

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

**Mitja Rot**

**OBČUTLJIVOST IZOLATOV GLIV KVASOVK ZA ANTIMIKOTIKE  
OSAMLJENIH IZ NADZORNIH KUŽNIN V OBDOBJU 1992-2005**

**DIPLOMSKO DELO**  
Univerzitetni študij

**SENSITIVITY OF YEASTS FOR ANTIMICOTICS ISOLATED FROM  
CONTROL SPECIMENS IN YEARS 1992-2005**

**GRADUATION THESIS**  
University studies

Ljubljana, 2007

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

Študijska komisija dodiplomskega študija mikrobiologije je za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Katjo Seme, dr. med., za somentorico asist. dr. Tadejo Matos, dr. med. in za recenzenta prof. dr. Peter Rasporja, univ. dipl. ing.

Mentorica: prof. dr. Katja Seme  
Somentorica: asist. dr. Tadeja Matos  
Recenzent: prof. dr. Peter Raspor

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Darja ŽGUR-BERTOK, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo  
Članica: prof. dr. Katja SEME, Medicinska fakulteta  
Članica: asist. dr. Tadeja MATOS, Medicinska fakulteta  
Član: prof. dr. Peter RASPOR, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Mitja Rot

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- DK UDK 579.24:615.28 (043)=863
- KG *C. albicans*/*C. glabrata*/občutljivost kvasovk/Etest/antimikotiki/flukonazol/  
ittrakonazol/vorikonazol/amfotericin B
- AV ROT, Mitja
- SA SEME, Katja (mentorica)/MATOS, Tadeja (somentorica)/RASPOR, Peter  
(recenzent)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija  
mikrobiologije
- LI 2007
- IN OBČUTLJIVOST IZOLATOV GLIV KVASOVK ZA ANTIMIKOTIKE  
OSAMLJENIH IZ NADZORNIH KUŽNIN V OBDOBJU 1992 – 2005
- TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
- OP XII, 56 str., 15 pregl., 21 sl., 1 pril., 70 vir.
- IJ sl
- JI sl/en

AI Kvasovke rodu *Candida* so med najpogostejšimi povzročitelji oportunističnih okužb. Med njimi prevladuje *Candida albicans*, sledita ji *Candida glabrata* in *Candida parapsilosis*. V zadnjih desetletjih narašča incidenca glivičnih okužb, z njimi pa tudi poraba protiglivnih zdravil. V naši raziskovalni nalogi smo primerjali občutljivosti izolatov kvasovk *C. albicans* in *C. glabrata* iz obdobj 1992-1996 in 2003-2005. Namen je bil ugotoviti, ali se je občutljivost kvasovk spremenila zaradi povečane uporabe antimikotikov. Vsi izolati kvasovk, vključenih v raziskavo so bili osamljeni iz nadzornih kužnin bolnikov, hospitaliziranih na kliničnem oddelku za hematologijo Kliničnega centra v Ljubljani (KOHKC). Podatke o profilaktičnem antimikotičnem zdravljenju smo dobili iz arhiva KOHKC v Ljubljani. Pri vseh izolatih kvasovk smo testirali občutljivost na antimikotike z metodo difuzije antimikotičnega gradienta (Etest) in za vsak izolat posebej določili minimalno inhibitorno koncentracijo (MIK). Testirali smo občutljivost izolatov kvasovk za flukonazol, vorikonazol, ittrakonazol in amfotericin B. Za statistično primerjavo MIK iz obeh obdobj, smo uporabili Mann - Whitney U test. Statistična primerjava MIK je pokazala, da je bila občutljivost kvasovk za antimikotike, v splošnem manjša v obdobju 1992-1996, kot v obdobju 2003-2005. Pri *C. albicans* so bile MIK vseh antimikotikov višje v obdobju 1992-1996. Pri *C. glabrati*, smo ugotovili razlike v MIK ittrakonazola in vorikonazola. MIK ittrakonazola so bile višje v obdobju 1992-1996, MIK vorikonazola pa so bile višje v obdobju 2003-2005. Statistično pomembnih razlik MIK flukonazola in amfotericina B med obdobjema nismo ugotovili. Ugotavljali smo tudi morebitni vpliv profilaktičnega zdravljenja na MIK antimikotikov. Pri *C. albicans* smo vpliv profilaktičnega zdravljenja dokazali pri flukonazolu in amfotericinu B, medtem ko zaradi majhnega števila izolatov *C. glabrata*, vpliva nismo uspeli zanesljivo potrditi. Z rezultati naloge smo ovrgli hipotezo, o zmanjšanju občutljivosti kvasovk za antimikotike, zaradi povečane uporabe antimikotikov v zadnjih desetletjih.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

- DK UDC 579.24:615.28 (043)=863
- CX *C. albicans/C. glabrata*/sensitivity of yeasts/Etest/antimicotics/fluconazole/  
itraconazole/voriconazole/amphotericin B
- AU ROT, Mitja
- AA SEME, Katja (supervisor)/MATOS, Tadeja (co-advisor)/RASPOR, Peter  
(reviewer)
- PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in  
Microbiology
- PY 2007
- TI SENSITIVITY OF YEASTS FOR ANTIMICOTICS ISOLATED FROM  
CONTROL SPECIMENS IN YEARS 1992-2005
- DT Graduation thesis (University studies)
- NO XII, 56 p., 15 tab., 21 fig., 1 ann., 70 ref.
- LA sl
- AL sl/en

**AB** Yeasts of the genus *Candida* are among the most causative agents of opportunistic infections. The most important frequent is *Candida albicans*, followed by *Candida glabrata* and *Candida parapsilosis*. In last decades, the increased incidence of fungal infections led to increased consumption of antifungal agents. Our study compared the sensitivity of *C. albicans* and *C. glabrata* isolated in two time periods 1992-1996 and 2003-2005. The aim of our study was to determine, whether the sensitivity of yeasts changed due to increased consumption of antifungal agents. All isolates were isolated from control specimens of patients, hospitalized in the Department of hematology, Clinical Center Ljubljana (DHCC). The data about antifungal prophylactic treatment were obtained from archives of DHCC Ljubljana. In all yeast isolates minimal inhibitory concentrations (MIC) of fluconazole, voriconazole, itraconazole and amphotericin B were determined using Etest. Mann-Whitney's U test was used for statistical analysis. Statistical comparison generally indicated lower antifungal drug sensitivity of yeasts in years 1992-1996, in comparison to the period 2003-2005. MICs of all tested antifungal agents in *C. albicans* isolates were higher in years 1992-1996. Differences in MICs of itraconazole and voriconazole were observed in *C. glabrata* isolates. MICs of itraconazole were higher in years 1992-1996 and MICs of voriconazole were higher in years 2003-2005. However, no statistically significant differences in MICs of fluconazole and amphotericin B were observed. We have also studied the influence of antifungal prophylactic therapy on MICs of antifungal agents. For *C. albicans* the influence was shown for fluconazole and amphotericin B, while we could not show any influence for *C. glabrata*, most probably due to low number of isolates. According to the results of our study, the hypothesis about decreased sensitivity of yeasts due to increased consumption of antifungal agents in last decades was rejected.

