po odvzemu kliničnega vzorca bolnika P2, iz katerega smo osamili *A. fumigatus*. Osamili smo 11 izolatov, od katerih smo z metodo RAPD opredelili tri različne tipe (g, l, m). Noben od teh ni bil identičen s tipom izolata, osamljenega pri bolniku P2. Zanimivo je, da je bil ta izolat identičen RAPD tipom izolatov *A. fumigatus* (j), ki smo jih osamili v sobi 1 (j) in na hodniku pred sobo 1 (j) KON. Po pregledu dokumentacije bolnika P2 smo ugotovili, da je bil pred prihodom v CIIM bolnik hospitaliziran v Centru za pljučne bolezni in alergijo, ki je v istem nadstropju kot KON in od tega ni ločen s pregradno steno. Vzorčenje zraka na KON pa je bilo opravljeno komaj dva dni po odvzemu kliničnega vzorca bolnika P2 iz katerega smo osamili omenjen izolat. Na osnovi opisanih ugotovitev dopuščamo možnost, da bi izvor okužbe z *A. fumigatus* pri bolniku P2, lahko bilo bolnišnično okolje.

Virulanca plesni *A. fumigatus* ni pogojena s specifičnimi virulenčnimi dejavniki. Plesen je saprofiten organizem, patogenost pa je posledica sposobnosti invazivne rasti pri temperaturi 37 °C ter predvsem gostiteljeve imunske nezmožnosti odstranitve plesni. Plesen iz kliničnega materiala nima specifičnih virulenčnih dejavnikov, kar nakazuje, da je vsak sev potencialno patogen. V literaturi priporočajo uporabo kombinacije različnih

molekularnih metod ter kombinacijo različnih začetnih oligonukleotidov za doseganje optimalne ločljivosti izolatov (Menotti in sod., 2005). Priporočajo uporabo MLP kot prve tehnike izbora, zaradi zelo dobre ločljivosti in ponovljivosti. Za dodatno potrditev dobre ločljivosti priporočajo še uporabo metode RFLP (Bart-Delabesse in sod., 2001). V naši raziskavi smo se odločili za uporabo tehnike RAPD, ki se glede na literaturo tudi najpogosteje uporablja za genotipizacijo plesni *A. fumigatus*, kljub določenim pomanjkljivostim metode. Izbrani začetni oligonukleotid R-108 se je izkazal za najboljšega med testiranimi začetnimi oligonukleotidi, saj so z R-108 opredelili največ različnih sevov (Raclavsky in sod., 2006). V naši raziskavi smo pri vsakem bolniku primerjali po en klinični izolat z okoljskimi izolati. Bolnik je lahko okužen ali koloniziran tudi z več sevi plesni *A. fumigatus*, kar je pogosto zlasti pri bolnikih s cistično fibrozo (Mellado in sod., 2000; Debeaupuis in sod., 1997).

Za natančnejšo opredelitev sevov in primerjavo z okoljskimi izolati bi bilo potrebno torej uporabljati še druge genotipizacijske metode in natančneje opredeliti genetske raznolikosti kliničnih izolatov.

## 6 SKLEPI

- Povprečna koncentracija plesni v bolnišničnem okolju je bila statistično pomembno nižja ( $5,3 \text{ CFU/m}^3$ ) od povprečne koncentracije plesni v zunanjem okolju ( $88,4 \text{ CFU/m}^3$ ). Med povprečno koncentracijo plesni v zunanjem zraku, kjer so potekala gradbena dela ( $106,9 \text{ CFU/m}^3$ ) in zunanjim zrakom brez gradbenih del ( $69,8 \text{ CFU/m}^3$ ) ni bilo statistično pomembnih razlik.
- V bolnišničnem okolju ni statistično pomembne razlike v povprečni koncentraciji plesni med oddelki KON in CIT ( $p=0,326$ ), KON in CIIM ( $p=0,169$ ) ter CIIM in CIT ( $p=1,575$ ).
- V bolnišničnem okolju so bile določene najvišje koncentracije plesni iz rodov *Aspergillus*, *Alternaria* in *Monilia*, v zunanjem okolju pa za plesni iz rodov *Aspergillus* in *Penicillium*.
- V rodu *Aspergillus* so prevladovale vrste *A. fumigatus*, *A. niger* in *A. flavus*.
- Gojišči SABA in PDA sta za osamitev plesni primernejši od gojišča CZA.
- Metoda RAPD je primera za genotipizacijo plesni *A. fumigatus*.
- Z genotipizacijsko metodo RAPD smo dokazali identičnost kliničnega izolata plesni *A. fumigatus*, osamljenega pri bolniku P2, s šestimi izolati iz bolnišničnega okolja.

## 7 POVZETEK

*A. fumigatus* je saprofitna, ubikitarna plesen, ki povzroča širok spekter bolezenskih stanj, ki jih skupno imenujemo aspergiloze. Aspergiloza je vzrok za visoko stopnjo smrtnosti pri imunsko oslabljenih osebah. Zdravljenje je dolgotrajno in pogosto neučinkovito, zato je ključnega pomena preprečevanje okužb. Bolniki se lahko okužijo z vdihovanjem spor plesni, kar nakazuje, da je ključni dejavnik za razvoj invazivne aspergiloze kot eksogeno pridobljene okužbe bolnikovo okolje.

Za vzorčenje zraka so na voljo različni vzorčevalniki, med katerimi se je na osnovi kliničnih in laboratorijskih podatkov kot najbolj ustrezen izkazal SAS vzorčevalnik, katerega smo uporabili v naši raziskavi.

Zrak smo vzorčili od oktobra 2007 do marca 2008 na KON, CIIM in CIT Univerzitetnega kliničnega centra, na gradbenem področju nove pediatrične bolnišnice in urgentnega bloka Univerzitetnega kliničnega centra ter v zunanjem okolju, kjer gradbena dela niso potekala.