## KAZALO VSEBINE

Ključna dokumentacijska informacija	III
Key words documentation	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VII
Kazalo slik	VIII
Kazalo prilog	IX
Kazalo okrajšav	X
<b>1 UVOD</b>	1
1.1 NAMEN DELA	1
1.2 DELOVNA HIPOTEZA	2
<b>2 PREGLED OBJAV</b>	3
2.1 GLAVNE LASTNOSTI IN KLASIFIKACIJA KVASOVK RODU <i>CANDIDA</i>	3
2.2 VIRULENCA RODU <i>CANDIDA</i>	4
2.3 INCIDENCA IN EPIDEMIOLOGIJA KANDIDOZ	7
2.4 DEJAVNIKI TVEGANJA ZA NASTANEK KANDIDOZ	7
2.5 OKUŽBE KI JIH POVZROČAJO VRSTE IZ RODU <i>CANDIDA</i>	8
<b>2.5.1 Povrhnja kandidoza</b>	8
<b>2.5.2 Kronična mukokutana kandidoza</b>	9
<b>2.5.3 Sistemska kandidoza</b>	9
2.6 ZDRAVLJENJE IN PREPREČEVANJE KANDIDOZ	9
<b>2.6.1 Antimikotiki</b>	10
2.6.1.1 Mehanizem delovanja azolov	11
2.6.1.2 Mehanizem delovanja polienov	11
2.6.1.3 Mehanizem odpornosti gliv proti azolom	11
2.6.1.4 Mehanizem odpornosti gliv proti polienom	12
<b>2.6.2 Metode za testiranje občutljivosti gliv na antimikotike</b>	12

2.6.2.1 Metoda difuzije antimikotičnega gradienta (E-test)	13
<b>3 MATERIAL IN METODE</b>	17
3.1 ZBIRANJE IZOLATOV <i>C. ALBICANS</i> IN <i>C. GLABRATA</i>	17
3.1.1 Opis pridobivanja sevov iz stalnih gojišč	17
3.1.2 Identifikacija in potrditev izolatov	18
3.2 TESTIRANJE OBČUTLJIVOSTI	19
3.2.1 Izvedba Etesta	19
3.2.2 Odčitavanje MIK	19
3.3 ZBIRANJE PODATKOV	20
3.4 STATISTIČNA ANALIZA	21
<b>4 REZULTATI</b>	23
4.1 PRIDOBIVANJE KVASOVK IZ OBDOBJA 1992-1996 IZ STALNIH GOJIŠČ	23
4.2 PRIMERJAVA MIK IZOLATOV <i>C. ALBICANS</i> IN <i>C. GLABRATA</i> OSAMLJENIH V OBDOBJIH 1992-1996 IN 2003-2005	24
4.3 STATISTIČNA PRIMERJAVA MIK, Z UPOŠTEVANJEM PROFILAKTIČNEGA ZDRAVLJENJA	33
<b>5 RAZPRAVA IN SKLEPI</b>	41
5.1 RAZPRAVA	41
5.1.1 Pridobivanje izolatov kvasovk iz stalnih gojišč	42
5.1.2 Primerjava občutljivosti izolatov <i>C. albicans</i> in <i>C. glabrata</i> osamljenih v obdobjih 1992-1996 in 2003-2005	43
5.1.3 Vpliv profilaktičnega zdravljenja na občutljivost gliv kvasovk za antimikotike	44
5.2 SKLEPI	46
<b>6 POVZETEK</b>	47
<b>7 VIRI</b>	48
<b>8 ZAHVALA</b>	
<b>9 PRILOGE</b>	

## KAZALO PREGLEDNIC

<b>Preglednica 1:</b> Mejne vrednosti minimalnih inhibicij (MIK) za posamezne antimikotike (CLSI M27-A)	13
<b>Preglednica 2:</b> Koncentracijska območja gradienta antimikotikov na Etestu	16
<b>Preglednica 3:</b> Interpretacijski kriteriji CLSI za opredeljevanje občutljivosti gliv kvasovk za antimikotike	20
<b>Preglednica 4:</b> Preživelost izolatov kvasovk <i>C. albicans</i> in <i>C. glabrata</i> iz obdobja 1992-1996	24
<b>Preglednica 5:</b> Število izolatov <i>C. albicans</i> izoliranih iz posameznih nadzornih kužnin za obdobji 1992-1996 in 2003-2005	24
<b>Preglednica 6:</b> Število izolatov <i>C. glabrata</i> izoliranih iz nadzornih kužnin za obdobji 1992-1996 in 2003-2005	25
<b>Preglednica 7:</b> Vrsta in trajanje profilaktičnega zdravljenja pri bolnikih	25
<b>Preglednica 8:</b> Število vseh izolatov <i>C. albicans</i> in <i>C. glabrata</i> iz obdobji 1992-1996 in 2003-2005	23
<b>Preglednica 9:</b> Statistična primerjava MIK testiranih antimikotikov pri izolatih <i>C. albicans</i> iz obdobji 1992-1996 in 2003-2005	24
<b>Preglednica 10:</b> Razporeditev izolatov <i>C. albicans</i> glede na občutljivostna območja za antimikotike določena po CLSI standardih za obdobji 1992-1996 in 2003-2005	27
<b>Preglednica 11:</b> Statistična primerjava MIK testiranih antimikotikov pri izolatih <i>C. glabrata</i> iz obdobji 1992-1996 in 2003-2005	27
<b>Preglednica 12:</b> Razporeditev izolatov <i>C. glabrata</i> glede na občutljivostna območja za antimikotike določena po CLSI standardih za obdobji 1992-1996 in 2003-2005	30
<b>Preglednica 13:</b> Primerjava MIK testiranih antimikotikov pri izolatih <i>C. albicans</i> osamljenih pri bolnikih z in brez profilaktičnega zdravljenja	31
<b>Preglednica 14:</b> Primerjava MIK testiranih antimikotikov pri izolatih <i>C. glabrata</i> osamljenih pri bolnikih, z in brez profilaktičnega zdravljenja	37

**Preglednica 15:** Primerjava MIK testiranih antimikotikov pri izolatih *C. albicans*,  
osamljenih pri bolnikih, ki niso prejeli profilaktičnega zdravljenja  
za obdobji 1992-1996 in 2003-2005

40



## KAZALO SLIK

<b>Slika 1:</b> Etest: Umerjena lestvica vrednosti koncentracij antimikotika ( $\mu\text{g/ml}$ ) in dvočrkovna kratica antimikotika na traku Etesta (Etest, 2006)	15
<b>Slika 2:</b> Odčitavanje MIK pri azolih. MIK se odčita tam, kjer je rast 80 % zavrta ( $0,75\mu\text{g/ml}$ ) (Etest, 2006)	15
<b>Slika 3:</b> Odčitavanje MIK pri amfotericinu B. MIK se odčita tam, kjer je rast 100 % zavrta ( $48\mu\text{g/ml}$ ) (Etest, 2006)	15
<b>Slika 4:</b> Načini polaganja Etesta(ov) na RPMI gojišče v petrijevki (Etest, 2006)	19
<b>Slika 5:</b> Shematski prikaz dela	22
<b>Slika 6:</b> Porazdelitev MIK med izolati kvasovke <i>C. albicans</i> v obdobju 1992-2005 za antimikotik flukonazol	27
<b>Slika 7:</b> Porazdelitev MIK med izolati kvasovke <i>C. albicans</i> v obdobju 1992-2005 za antimikotik vorikonazol	
<b>Slika 8:</b> Porazdelitev MIK med izolati kvasovke <i>C. albicans</i> v obdobju 1992-2005 za antimikotik itrakonazol	28
<b>Slika 9:</b> Porazdelitev MIK med izolati kvasovke <i>C. albicans</i> v obdobju 1992-2005 za antimikotik amfotericin B	28
<b>Slika 10:</b> Porazdelitev MIK med izolati kvasovke <i>C. glabrata</i> v obdobju 1992-2005 za antimikotik flukonazol	30
<b>Slika 11:</b> Porazdelitev MIK med izolati kvasovke <i>C. glabrata</i> v obdobju 1992-2005 za antimikotik vorikonazol	31
<b>Slika 12:</b> Porazdelitev MIK med izolati kvasovke <i>C. glabrata</i> v obdobju 1992-2005 za antimikotik itrakonazol	31
<b>Slika 13:</b> Porazdelitev MIK med izolati kvasovke <i>C. glabrata</i> v obdobju 1992-2005 za antimikotik amfotericin B	32
<b>Slika 14:</b> Porazdelitev MIK med izolati kvasovke <i>C. albicans</i> z in brez vpliva profilaktičnega zdravljenja za antimikotik flukonazol	35
<b>Slika 15:</b> Porazdelitev MIK med izolati kvasovke <i>C. albicans</i> z in brez vpliva profilaktičnega zdravljenja za antimikotik vorikonazol	35
<b>Slika 16:</b> Porazdelitev MIK med izolati kvasovke <i>C. albicans</i> z in brez vpliva profilaktičnega zdravljenja za antimikotik itrakonazol	36

<b>Slika 17:</b> Porazdelitev MIK med izolati kvasovke <i>C. albicans</i> z in brez vpliva profilaktičnega zdravljenja za antimikotik amfotericin B	36
<b>Slika 18:</b> Porazdelitev MIK med izolati kvasovke <i>C. glabrata</i> z in brez vpliva profilaktičnega zdravljenja za antimikotik flukonazol	38
<b>Slika 19:</b> Porazdelitev MIK med izolati kvasovke <i>C. glabrata</i> z in brez vpliva profilaktičnega zdravljenja za antimikotik vorikonazol	38
<b>Slika 20:</b> Porazdelitev MIK med izolati kvasovke <i>C. glabrata</i> z in brez vpliva profilaktičnega zdravljenja za antimikotik itrakonazol	39
<b>Slika 21:</b> Porazdelitev MIK med izolati kvasovke <i>C. glabrata</i> z in brez vpliva profilaktičnega zdravljenja za antimikotik amfotericin B	39

## KAZALO PRILOG

<b>Priloga A:</b> Recepture gojišč uporabljenih v diplomski nalogi	57
--	----

## KAZALO OKRAJŠAV

**CH:** Kromogeno gojišče

**CLSI:** Clinical and Laboratory Standards Institute

**DHCC:** Department of hematology, Clinical Center Ljubljana

**KOHKC:** Klinični oddelek za hematologijo kliničnega centra

**KRA:** Koruzni agar

**MF:** Major faciliators

**MIK:** Minimalna inhibitorna koncentracija

**SABA:** Sabouraud - dekstrozni agar

## 1 UVOD

Glive kvasovke so preprosti evkarionti, ki jih uvrščamo v samostojno kraljestvo. So enocelični, heterotrofni organizmi, ki se prehranjujejo z absorpcijo organskih snovi iz okolice. Pri človeku, so poleg bakterij, del normalne flore kože, sluznic ustne votline, žrela in prebavnih poti. Do naselitve teh področij pride že ob rojstvu, ali kmalu po njem. Za človeka so pomembne kot oportunistični patogeni. Najpogostejši povzročitelji oportunističnih glivičnih okužb so kvasovke iz rodu *Candida*. Med njimi prevladuje vrsta *Candida albicans*, sledijo *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* in *Candida tropicalis*. Ob motenem ravnovesju z drugimi mikroorganizmi normalne flore in ob zmanjšani imunski sposobnosti se čezmerno namnožijo in povzročijo znake površinskega vnetja, ali se hematogeno razširijo in povzročijo sistemsko okužbo (Matos, 2002).

Fiziološko normalen in nepoškodovan epitelij kože in sluznic dobro varuje pred vdorom kvasovk v telo. V primeru poškodbe epitelija, njegove modifikacije zaradi hormonskih sprememb, lahko pride do invazije v globlje plasti in krvožilni sistem.