V zunanjem okolju smo vzorčili 420 litrov zraka, v bolnišničnem pa 1020 litrov, saj smo predpostavljali, da bo koncentracija plesni v bolnišnici bistveno nižja od zunanje koncentracije plesni.

Primerjali smo gojišča SABA, PDA in CZA. Kot najprimernejši gojišči za osamitev plesni iz vzorčenega zraka sta se izkazali SABA in PDA, pri uporabi gojišča CZA smo določili nižje koncentracije ter manjšo raznolikost plesni.

V diplomske nalogi smo želeli potrditi domnevo, da je najvišja koncentracija plesni v zunanjem zraku, kjer potekajo gradbena dela in najnižja koncentracija v zraku bolnišničnega okolja, kjer naj bi bile koncentracije plesni minimalne. Domnevo smo potrdili, saj so bile koncentracije na gradbiščih najvišje, nižje v zunanjem zraku kjer gradbena dela niso potekala ter najnižje v bolnišničnem okolju.

V bolnišničnem okolju so povprečne koncentracije plesni nihale od od 1,0 CFU/m<sup>3</sup> do 21,1 CFU/m<sup>3</sup>, v zunanjem zraku brez gradbenih del so koncentracije nihale od 22,8 do 111,9

CFU/m<sup>3</sup>, v zunanjem zraku, kjer so potekala gradbena dela pa od 61,9 CFU/m<sup>3</sup> do 164,9 CFU/m<sup>3</sup>. Za statistično analizo podatkov smo uporabili t-test. Potrdili smo, da so med zrakom v bolnišničnem okolju ter med zrakom v zunanjem okolju statistično pomembne razlike v povprečni koncentraciji plesni ( $p=0,000$ ). V bolnišničnem okolju so bile najvišje povprečne koncentracije plesni na KON. Na oddelkih CIT in CIIM veljajo strožji higienski ukrepi, na KON pa so v času vzorčenja zraka potekala manjša gradbena dela, kar je najverjetnejše vplivalo na razlike v povprečni koncentraciji plesni med oddelki. S t-testom smo potrdili da ni statistično pomembne razlike v povprečni koncentraciji plesni med oddelki KON in CIT ( $p=0,326$ ), KON in CIIM ( $p=0,169$ ) ter CIIM in CIT ( $p=1,575$ ). Noben izmed oddelkov tudi ne izpolnjuje zahtev za »varno okolje«, ki ga priporoča CDC (angl. Centers for Disease Control and Prevention) za preprečevanje invazivne aspergiloze pri imunsko ogroženih bolnikih (CDC, 1997). Koncentracije so v veliki večini vzorčenj zraka presegale priporočene vrednosti 1 CFU/m<sup>3</sup>. V bolnišničnem okolju so se v najvišjih koncentracijah pojavljale plesni iz rodov *Aspergillus*, *Alternaria* in *Monillia*, v zunanjem okolju pa plesni iz rodov *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Penicillium* in *Cladosporium*. Iz rodu *Aspergillus* so prevladovale vrste *A. fumigatus*, *A. niger* in *A. flavus*.

V drugem delu naloge smo želeli z genotipizacijsko metodo RAPD natančneje opredeliti izolate *A. fumigatus* osamljene iz kliničnih vzorcev bolnikov z invazivno aspergilozo in izolate *A. fumigatus* iz bolnišničnega okolja. Potrdili smo, da obstaja v okolju velika genetska raznolikost izolatov *A. fumigatus*. Med štiridesetimi osamljenimi izolati *A. fumigatus* iz okolja smo opredelili trinajst različnih RAPD tipov. Z metodo RAPD smo dokazali identičnost kliničnega izolata *A. fumigatus*, osamljenega iz respiratornega vzorca bolnika z invazivno aspergilozo z izolati iz bolnišničnega okolja. Dobljeni rezultati ne izključujejo možnosti, da je bilo v tem primeru vir okužbe lahko bolnišnično okolje.

V bolnišničnem okolju, kjer se zdravijo bolniki, ki imajo veliko tveganje za nastanek invazivne aspergiloze, bi bilo potrebno urediti takšno okolje, ki bi jim zagotavljalo večjo varnost pred okužbami. Priporočila CDC opredeljujejo »varno okolje«, ki vključuje filtracijo zraka z uporabo HEPA filtrov, vzdrževanje direktnega toka zraka in pozitivnega sobnega zračnega pritiska glede na hodnik pred sobo bolnika, dobro zatesnitev sob in visoko stopnjo izmenjave sobnega zraka. Vzorčenje zraka naj se izvaja za nadzor higienskih ukrepov v bolnišničnih prostorih in v primeru pojava izbruhotov aspergilofov z

namenom ugotovitve vira okužbe. Priporočajo, da bi morali za natančnejšo opredelitev kliničnih izolatov in primerjavo z okoljskimi izolati uporabljati več genotipacijskih metod hkrati in natančneje opredeliti genetske raznolikosti vseh osamljenih kliničnih izolatov.

## 8 VIRI

- Alberti C., Bouakline A., Ribaud P., Lacroix C., Rousselot P., Leblanc T., Derouin F. 2001. Relationship between environmental fungal contamination and the incidence of invasive aspergillosis in haematology patients. *Journal of Hospital Infections*, 48:198-206
- Allo M.D., Miller J., Townsend T., Tan C. 1987. Primary cutaneous aspergillosis associated with Hickman intravenous catheters. *New England Journal of Medicine*, 317, 18:1105-1108
- Anaissie E.J., Costa S.F. 2001. Nosocomial aspergillosis is waterborne. *Clinical Infectious Diseases*, 33, 9:1546-1548
- Anaissie E.J., Stratton S.L., Dignani M.C., Lee C.K., Mahfouz T.H., Rex J.H., Summerbell R.C., Walsh T.J. 2002. Cleaning patient shower facilities: a novel approach to reducing patient exposure to aerosolized *Aspergillus* species and other opportunistic molds. *Clinical Infectious Diseases*, 35, 8: 86-88
- Anaissie E.J., Stratton S.L., Dignani M.C., Summerbell R.C., Rex J.H., Monson T.P., Spencer T., Kasai M., Francesconi A., Walsh T.J. 2002. Pathogenic *Aspergillus* species recovered from a hospital water system: a 3-year prospective study. *Clinical Infectious Diseases*, 34, 6:780-789
- Anaissie E.J., Stratton S.L., Dignani M.C. 2003. Pathogenic molds (including *Aspergillus* species) in hospital water distribution systems: A 3-year prospective study and clinical implications for patients with hematologic malignancies. *Blood*, 101, 7: 2542-2546
- Aufauvre-Brown A., Cohen J., Holden D.W. 1992. Use of randomly amplified polymorphic DNA markers to distinguish isolates of *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 30, 11: 2991-2993

Barnes A.J. 2000. Prevention of nosocomial aspergillosis. Leeds, St James's University Hospital

<http://www.aspergillus.org.uk/secure/articles/webbarnes.htm> (12.11.2007): 7 str.

Bart-Delabesse E., Sarfati J., Debeaupuis J.P., Leeuwen W., Belkum A., Bretagne S., Latgé J.P. 2001. Comparison of restriction fragment length polymorphism, microsatellite length polymorphism, and random amplification of polymorphic DNA analyses for fingerprinting *Aspergillus fumigatus* isolates. Journal of Clinical Microbiology, 39, 7: 2683–2686

Bart-Delabesse E., Humbert J., Delabesse E., Bretagne S. 1998. Microsatellite markers for typing *Aspergillus fumigatus* isolates. Journal of Clinical Microbiology, 36, 9: 2413–2418

Bertout S., Renaud F., Barton R., Symoens F., Burnod J., Piens M.A., Lebeau B., Viviani M.A., Chapuis F., Bastide J.M., Grillot R., Mallie M. 2001. Genetic polymorphism of *Aspergillus fumigatus* in clinical samples from patients with invasive aspergillosis: investigation using multiple typing methods. Journal of Clinical Microbiology, 39, 5: 1731–1737

Bertout S., Renaud F., De Meeus T., Piens M.A., Lebeau B., Viviani M.A., Mallie M., Bastide J.M. 2000. Multilocus enzyme electrophoresis analysis of *Aspergillus fumigatus* strains isolated from the first clinical sample from patient with invasive aspergillosis. Journal of Medical Microbiology, 49: 375-381

Bouchara J.P., Sanchez M., Esnault K., Tronchin G. 1999. Interactions between *Aspergillus fumigatus* and host matrix proteins V: *Aspergillus fumigatus* biology, clinical aspects and molecular approaches to pathogenicity. Brakhage A.A., Jahn B., Schmidt A. (eds.). Basel, Karger: 167-181

Brakhage A.A., Langfelder K., Wanner G., Schmidt A., Jahn B. 1999. Pigment biosynthesis and virulence. V: *Aspergillus fumigatus* biology, clinical aspects and molecular approaches to pathogenicity. Brakhage A.A., Jahn B., Schmidt A. (eds.). Basel, Karger: 205-215

Burwen D.R., Lasker B.A., Rao N., Durry E., Padhye A.A., Jarvis W.R. 2001. Invasive aspergillosis outbreak on a hematology-oncology ward. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 22, 1:45-48

CDC. 1997. Guidelines for prevention of nosocomial pneumonia, Morbidity & Mortality Weekly Report. Atlanta, CDC-Centers for Disease Control and Prevention

<http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/00045365.htm> (13.02.2008): 79 str.

Chazalet V., Debeaupuis J.P., Sarfati J., Lortholary J., Ribaud P., Shah P., Cornet M., Thien H.V., Gluckman E., Brücker G., Latgé J.P. 1998. Molecular typing of environmental and patient isolates of *Aspergillus fumigatus* from various hospital settings. *Journal of Clinical Microbiology*, 36, 6: 1494–1500

Cooper E.E., O'Reilly M.A., Dharmage S.C. 2003. Influence of building construction work on *Aspergillus* infection in a hospital setting. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 24, 7: 472-476

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

Debeaupuis J.P., Sarfati J., Chazalet V., Latgé J.P. 1997. Genetic diversity among clinical and environmental isolates of *Aspergillus fumigatus*. *Infection and Immunity*, 65, 8: 3080-3085

De Lucca A. 2007. Harmful fungi in both agriculture and medicine. *Revista Iberoamericana de Micología*, 24: 3-13

Delabesse E.B., Humbert J.F., Delabesse E., Bretagne S. 1998. Microsatellite markers for typing *Aspergillus fumigatus* isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 36, 9: 2413–2418

Denning D.W. 2000. *Aspergillus* species V: Douglas and Bennett's principles and practice of infectious diseases. Mandell G.L., Bennett J.E., Dolin R. (eds.). Philadelphia, Churchill Livingstone: 2674-2685