Okužbe, ki jih povzročajo glive iz rodu *Candida* imenujemo kandidoze. Lahko so omejene na kožo in podkožje, ali sistemske s prizadetostjo več organov in organskih sistemov. Klinični potek sistemskih okužb je večinoma težak, izid pa je kljub intenzivnemu antimikotičnemu zdravljenju pogosto smrten. Znani so številni dejavniki tveganja za nastanek oportunističnih glivičnih okužb. Najpomembnejši med njimi so nevtropenija, zdravljenje z visokimi odmerki kortikosteroidov in dolgotrajno antibiotično zdravljenje. Pogosteje zbolevalo bolniki po presaditvi organov in krvotvornih matičnih celic, bolniki na peritonealni dializi in tisti, ki prejemajo parenteralno prehrano (Matos, 2002). Kandidozo zdravimo lokalno ali sistemsko.

Zaradi razširjene uporabe antimikotikov se v zadnjih desetletjih pojavlja med povzročitelji okužb večji delež vrst kvasovk z zmanjšano občutljivostjo na protiglivična zdravila. Med njimi so najpomembnejše *C. glabrata* in *Candida krusei* (Matos, 2002).

### 1.1 NAMEN DELA:

Namen diplomske naloge je bil ugotoviti, ali je v obdobjih 1992-1996 in 2003-2005 ob različnih shemah profilaktičnega zdravljenja, prišlo do sprememb v občutljivosti izolatov

kvasovk *C. albicans* in *C. glabrata* za flukonazol, itrakonazol, amfotericin B in vorikonazol.

## 1.2 DELOVNA HIPOTEZA:

Pričakujemo, da se je minimalna inhibitorna koncentracija testiranih antimikotikov pri izolatih kvasovk *C. albicans* in *C. glabrata* povečala, zaradi povečane uporabe antimikotikov.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 GLAVNE LASTNOSTI IN IN KLASIFIKACIJA KVASOVK RODU *CANDIDA*

Glive so edinstvena skupina mikroorganizmov, ki se med seboj razlikujejo po obnašanju in celični organizaciji. Z odkritjem elektronske mikroskopije se je začelo natančnejše prepoznavanje celične organizacije mikroorganizmov, kar je privedlo do ločevanja med prokarionti in evkarionti. Leta 1969 je Whittaker glive uvrstil v samostojno kraljestvo in jih ločil od ostalih evkariontskih organizmov (Whittaker, 1969). Njegove ugotovitve so privedle do spoznanja, da so se glive razvile polifiletično, kar pomeni, da izhajajo iz večih prednikov (Deacon, 1997). Večina gliv je obligatnih ali fakultativnih aerobov. So kemotrofne, izločajo encime, ki razgrajujejo organske substrate v topne produkte. Ti se nato s pasivnim transportom prenesejo v celico (Jawetz in sod., 1989).

Za človeka so pomembne kvasovke iz rodu *Candida*, predvsem zaradi oportunističnih okužb, ki jih povzročajo (Epstein in sod., 1986; Pomerantz in sod., 1992).

Med pomembnejšimi značilnostmi rodu *Candida* je njegova ubikvitarnost (Odds, 1988). Rod spada v razred *Fungi imperfecti*, red *Moniliales* in družino *Cryptococcaceae* (Fidel, 1999; Sinnott in sod., 1987). Vse vrste razen *C. glabrata* tvorijo pseudohife. Najbolj pogosto jih izoliramo iz ustne votline. Najdemo jih pri približno 31 do 55 % zdravih posameznikov (Odds, 1988). Med različnimi vrstami, prevladuje *Candida albicans*, ki predstavlja 70 do 80 % izolatov iz kužnin bolnikov, sledita ji *C. glabrata* in *C. tropicalis*, kjer vsaka predstavlja 5 - 8 % izolatov. Ostale vrste se pojavljajo redkeje (Banerjee in sod., 1991; Beck-Sague in sod., 1993).

*C. albicans* na gojišču po Sabouraud-u (SABA) pri temperaturi 37 °C v 48 do 72 urah zraste v obliki kremno belih, voščenih kolonij premera 1 do 2 mm. Tvorijo jih ovalne brsteče celice imenovane blastospore, s premerom od 4 do 7 µm. Mikroskopske morfološke značilnosti opazujemo na koruznem agarju (KRA) s svetlobnim mikroskopom. Na tem gojišču zrastejo po 24 - 48 urni inkubaciji na vrhu pseudohif, za *C. albicans* značilne večje celice, obdane z debelejšo celično steno, ki jih imenujemo terminalne klamidospore. Mestoma se ob pseudohifah kopičijo gruče blastospor (Matos, 2002). *C. albicans* je dobro občutljiva na vse klinično uporabne antimikotike.

*C. glabrata* ne tvori pseudohif, zato so jo sprva uvrščali v rod *Torulopsis*. V letu 1978, so ugotovili, da produkcija psevdohif ni zanesljiv razločevalni faktor in so jo na osnovi raziskav genoma umestili v rod *Candida* (The Fungi, 2005). *C. glabrata* spada med monomorfne kvasovke, ki obstajajo samo v obliki majhnih blastokonidijev. Njihova velikost znaša od 1 do 4  $\mu\text{m}$  in so manjše od blastospor *C. albicans*. Na SABA tvori svetleče, gladke, krem kolonije, ki jih ne moremo razlikovati od kolonij ostalih vrst kandid. Za ločevanje različnih vrst kandid so na voljo številna selektivna in diferencialna mikološka gojišča, ki omogočajo boljšo rast gliv in hkrati ločevanje določenih vrst gliv v skladu z njihovimi biokemičnimi reakcijami. Eno izmed trenutno široko uporabljenih diferencialnih gojišč je kromogeno gojišče, imenovano CHROMagar (CHROMagar Company, Paris, France). Uporablja se za osamitev in identifikacijo klinično pomembnih kvasovk. Po 48 urni inkubaciji pri 30 oz. 37°C na osnovi barvnih reakcij omogoča identifikacijo *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei*. Na tem gojišču se kolonije *C. albicans* obarvajo zeleno, *C. glabrata* roza do škrlatno, *C. tropicalis* modro-vijolično in *C. krusei* svetlo rožnato. Ugotovili so, da je gojišče CHROMagar 100% občutljivo in 100% specifično za osamitev in identifikacijo *C. albicans*. Po 48 urni inkubaciji lahko z gotovostjo brez dodatnih biokemičnih in drugih identifikacijskih testov potrdimo, da je zelena kolonija *C. albicans* (Odds in Bernaerts, 1994).

*C. glabrata* je naravno slabše občutljiva za flukonazol in amfotericin B kot večina drugih vrst kandid (Pappas in sod., 2004; Pfaller in sod., 2002; Pfaller in sod., 2004a). Pozornost zbuja predvsem zaradi zmožnosti hitrega razvoja pridobljene odpornosti na azole in nekatere druge antimikotike (Borst in sod., 2005). Sposobna je razviti navzkrižno rezistence na druge antimikotike. Na flukonazol odporni izolati, ponavadi izražajo navzkrižno odpornost na ostale azole, kot so vorikonazol, ravukonazol, in posakonazol (Pfaller in sod., 2004b).

## 2.2 VIRULENCA RODU *CANDIDA*

O virulenci rodu *Candida* je malo znanega (Fidel in sod., 1999). Najbolj proučevana je *C. albicans*. Znani virulenčni dejavniki pri *C. albicans* so sposobnost pritrjevanja na epitelijske in endotelijske celice, tvorba proteinaz (Cassone in sod., 1987; Ross in sod.,



1990) in fosfolipaz (Barret-Bee in sod., 1985; Ibrahim in sod., 1995), tvorba hif in pseudohif (Odds, 1988; Sobel in sod., 1984) ter fenotipsko preklapljanje (Soll, 1992).

Adherenca na gostiteljske celice je izredno pomemben virulenčni dejavnik na začetku okužbe. Glivne celice lahko adherirajo tudi na površine medicinskih pripomočkov, kjer tvorijo biofilme. Preko žilnih katetrov lahko vstopijo v krvožilni sistem in povzročijo kandidemijo (Chandra in sod., 2001, Hawser in sod., 1994). Adherenca je povezana s celično površinsko hidrofobnostjo, ki je odvisna od okoljskih dejavnikov. Ta lahko vpliva na specifično adherenco, ki temelji na interakciji adhezinskih receptorjev. Prisotnost fibronektinskih in lamininskih receptorjev, fibrinogen-vezavnih proteinov in manoproteinov, igra prav tako pomembno vlogo pri adheziji na endotelijske in epiteljske celice (Hostetter in sod., 1994). Pri *in vitro* poskusih adherence na endotelijske celice so ugotovili, da ima največjo adherenco *C. albicans*, sledita ji *C. krusei* in *C. tropicalis*, najmanjšo adherenco imajo *C. parapsilosis*, *C. krusei* in *C. glabrata* (Klotz in sod., 1983). Tvorba proteinaz je povezana z patogenostjo (Cassone in sod., 1987; Ross in sod., 1990). Virulentni izolati *C. albicans* producirajo aspartil proteinaze, ki so sposobne razgradnje številnih humanih beljakovin, kot so albumin, hemoglobin, keratin in sekretorni imunoglobulin A (Hube in sod., 1998). Proteolitična aktivnost teh proteinaz je povezana tudi z invazijo tkiv. Proteinaze so odkrili tudi pri *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *Candida lusitanae*, *C. krusei* in *Candida guilliermondii* (Calderone in sod., 2001; Haynes in sod., 2001), njihova vloga pa še ni docela pojasnjena.

Naslednji pomemben virulenčni dejavnik so ekstracelularne fosfolipaze (Barret-Bee in sod., 1985; Ibrahim in sod., 1995). Njihova vloga je hidroliza ene ali več esterskih vezi glicerofosfolipidov. Glede na sposobnost cepitve različnih in specifičnih esterskih vezi, jih delimo v skupine A, B, C, D (Mukherjee in sod., 2002). Največjo aktivnost v rodu *Candida* ima fosfolipaza B, ki ima tako hidrolazno, kot lizofosfolipazno – transacilazno aktivnost (Mukherjee in sod., 2002). Pri sevih *C. albicans* izoliranih iz krvi so ugotovili večjo produkcijo fosfolipaz, kot pri komenzalnih sevih. Na živalskem modelu je dokazano, da so celice kvasovk, ki proizvedejo manj fosfolipaz, manj virulentne in obratno, kar dodatno kaže na povezanost fosfolipaz in virulence. Fosfolipazna aktivnost je poleg rodu *Candida* poznana tudi pri ostalih glivah, kot so *Cryptococcus neoformans* in *Aspergillus fumigatus* (Mukherjee in sod., 2002; Chen in sod., 1997; Birch in sod., 1996).

Pomembno vlogo pri virulenci igra tudi sposobnost preklapljanja iz kvasne v hifno obliko in obratno. S pomočjo živalskih modelov je dokazano, da represija gena, ki omogoča prekop v hifno obliko, zmanjša virulenco *C. albicans*. Mnoga odkritja namigujejo tudi, da so penetracije vitalnih organov in razmnoževanja v njih, zmožni samo sevi, ki imajo kvasno in hifno obliko (Yang, 2003)

Fenotipsko preklapljanje je še ena značilnost *C. albicans* in *C. glabrata*. Kvasovki sta sposobni preklapljati med različnimi fenotipi kolonij, ki so lahko gladke, grobe, zvezdaste, nepravilno nagubane in vlaknate. Osnovni mehanizem in povezava fenotipskega preklapljanja z virulenco nista še docela pojasnjena. Gladke, bele kolonije, ki vsebujejo celice okroglih, jajčastih oblike, lahko preklopijo fenotip tako, da tvorijo ploske sive kolonije, vsebujoč neprosojne, fižolasto oblikovane celice. Slednje imajo večjo zmožnost kolonizacije kože in večjo frekvenco parjenja, kot bele celice (Miller in sod., 2002; Soll, 1997). Zanimivo pri tem pa je, da so se neprosojne celice v sistemskih živalskih modelih izkazale za manj virulentne, kot bele (Kvaal in sod., 1999).

### 2.3 INCIDENCA IN EPIDEMIOLOGIJA KANDIDOZ

Kandidoze so okužbe, ki jih povzročajo glive iz rodu *Candida*. Incidenca teh najpogostejših oportunističnih glivičnih okužb v zadnjih desetletjih narašča. To je predvsem posledica razvoja medicinske znanosti in tehnološkega napredka, ki omogočata ohranitev življenja večjemu številu kritično bolnih, kar vodi do naraščajočega števila bolnikov s povečanim tveganjem za nastanek oportunističnih okužb. Sem sodijo bolniki po transplantaciji krvotvornih matičnih celic in solidnih organov, bolniki po obsežnih kirurških posegih, bolniki z AIDS-om, bolniki z rakom, bolniki na imunosupresivnem zdravljenju, starostniki in nedonošenčki.