- Fritsch P., Rieseberg L.H. 1996. The use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in conservation genetics. V: Molecular genetic approaches in conservation. Smith T.B., Wayne R.K. (eds.). Oxford, Oxford University Press: 54-73
- Gittleman L.K., Shetty A.K., Prober C.G. 1999. Posttraumatic invasive *Aspergillus fumigatus* wound infection. Pediatric Infectious Disease Journal, 18:745-747
- Girardin H., Sarfati J., Traore F., Dupouy Camet J., Derouin F., Latgé J.P. 1994. Molecular epidemiology of nosocomial invasive aspergillosis. Journal of Clinical Microbiology, 32, 3: 684-690
- Hedayati M.T., Pasqualotto A.C., Warn P.A., Bowyer P., Denning D.W. 2007. *Aspergillus flavus*: human pathogen, allergen and mycotoxin producer. Microbiology, 153, 6: 1677-1692
- Heinemann S., Symoens F., Gordts B., Jannes H., Nolard N. 2004. Environmental investigations and molecular typing of *Aspergillus flavus* during an outbreak of postoperative infections. Journal of Hospital Infections, 57: 149-155
- Horiuchi H., Takagi M. 1999. Chitin syntase genes of *Aspergillus* species. V: *Aspergillus fumigatus* biology, clinical aspects and molecular approaches to pathogenicity. Brakhage A.A., Jahn B., Schmidt A. (eds.). Basel, Karger: 193-204
- Humphreys H. 2004. Positive-pressure isolation and the prevention of invasive aspergillosis. What is the evidence? Journal of Hospital Infections, 56: 93-1000
- Jakše J. 2006. Rastlinska biotehnologija: vaje 2006/2007. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo
- [http://www.genetika.si/slike/vsebina/File/Rastlinska%20B/Vaje/Vaja4/vaja4\\_PCR\\_tekst.pdf](http://www.genetika.si/slike/vsebina/File/Rastlinska%20B/Vaje/Vaja4/vaja4_PCR_tekst.pdf) (05. maj 2008): 19 str.
- Jug T. 2002. Genetska raznolikost soške postrvi (*Salmo marmoratus*) v Sloveniji. Magistrsko delo. Ljubljana, Medicinska fakulteta: 94 str.

- Kappe R., Rimek D. 1999. Laboratory diagnosis of *Aspergillus fumigatus*-associated diseases V: *Aspergillus fumigatus* biology, clinical aspects and molecular approaches to pathogenicity. Brakhage A.A., Jahn B., Schmidt A. (eds.). Basel, Karger: 88-104
- Kontoyiannis D.P, Bodey GP. 2002. Invasive aspergillosis in 2002: an update. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 21, 3:161-72
- Košmelj K. 2001. Uporabna statistika. Ljubljana, Biotehniška fakulteta Univerze v Ljubljani: 249 str.
- Lasker B.A. 2002. Evaluation of performance of four genotypic methods for studying the genetic epidemiology of *Aspergillus fumigatus* isolates. Journal of Clinical Microbiology, 40, 8:2886-2892
- Latgé J.P. 1999. *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis. Clinical Microbiology Reviews, 12, 2: 310–350
- Latgé J.P., 2001. The pathobiology of *Aspergillus fumigatus*. Trends in Microbiology, 9, 8: 382-389
- Leenders A.C., van Belkum A., Behrendt M., Luijendijk A., Verbrugh H.A. 1999. Density and molecular epidemiology of *Aspergillus* in air and relationship to outbreaks of *Aspergillus* infection. Journal of Clinical Microbiology, 37, 6: 1752–1757
- Leenders A., van Belkum A., Janssen S., de Marie S., Kluytmans J., Wielenga J., Löwenberg B., Verbrugh H. 1996. Molecular epidemiology of apparent outbreak of invasive aspergillosis in a hematology ward. Journal of Clinical Microbiology, 34, 2: 345-351
- Lin D., Lehmann P.F., Hamory B.H., Padhye A.A., Durry E., Pinner R.W., Lasker B.A. 1995. Comparison of three typing methods for clinical and environmental isolates of *Aspergillus fumigatus*. Journal of Clinical Microbiology, 33, 6: 1596–1601
- Loudon K.W., Burnie J.P., Coke A.P., Matihews R.C. 1993. Application of polymerase chain reaction to fingerprinting *Aspergillus fumigatus* by random amplification of polymorphic DNA. Journal of Clinical Microbiology, 31, 5: 1117-1121

- Lutz B.D., Jin J., Rinaldi M.G., Wickes B.L., Huycke M.M. 2003. Outbreak of invasive *Aspergillus* infection in surgical patients, associated with a contaminated air-handling system. Clinical Infectious Diseases, 37, 6:786–793
- Mackenzie D.W.R. 1987. *Aspergillus* in man. V: Proceedings of the Second International Symposium on Topics in Mycology. VandenBossche H., Mackenzie D.W.R. (eds.). Antwerp, University of Antwerp:1-8
- Marr K.A., Carter R.A., Boeckh M. 2002. Invasive aspergillosis in allogeneic stem cell transplant recipients: Changes in epidemiology and risk factors. Blood, 100, 13: 4358-4366
- Matos T. 2002. Oportunistične glive. V: Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo. Gubina M., Ihan A. (ur.). Ljubljana: Medicinski razgledi: 481-499
- Mellado E., Diaz-Guerra T.M., Cuenca-Estrella M., Buendia V., Aspa J., Prieto E., Villagrasa J.R., Rodriguez-Tudela J.L. 2000. Characterization of a possible nosocomial aspergillosis outbreak. Journal of Clinical Microbiology, 6, 10: 543-548
- Menotti J., Waller J., Meunier O., Letscher-Bru V., Herbrecht R., Candolfi E. 2005. Epidemiological study of invasive pulmonary aspergillosis in a haematology unit by molecular typing of environmental and patient isolates of *Aspergillus fumigatus*. Journal of Hospital Infections, 60, 1: 60-68
- Monod M., Jatonogay K., Reichard U. 1999. *Aspergillus fumigatus*-secreted proteases as antigenic molecules and virulence factors V: *Aspergillus fumigatus* biology, clinical aspects and molecular approaches to pathogenicity. Brakhage A.A., Jahn B., Schmidt A. (eds.). Basel, Karger: 182-192
- Morris G., Kokki M.H., Anderson K., Richardson M.D. 2000. Sampling of *Aspergillus* spores in air. Journal of Hospital Infections, 44, 2: 81-92
- Nevalainen A., Pasanen A.L., Miininen M., Reponen T., Kalliokoski P., Jantunen M.J. 1991. The indoor air quality in Finnish homes with mold problems. Environment International, 17, 4: 299-302