Identificiranih je več kot 17 različnih vrst iz rodu *Candida*, ki lahko povzročajo sistemske okužbe, med njimi samo štiri vrste, *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* in *C. tropicalis*, predstavljajo okoli 95 % povzročiteljev (Hajjeh in sod., 2004; Ostrosky in sod., 2003; Pfaller in Diekema, 2004). Preostalih 5 % okužb povzročajo *C. lusitaniae*, *C. krusei*, *C. guilliermondii*, *Candida dubliniensis* in *Candida rugosa*.

Preventivno zdravljenje s flukonazolom učinkovito zmanjša kolonizacijo in posledično verjetnost nastanka glivične okužbe pri bolnikih po presaditvi krvotvornih matičnih celic, jeter in pri bolnikih po obsežnih operacijah v trebušni votlini (Cornely in sod.; Cruciani in sod.; Snyderman, 2003). To je privedlo do povečane uporabe flukonazola v intenzivnih enotah bolnišnic, kar je eden od dejavnikov, ki je povečal delež glivičnih okužb z ne-*C. albicans* vrstami. Prišlo je do povečanega deleža okužb povzročenih z manj odpornimi vrstami, med katerimi so najpomembnejše *C. glabrata* in *C. krusei*. Zaradi tega je izrednega pomena, da kliniki skrbno izbirajo bolnike, ki imajo veliko tveganje za nastanek glivičnih okužb in so upravičeni do profilaktičnega zdravljenja. Le tako bo takšno zdravljenje prineslo največji učinek in se bo v največji možni meri zmanjšala nevarnost širjenja odpornih vrst iz rodu *Candida*.

### 2.4 DEJAVNIKI TVEGANJA ZA NASTANEK KANDIDOZ

Človek je v nenehnem stiku s saprofiti in komezali iz okolja in z mikroorganizmi, ki so del normalne flore, kamor sodijo tudi vrste iz rodu *Candida*. Do oportunističnih glivičnih okužb pride, ko glive spremenijo svoj saprofitni, komezalni status in s tem povzročijo

bolezen (Deacon, 1997). Narejene so bile številne raziskave, v katerih so želeli opredeliti dejavnike tveganja za nastanek glivičnih okužb. Število dejavnikov tveganja za nastanek oportunističnih glivičnih okužb je veliko in še narašča. Nekateri izpostavljajo pomen imunske oslabelosti, kamor sodijo zdravljenje s kortikosteroidi ali kemoterapijo, podhranjenost, maligna obolenja in nevtropenija. Največkrat pri nastanku sistemske glivične okužbe sodeluje več dejavnikov hkrati. Ugotovili so, da je kolonizacija z glivami neodvisen napovedni dejavnik tveganja za nastanek bolnišnično pridobljene fungemije (Richet in sod., 1991; Schwartz in sod., 1984; Wey in sod., 1989). V multivariatnih analizah so se za neodvisne napovedne dejavnike tveganja izkazali predhodna kemoterapija, število prejemanja antibiotikov pred nastankom glivične okužbe, vstavljeni žilni katetri, hemodializa in nevtropenija (Richet in sod., 1991; Schwartz in sod., 1984; Wey in sod., 1989; Karabinis in sod., 1988).

## 2.5 OKUŽBE, KI JIH POVZOČAJO VRSTE IZ RODU *CANDIDA*

### 2.5.1 Povrhinja kandidoza

Okužba sluznic je najpogostejša oblika povrhnje kandidoze. Na sluznicah so vidne nežne bele pege, ki se med seboj zlivajo, pri čemer nastajajo siraste psevdOMEMBRANE. Takšno obliko okužbe imenujemo soor. Pri oralni kandidozi se pojavijo bele pege na bukalni sluznici in trdem nebu in jih lahko odstranimo. Sluznica v okolici je rdeča in otekla. Oralno kandidozo včasih odkrijemo pod zobno protezo, včasih pa nastane kot posledica dolgotrajnega antibiotičnega zdravljenja. Pri hudih oblikah okužb najdemo opisane spremembe tudi na jeziku, v žrelu in požiralniku. Spremljajo jih težko požiranje in bolečine za prsnico. Kronična, trdovratna orofaringealna kandidoza je značilna in pogosta pri bolnikih z AIDS-om. Njen pojav je pogosto znak prehoda iz pozitivnega stanja HIV v AIDS. Vaginalna kandidoza je pogosta predvsem med nosečnostjo, pogosteje zbolevalo tudi bolnice z sladkorno boleznijo in ženske, ki jemljejo oralne kontraceptive.

Kožna kandidoza se pojavlja na mestih, ki se pogosto vlažijo. To je predvsem pod pazduhami, dojkami ter v dimljah. Kvasovke rodu *Candida* povzročajo pri majhnih otrocih »dermatitis pod plenici«. Vnetje spremlja pordela, macerirana koža, površina postane hrapava, v okolici pa vidimo drobno luščenje in pustule. Do okužbe nohtov ponavadi pride

pri gospodinjah, pomivalkah in strežnicah. Koža obnohtja oteče, kar se kaže v živo rdeči barvi in bolečini. Noht postopoma postane rumenkast, zadebeljen in hrapav.

### **2.5.2 Kronična mukokutana kandidoza**

Kvasovke rodu *Candida* redko povzročajo kronično mukokutano kandidozo, ki lahko prizadane katerikoli del kože in sluznice. Bolezen se začne v otroški dobi in z vmesnimi obdobji izboljšanja traja vse življenje. Na okuženih območjih nastajajo bradavičaste in brazgotinaste spremembe. Pri prizadetih osebah se pogosto opažajo nepravilnosti v celično posredovanem imunskem odzivu ali različne endokrinopatije.