Nierman W.C., Pain A., Anderson M.J., Wortman J.R., Kim H.S., Arroyo J., Berriman M., Abe K., Archer D.B., Bermejo C., Bennett J., Bowyer P., Chen D., Collins M., Coulsen R., Davies R., Dyer P.S., Farman M., Fedorova N., Fedorova N., Feldblyum T.V., Fischer R., Fosker N., Fraser A., García J.L., García M.J., Goble A., Goldman G.H., Gomi K., Griffith-Jones S., Gwilliam R., Haas B., Haas H., Harris D., Horiuchi H., Huang J., Humphray S., Jiménez J., Keller N., Khouri H., Kitamoto K., Kobayashi T., Konzack S., Kulkarni R., Kumagai T., Lafon A., Latgé J.P., Li W., Lord A., Lu C., Majoros W.H., May G.S., Miller B.L., Mohamoud Y., Molina M., Monod M., Mouyna I., Mulligan S., Murphy L., O'Neil S., Paulsen I., Peñalva M.A., Pertea M., Price C., Pritchard B.L., Quail M.A., Rabbinowitsch E., Rawlins N., Rajandream M.A., Reichard U., Renauld H., Robson G.D., Rodriguez de Córdoba S., Rodríguez-Peña J.M., Ronning C.M., Rutter S., Salzberg S.L., Sanchez M., Sánchez-Ferrero J.C., Saunders D., Seeger K., Squares R., Squares S., Takeuchi M., Tekiaia F., Turner G., Vazquez de Aldana C.R., Weidman J., White O., Woodward J., Yu J.H., Fraser C., Galagan J.E., Asai K., Machida M., Hall N., Barrell B., Denning D.W. 2005. Genomic sequence of the pathogenic and allergenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. Nature, 438, 22: 1151-1156

Ocvirk R. 2005. Spore *Aspergillus* spp. v zraku Kliničnega oddelka za hematologijo Kliničnega centra v Ljubljani. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije: 38 str.

Olive D.M., Bean P. 1999. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. Journal of Clinical Microbiology, 37, 6: 1661-1669

Panackal A.A., Dahlman A., Keil K.T., Peterson C.L., Mascola L., Mirza S., Phelan M., Lasker B.A., Brandt M.E., Carpenter J., Bell M., Warnock D.W., Hajjeh R.A., Morgan J. 2002. Outbreak of invasive aspergillosis among renal transplant recipients. Transplantation, 75, 7:1050-1053

Paris S., Debeaupuis J.P., Crameri R., Carey M., Charlés F., Prévost M.C., Schmitt C., Philippe B., Latgé J.P. 2003. Conidial hydrophobins of *Aspergillus fumigatus*. Applied and Environmental Microbiology, 69, 3: 1581–1588

- Patterson T.F. 2005. *Aspergillus* species. Edinburgh, Elsevier/Churchill Livingstone  
[http://www.mdconsult.com/das/book/body/124137634-2/0/1259/2063.html?tocnode=51383728&fromURL=2063.html#4-u1.0-B0-443-06643-4..50259-2\\_8124](http://www.mdconsult.com/das/book/body/124137634-2/0/1259/2063.html?tocnode=51383728&fromURL=2063.html#4-u1.0-B0-443-06643-4..50259-2_8124) (18.9.2008): 22 str.
- Patterson J.E., Peters J., Calhoon J.H. 2000. Investigation and control of aspergillosis and other filamentous fungal infections in solid organ transplant recipients. *Transplant Infectious Disease*, 2:22-28
- Pegues D.A., Lasker B.A., McNeil M.M., Hamm P.M., Lundal J.L., Kubak B.M. 2002. Cluster of cases of invasive aspergillosis in a transplant intensive care unit: evidence of person-to-person airborne transmission. *Clinical Infectious Diseases*, 34, 3:412-416
- Perdelli F., Cristina M.L., Sartini M., Spagnolo A.M., Dallera M., Ottria G., Lombardi R., Grimaldi M., Orlando P. 2006. Fungal contamination in hospital environments. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 27, 1:44-47
- Pitt J. 1994. The current role of *Aspergillus* and *Penicillium* in human and animal health. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, 32, Suppl 1: S17-S21
- Raclavsky V., Trtkova J., Ruskova L., Buchta V., Bolehovska R., Vackova M., Hamal P. 2006. Primer R-108 performs best in the RAPD strain typing of three *Aspergillus* species frequently isolated from patients. *Folia Microbiologica*, 51, 2: 136-140
- Rementeria A., López-Molina N., Ludwig A., Vivanco A.B., Bikandi J., Pontón J., Garaizar J. 2005. Genes and molecules involved in *Aspergillus fumigatus* virulence. *Revista Iberoamericana de Micología*, 22, 1: 1-23
- Rhodes J.C. 2006. *Aspergillus fumigatus*: Growth and virulence. *Medical Mycology*, 44 Suppl 1: S77-S81
- Richardson M., Ylikoski J., Meri T. 2003. The effective prevention of systemic fungal infection: precluding the risk of environmental exposure. Helsinki, MoBiAir diagnostic <http://www.mobiair.info> (25.02.2008): 5 str.

- Rivera A., Hohl T., Pamer E.G. 2006. Immune responses to *Aspergillus fumigatus* Infections. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 12, 1:47-49
- Rodriguez E., De Meeus T., Mallie M., Renaud F., Symoens F., Mondon P., Piens M.A. Lebeau B., Viviani M.A., Grillot R., Nolard N., Chapuis F., Tortorano A.M., Bastide J.M. 1996. Multicentric epidemiological study of *Aspergillus fumigatus* isolates by multilocus enzyme electrophoresis. *Journal of Clinical Microbiology*, 34, 10: 2559–2568
- Rüchel R., Reichard U. 1999. Pathogenesis and clinical presentation of aspergillosis. V: *Aspergillus fumigatus* biology, clinical aspects and molecular approaches to pathogenicity. Brakhage A.A., Jahn B., Schmidt A. (eds). Basel, Karger: 21-43
- Samson R.A., Hong S., Peterson S.W., Frisvad J.C., Varga J. 2007. Polyphasic taxonomy of *Aspergillus* section *Fumigati* and its teleomorph *Neosartorya*. *Studies in Mycology* 59, 1: 147–203
- Schaffner A., Douglas H., Braude A. 1982. Selective protection against conidia by mononuclear and against mycelia by polymorphonuclear phagocytes in resistance to *Aspergillus*. Observations on these two lines of defense in vivo and in vitro with human and mouse phagocytes. *Journal of Clinical Microbiology*, 69: 617-631
- Schmidt A., Schmidt D.I. 1999. Fresenius and the description of the species *Aspergillus fumigatus*. V: *Aspergillus fumigatus* biology, clinical aspects and molecular approaches to pathogenicity. Brakhage A.A., Jahn B., Schmidt A. (eds.). Basel, Karger: 1-4
- Shelton B.G., Kirkland K.H., Flanders W.D., Morris G.K. 2002. Profiles of airborne fungi in buildings and outdoor environments in the United States. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 4: 1743–1753
- Singh J. 2005. Toxic moulds and indoor air quality. *Indoor and Built Environment*, 14, 3-4: 229-234
- Singh A., Goering R.V., Simjee S., Foley S.L., Zervos M. 2006. Application of molecular techniques to the study of hospital infection. *Clinical Microbiology Reviews*, 19, 3: 512-530

- Soll D.R., Lockhart S.R., Pujol C. 2007. Laboratory procedures for the epidemiological analysis of microorganisms. V: Manual of clinical microbiology. Murray P.R., Baron E.J., Pfaller M.H., Jorgensen J.H., Landry M.L. (eds). Washington, ASM Press: 129-152
- Soubani A. O., Chandrasekar P.H. 2002. The clinical spectrum of pulmonary Aspergillosis. *Chest*, 121, 6:1988-1999
- Soubani A.O., Qureshi M.A. 2002. Invasive pulmonary aspergillosis following bone marrow transplantation: risk factors and diagnostic aspect. *Haematologia*, 32, 4: 427-437
- Summerbell R. 2003. *Ascomycetes. Aspergillus, Fusarium, Sporothrix, Piedraia, and Their Relatives*. V: Pathogenic fungi in humans and animals. Howard D.H. (ed.). New York, Marcel Dekker: 237-498
- Symoens F., Burnod J., Lebeau B., Viviani M.A., Piens M.A., Tortorano A.M., Nolard N., Chapuis F., Grillot R. 2002. Hospital-acquired *Aspergillus fumigatus* infection: can molecular typing methods identify an environmental source? *Journal of Hospital Infections*, 52, 1:60-67
- Tekaia F., Latgé J.P. 2005. *Aspergillus fumigatus*: saprophyte or pathogen? *Current Opinion in Microbiology*, 8, 4: 385–392
- Thio C.L., Smith D., Merz W.G., Streifel A.J., Bova G., Gay L., Miller C.B., Perl T.M. 2000. Refinements of environmental assessment during an outbreak investigation of invasive aspergillosis in a leukemia and bone marrow transplant unit. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 21, 1:28-23
- Valk H.A., Meis J.F.G.M., de Pauw B.E., Donnelly P.J., Klaassen C.H.W. 2007. Comparison of two highly discriminatory molecular fingerprinting assays for analysis of multiple *Aspergillus fumigatus* isolates from patients with invasive aspergillosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 45, 5: 1415–1419

- Vandewoude K.H., Blot S.I., Depuydt P., Benoit D., Temmerman W., Colardyn F., Vogelaers D. 2006. Clinical relevance of *Aspergillus* isolation from respiratory tract samples in critically ill patients. Critical Care 10, 1: 1-10
- Varga J. 2006. Molecular typing of *aspergilli*: Recent developments and outcomes. Medical Mycology, 44, Suppl 1: S49-S61
- Verweij P.E., Meis J.F., Sarfati J., Hoogkamp-Korstanje J.A., Latgé J.P., Melchers W.J. 1996. Genotypic characterization of sequential *Aspergillus fumigatus* isolates from patients with cystic fibrosis. Journal of Clinical Microbiology, 34, 10: 2595-2597
- Vonberg R.P., Gastmeier P. 2006. Nosocomial aspergillosis in outbreak settings. Journal of Hospital Infections, 63, 3: 246-254
- Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., van de Lee T., Hornes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Research, 23, 21:4407-4414
- Voss A., Abrahamsen T.G., Verweij P.E. 2002. Contamination of hospital water with *Aspergillus fumigatus* and other molds. Clinical Infectious Diseases, 34, 8: 1159-1160
- Vozelj M. 2000. Zorenje, aktivacija in diferenciacija limfocitov T. V: Temelji imunologije. Železnik T. (ur.). Ljubljana, Državna založba Slovenije: 213-238
- Wald A., Leisenring W., van Burik J.A., Bowden R.A. 1997. Epidemiology of *Aspergillus* infections in a large cohort of patients undergoing bone marrow transplantation. Clinical Infectious Diseases, 175, 6: 1459-1466
- Walsh T.J. 1998. Primary cutaneous aspergillosis—An emerging infection among immunocompromised patients. Clinical Infectious Diseases, 27, 3: 453-457
- Warris A., Klaassen C.H.W., Meis J.F.G.M., de Ruiter M.T., de Valk H.A., Abrahamsen T.G., Gaustad P., Verweij P.E. 2003. Molecular epidemiology of *Aspergillus fumigatus* isolates recovered from water, air, and patients shows two clusters of genetically distinct strains. Journal of Clinical Microbiology, 41, 9: 4101-4106