### **2.5.3 Sistemska kandidoza**

Poznamo številne bolezenske pojave sistemske kandidoze. Klinični potek je odvisen od velikosti inokuluma in virulence mikroba, precej pa tudi od gostiteljevega imunskega odziva. Do vdora kandid v krvni obtok lahko pride pri poškodbi kože ali sluznic, okužbi žilnih katetrov in kirurškem posegu. Kandidemija lahko izzveni spontano, včasih šele po odstranitvi okuženega katetra. Pri bolnikih z močno zmanjšano imunsko odpornostjo pa kandidemija lahko napreduje v diseminirano glivično okužbo. Vse sistemske okužbe s kandidami ogrožajo bolnikovo življenje. Sistemska kandidoza je lahko lokalizirana na organ ali organski sistem. Pogosto so prizadeta jetra, ledvice, vranica, oči in centralni živčni sistem.

## **2.6 ZDRAVLJENJE IN PREPREČEVANJE KANDIDOZ**

Povrhnje okužbe kože, sluznic in nohtov običajno zdravimo z lokalnim nanašanjem antimikotikov. Uporabljajo se amfotericin B, nistatin, terbinafin in azoli. Obsežne spremembe na nohtih ter trdovratne in ponavljajoče se okužbe kože in sluznic se običajno uspešno zdravijo oralno z itrakonazolom (Matos, 2002).

Zdravljenje bolnikov s sistemskimi glivičnimi okužbami, je zahtevno, saj so bolniki pogosto življenjsko ogoženi že zaradi hude osnovne bolezni. Pri izbiri zdravila za zdravljenje tovrstnih glivičnih okužb je potrebno upoštevati klinično sliko bolezni, resnost stanja, osnovne bolezni bolnika, oziroma stopnjo njegove imunske oslabelosti, prejšnje

protiglivično zdravljenje, utemeljenost diagnoze glivične okužbe in vrsto glive, ki dokazano ali domnevno povzroča okužbo (Beović in Lejko-Zupanc, 2004).

Za zdravljenje sistemske kandidoze je izbirno zdravilo amfotericin B, ki se ga včasih kombinira z flucitozinom (Matos, 2002) ali flukonazolom (Rex in sod., 2003). Med azolnimi antimikotiki se najpogosteje uporablja flukonazol, ki ima za razliko od amfotericina B precej manj stranskih učinkov. Ponavadi se uporablja pri manj kritičnih bolnikih in za nadaljevanje zdravljenja z amfotericinom B. Okužbe z vrstami kandid, ki so dobro občutljive na flukonazol, lahko pri večini bolnikov uspešno zdravimo s tem antimikotikom. V zadnjem času so se na tržišču pojavili tudi drugi azolni antimikotiki, med katerimi je najpomembnejši vorikonazol. *In vitro* je učinkovit proti različnim vrstam kvasovk rodu *Candida*, med drugim tudi proti flukonazolu odpornim sevom *C. albicans* (Chavez in sod., 1999).

Za preprečevanje kandidoz se uporabljajo flukonazol, itrakonazol in vorikonazol. Flukonazol se uporablja kot profilaktično zdravilo pri nevtropeničnih bolnikih z rakom, pri bolnikih po presaditvi krvotvornih matičnih celic in jeter (Matos, 2002). Za razliko od itrakonazola, ima manj stranskih učinkov, a je neučinkovit pri zdravljenju na flukonazol odpornih vrst kandid in plesni (Bow in sod., 2002). Ravno tako se v profilaktične namene uporablja vorikonazol, ki se je pri bolnikih s posebnim tveganjem izkazal za celo boljšega kot amfotericin B (Walsh in sod., 2002).

### **2.6.1 Antimikotiki**

Antimikotiki so sredstva s katerimi zdravimo glivične okužbe. Glede na številne antibiotike, ki jih uporabljajo za zdravljenje bakterijskih okužb poznamo relativno malo antimikotikov. Poleg tega njihovo uporabo omejujejo tudi neželeni stranski učinki, ki so pogosti in nevarni. Glive so namreč tako kot ljudje evkarionti in številni celični in molekularni procesi potekajo podobno. Tako tarča delovanja antimikotikov niso le celice gliv ampak tudi bolnikove celice. Za zdravljenje oportunističnih kandidoz se uporabljajo predvsem antimikotiki, ki sodijo v skupino polienov (amfotericin B) in azolov (flukonazol, itrakonazol, ketokonazol, vorikonazol). Razvijajo se še drugi, predvsem iz skupine azolov in nova skupina antimikotikov, ehinokandini (Matos, 2002; Onishi in sod., 2000).

### 2.6.1.1 Mehanizem delovanja azolov

Membrane gliv vsebujejo sterole, med katerimi je najpomembnejši ergosterol. Ta je odgovoren za fluidnost membrane, njeno asimetrično zgradbo in integriteto celice. Tarča azolov je encim lanosterol demetilaza, ki je encim v biosintetski poti ergosterola. Azoli zavirajo lanosterol demetilazo, kar posledično vodi do pomanjkanja ergosterola in kopičenja sterolnih prekurzorjev. Membrana celice zato spremeni zgradbo in funkcijo. Takšne celice so občutljivejše na obrambni mikrobicidni sistem gostitelja. Novejši azoli, kot so flukonazol, vorikonazol in itrakonazol, delujejo predvsem na lanosterol demetilazo, medtem ko starejši antimikotiki zavirajo še številne druge, na membrano vezane encime, ter biosintezo membranskih lipidov. Azoli med drugim zavirajo tudi nastajanje holesterola, a je afiniteta teh zdravil za encime v celicah sesalcev približno 250-krat manjša od afinitete za encime v celicah gliv (Sheehan in sod., 1999, Ghannoum in sod., 1999).

### 2.6.1.2 Mehanizem delovanja polienov

Polieni predstavljajo skupino fungicidnih protiglivnih zdravil, ki delujejo na celične membrane, ki vsebujejo sterole. Njihove amfipatične molekule se vgradijo v celično membrano in tvorijo kanale, preko katerih pride do spremenjene permeabilnosti, izgube vitalnih citoplazemskih komponent in posledično smrti mikroorganizma. Mednje prištevamo amfotericin B in nistatin. Polieni imajo, podobno kot azoli, večjo afiniteto do ergosterola kot holesterola. Za njihovo učinkovito delovanje je pomembno tudi ustrezno razmerje med steroli fosfolipidi (Matos in Beović, 2001).