Warris A., Verweij P.E. 2005. Clinical implications of environmental sources for *Aspergillus*. Medical Mycology, 43, Suppl 1: S59-S65

Warris A., Voss A., Verweij P.E. 2001. Hospital sources of *Aspergillus* species: New routes of transmissions? Revista Iberoamericana de Micología, 18, 4: 156-162

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

## ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. Katji Seme, dr. med., za sprejeto mentorstvo

Zahvaljujem se somentorici dr. Tadeji Matos, dr. med., ker si je vedno vzela čas za moja vprašanja ter mi svetovala in pomagala pri izdelavi diplomske naloge

Iskrena hvala tudi prof. dr. Evi Ružić-Sabljić , dr. med., za recenzijo diplomskega dela ter vse koristne napotke

Zahvala je namenjena tudi sodelavkam v Laboratoriju za diagnostiko glivičnih infekcij na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo v Ljubljani za prijazen sprejem medse ter za vso potrpežljivost pri mojem uvajanju v delo v laboratoriju

Posebno zahvalo namenjam mikrobiologinji Evi Sodja za vse nasvete in pomoč pri izvedbi praktičnega dela diplomske naloge

Najlepša hvala tudi staršem in sestri za vsestransko podporo in zaupanje ter vsem prijateljem in kolegom za vzpodbudo in moralno podporo v času študija

## PRILOGE

Priloga A: Koncentracija različnih vrst plesni (CFU/m<sup>3</sup>) v zraku v Kliničnem oddelku za nefrologijo,  
Ljubljana, dne 12.10.2007

Vrsta plesni	Soba 1		Soba 1-ob odprttem oknu		Hodnik pred sobo 1	
	SABA	CZA	SABA	CZA	SABA	CZA
<i>Alternaria alternata</i>	0	0	0.98	3.92	0	0
<i>Aspergillus fumigatus</i>	3.92	0.98	9.8	1.96	4.9	1.96
<i>Aspergillus niger</i>	0	0.98	0	0.98	0	0.98
<i>Aspergillus</i> spp.	0	0.98	0	1.96	0	0
<i>Penicillium</i> spp.	0	1.96	0	0	2.94	0.98

Priloga B: Koncentracija različnih vrst plesni (CFU/m<sup>3</sup>) v Kliničnem oddelku za nefrologijo, Ljubljana, dne  
12.10.2007

Vrsta plesni	Soba 2-kopalnica		Soba 2-ob odprttem oknu		Hodnik pred sobo 2		Soba 2	
	SABA	CZA	SABA	CZA	SABA	CZA	SABA	CZA
<i>Alternaria</i> spp.	0	0.98	1.96	12.75	0	0	0	0
<i>Aspergillus fumigatus</i>	3.92	0.98	2.94	0	1.96	0	0.98	1.96
<i>Aspergillus nidulans</i>	0	0	0	0	0.98	0	0	0
<i>Aspergillus niger</i>	0.98	6.86	6.86	0	6.86	4.91	0	1.96
<i>Aspergillus</i> spp.	0	0	0	0	0	0	0	0.98
<i>Aureobasidium pullullulans</i>	0	0.98	0	0	0	0	0	0
<i>Beauveria</i> spp.	0	0	0	0	0	0	0	0.98
<i>Fusarium</i> spp.	0	0	0	0	0.98	0	0	0
<i>Geotrichum candidum</i>	0	0	0.98	0.98	0	0	0	0
<i>Monilia</i> spp.	0	0	0	0	0	4.91	0	0
<i>Penicillium</i> spp.	0	0	0.98	0	0	0	0.98	1.96
<i>Trichoderma</i> spp.	0	0	0.98	0	0	0	0	0

Priloga C: Koncentracija različnih vrst plesni (CFU/m<sup>3</sup>) v Kliničnem oddelku za nefrologijo, Ljubljana, dne  
12.10.2007

Vrsta plesni	Soba 3		Soba 3-ob odprttem oknu		Hodnik pred sobo 3		Prostor za pripravo infuzij	
	SABA	CZA	SABA	CZA	SABA	CZA	SABA	CZA
<i>Acremonium</i> spp.	0	0	0.98	0	0	0	0	0
<i>Alternaria alternata</i>	0	0	5.88	3.92	0	0	0	0
<i>Aspergillus flavus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0.98
<i>Aspergillus nidulans</i>	0	0	0	1.96	0	0	0	0
<i>Aspergillus</i> spp.	0	0	0	0	0	0	2.94	0
<i>Geotrichum candidum</i>	0	0	0	0	0	0.98	0	0
<i>Mycelia Sterilia</i>	0	0	2.94	0	0	0	0	0
<i>Penicillium</i> spp.	0	0	0	0	0	0.98	0	0
<i>Paecilomyces</i> spp.	0	0	0	0	0	0	0.98	0
<i>Trichoderma</i> spp.	1.96	0	0	0	0	0	0	0

Priloga D: Koncentracija različnih vrst plesni (CFU/m<sup>3</sup>) v Kliničnem oddelku za intenzivno interno medicino, Ljubljana, dne 24.10.2007

Vrsta plesni	Soba 1		Soba 2		Hodnik	
	SABA	CZA	SABA	CZA	SABA	CZA
<i>Aspergillus fumigatus</i>	3.92	6.86	0	0	0	0
<i>Aureobasidium pullullulans</i>	0	0	0	1.96	0	0
<i>Paecilomyces</i> spp.	0	0	0.98	0	0	0
<i>Penicillium</i> spp.	0	0	1.96	2.94	0.98	0

Priloga E: Koncentracija različnih vrst plesni (CFU/m<sup>3</sup>) v Kliničnem oddelku za anesteziologijo in intenzivno terapijo operativnih strok, Ljubljana, dne 24.10.2007

Vrsta plesni	Soba 3		Soba 4		Pomivalnica	
	SABA	CZA	SABA	CZA	SABA	CZA
<i>Acremonium</i> spp.	0	1.96	0	0	0	0
<i>Aspergillus fumigatus</i>	0	0	0.98	0	0	1.96
<i>Aspergillus nidulans</i>	0	0.98	0	1.96	0	0
<i>Aureobasidium pullulans</i>	0	0	0	0.98	0	0
<i>Cladosporium</i> spp.	0	1.96	0	0	0	0
<i>Fusarium</i> spp.	0	0.98	0	0	0	0
<i>Mycelia Sterilia</i>	0	0.98	0	0	0	0
<i>Penicillium</i> spp.	0	0.98	0	0	0	0

## Priloga F: Koncentracija različnih vrst plesni ( $\text{CFU}/\text{m}^3$ ) v zraku zunanjega okolja na področju brez gradbenih del

Vrsta plesni	24.10.2008		4.1.2008		4.3.2008		10.3.2008		31.3.2008	
	SABA	CZA	CZA	PDA	SABA	PDA	SABA	PDA	SABA	PDA
<i>Acremonium</i> spp.	0	1.96	0	0	14.29	0	0	0	0	2.38
<i>Alternaria</i> spp.	0	0.98	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Aspergillus flavus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	23.81	9.52
<i>Aspergillus fumigatus</i>	5.88	0	0	11.9	7.14	4.76	0	0	2.38	2.38
<i>Aspergillus nidulans</i>	0	0	0	0	2.38	16.67	4.76	0	0	0
<i>Aspergillus terreus</i>	0	0	0	0	0	9.52	0	0	0	0
<i>Aureobasidium pullulans</i>	0	0.98	0	0	0	0	4.76	0	0	0
<i>Cladosporium</i> spp.	0	1.96	0	0	0	0	0	23.81	2.38	0
<i>Geotrichum</i> spp.	0	1.96	0	0	19.05	14.29	9.52	0	0	0
<i>Mycelia Sterilia</i>	0	1.96	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Paecilomyces</i> spp.	0	0	0	0	0	11.9	21.43	7.14	14.29	2.38
<i>Penicillium</i> spp.	0	7.14	21.43	33.34	26.29	14.29	64.29	21.43	23.81	28.57
<i>Trichoderma</i> spp.	0	0	0	0	0	16.67	0	0	0	0
<i>Trichophyton</i> spp.	0	0	0	0	0	0	11.9	0	2.38	2.38
<i>Verticillium</i> spp.	0	0	0	0	0	0	0	0	7.14	11.9

Priloga G: Koncentracija različnih vrst plesni (CFU/m<sup>3</sup>) na področju kjer so potekala gradbena dela

Vrsta plesni	12.12.2008		12.12.2007		4.1.2008		4.1.2008		4.3.2008	
	SABA	PDA	SABA	PDA	CZA	PDA	CZA	PDA	SABA	PDA
<i>Alternaria</i> spp.	2.38	45.24	0	0	11.9	0	2.38	0	16.67	0
<i>Aspergillus fumigatus</i>	30.95	33.33	45.24	42.86	0	0	0	0	0	38.1
<i>Aspergillus niger</i>	61.94	0	0	0	0	50	0	0	0	28.57
<i>Aspergillus versicolor</i>	0	0	0	0	0	0	2.38	0	0	0
<i>Cladosporium</i> spp.	92.86	26.19	28.57	0	2.38	0	0	0	0	23.81
<i>Geotrichum</i> spp.	0	0	2.38	0	0	0	2.38	7.14	0	0
<i>Paecilomyces</i> spp.	0	0	16.67	2.38	0	0	0	0	2.38	0
<i>Penicillium</i> spp.	21.43	14.29	40.48	50	35.71	0	16.67	11.9	19.05	2.38
<i>Stachybotrys</i> spp.	0	0	4.76	0	0	0	0	0	0	0

Priloga H: Koncentracija različnih vrst plesni (CFU/m<sup>3</sup>) v zraku zunanjega okolja na področju kjer so  
potekala gradbena dela

Vrsta plesni	4.3.2008		10.3.2007		10.3.2008		31.3.2008		31.3.2008	
	SABA	PDA	SABA	PDA	SABA	PDA	SABA	PDA	SABA	PDA
<i>Acremonium</i> spp.	0	0	0	14.29	0	0	0	0	0	0
<i>Alternaria</i> spp.	0	0	0	0	0	2.38	9.52	2.38	0	0
<i>Aspergillus flavus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	21.43	2.38
<i>Aspergillus fumigatus</i>	19.05	28.57	0	42.86	16.67	33.33	0	0	14.29	0
<i>Aspergillus niger</i>	0	0	0	0	2.38	0	0	0	0	0
<i>Aureobasidium pullulans</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	2.38	19.05
<i>Cladosporium</i> spp.	16.67	2.38	26.19	40.68	28.57	2.38	23.81	0	23.81	2.38
<i>Chrysonilla</i> spp.	0	0	2.38	2.38	0	0	0	0	0	0
<i>Geotrichum</i> spp.	4.76	0	0	2.38	0	26.19	0	0	0	7.14
<i>Madurella</i> spp.	0	0	0	4.76	0	0	0	0	0	0
<i>Paecilomyces</i> spp.	0	0	7.14	4.76	9.52	2.38	14.29	2.38	0	14.29
<i>Penicillium</i> spp.	26.19	14.29	45.24	0	45.24	40.48	30.95	2.38	28.57	7.14
<i>Trichoderma</i> spp.	19.05	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Trichophyton</i> spp.	0	0	0	0	0	0	0	2.38	0	0