### 2.6.1.3 Mehanizem odpornosti gliv proti azolom

Glavni mehanizem odpornosti na azole je posledica spremenjene strukture glavnega tarčnega encima, lanosterol 14- $\alpha$ -demetilaze. Povečana odpornost, je poleg drugačne strukture, lahko tudi rezultat povečane količine tega encima v celicah. Encim kodira gen *ERG11*, mutacija tega gena pa vodi do spremembe vezavnega mesta za azole, medtem ko aktivno mesto encima ostane nespremenjeno. Takšen protein ima zato zmanjšano afiniteto do azolov ob ohranjeni encimski aktivnosti. Povečano izražanje tarčnega encima je

posledica amplifikacije gena *ERG11*, kar vodi do navzkrižne odpornosti na flukonazol in itrakonazol.

Odpornost na azole je povezana tudi z znižano koncentracijo antimikotika v glivnih celicah. Do tega lahko pride zaradi zmanjšane permeabilnosti membrane za antimikotik ali pa zaradi transporta le tega iz citosola v zunajcelični prostor. Do zmanjšane permeabilnosti pride zaradi spremenjenega razmerja med fosfolipidi in maščobnimi kislinami ter zamenjave ergosterola z metiliranimi steroli v celični membrani. S transportom azolov iz celic sta povezana dva tipa transmembranskih črpalk »ABC transporters« (ABCT) in »major facilitators« (MF). Prvi so pogosto udeleženi pri aktivnem transportu molekul, ki so toksične za celico in so relativno hidrofobne in lipofilne. »ABC transporters« kodirajoči geni so geni *CDR*, ki se normalno izražajo v nizkih koncentracijah. Prekomerno izražanje genov *CDR* je povezano z odpornostjo na številne azole in poliene.

Transmembransko črpalko - MF kodira gen *MDR1*, povezana je s specifično odpornostjo na flukonazol (Sheehan in sod., 1999; Ghannoum in sod., 1999).

#### 2.6.1.4 Mehanizem odpornosti gliv proti polienom

Glede na biokemično hipotezo je odpornost na poliene povezana s količinsko, ali s kakovostno spremembo sterolov v celični membrani. Zmanjšana afiniteta do polienov, je lahko posledica zmanjšanje celotne količine ergosterola v celici brez sprememb v zgradbi sterolov, zamenjave nekaterih, ali vseh sterolov z drugimi, ki imajo do polienov manjšo afiniteto, spremenjene orientacije ali prekritja prisotnega ergosterola na tak način, da je interakcija polienov z ergosterolom sterično, ali termodinamsko manj ugodna (Sheehan in sod., 1999; Ghannoum in sod., 1999; Pfaller in sod., 1996).

Pridobljena odpornost na amfotericin B je največkrat opisana pri bolnikih z malignimi obolenji, opisani so tudi sevi odporni na flukonazol in amfotericin B, pri bolnikih z aidsom, ki so dlje časa prejeli profilaktično zdravljenje z azoli (Matos in Beović, 2001).

#### 2.6.2 Metode za testiranje občutljivosti gliv na antimikotike

Z naraščajočo incidenco glivičnih okužb se je začel intenzivnejši razvoj novih, manj toksičnih in učinkovitejših protiglivnih zdravil, obenem pa tudi metod za testiranje



občutljivosti gliv na antimikotike. Leta 1992 je podkomisija pri Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) opisala standardizirano referenčno metodo in izdala dokument M27-P za določanje občutljivosti gliv za antimikotike (Pfaller in sod., 1994). V dokumentu sta opisani makrodilucijska in mikrodilucijska tehnika, opredeljeni so velikost inokuluma, čas in trajanje inkubacije, medij za testiranje in merila za odčitavanje rezultatov. V dokumentu so določeni referenčni sevi s katerimi se izvaja kontrola kakovosti postopka in mejne vrednosti minimalnih inhibitornih koncentracij (MIK) za nekatere antimikotike (Preglednica 1). Metoda je standardizirana za testiranje občutljivosti povzročiteljev glivnih okužb iz rodu *Candida* in *Cryptococcus neoformans*. Uveljavila se je po vsem svetu, zagotavlja ponovljivost in primerljivost rezultatov, kar je pripomoglo k velikemu razmahu raziskav na tem področju. V teku so številne klinične raziskave, ki proučujejo odgovor na antimikotično zdravljenje. V njih skušajo opredeliti še mejne vrednosti za ostale antimikotike, izbiro najustreznjšega zdravila za posamezno vrsto glive ali skupino bolnikov. Vendar pa raziskovalci poudarjajo, da na izid zdravljenja glivičnih okužb poleg izbire ustreznega antimikotika, vplivajo še številni drugi dejavniki med katerimi sta pomembna obrambni odgovor bolnika in njegova osnovna bolezen.

Preglednica 1: Meje vrednosti minimalnih inhibitornih koncentracij (MIK) za posamezne antimikotike (CLSI M27-A)

	S (µg/ml)	S-DD (µg/ml)	I (µg/ml)	R (µg/ml)
<b>Flukonazol</b>	≤8	16 – 32	-	≥64
<b>Flucitozin</b>	≤4	-	8 – 16	≥32
<b>Itrakonazol</b>	≤0,125	0,25 – 0,5	-	≥1
<b>Vorikonazol</b>	≤1		-	≥4

#### 2.6.2.1 Metoda difuzije antimikotičnega gradienta (Etest)

Zaradi tehnične zapletenosti standardizirane metode, ki jo opisujejo CLSI so se začele pojavljati alternativne metode določanja občutljivosti gliv na antimikotike, ki bi bile enostavnejše za laboratorijsko delo. Med njimi se je uveljavila metoda difuzije

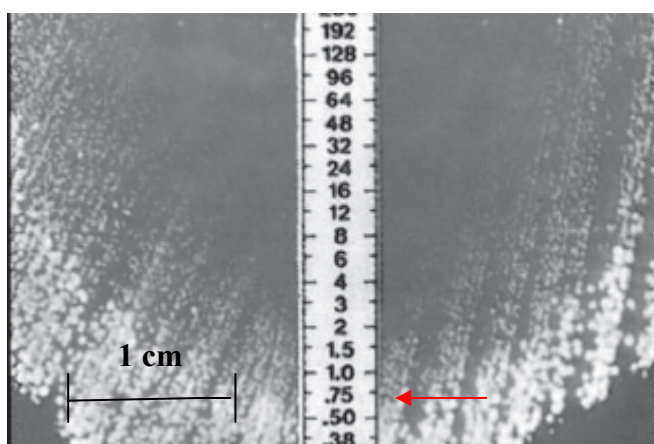
antimikotičnega gradienta, imenovana Etest (AB Biodisk, Solna, Švedska). Proizvajalci so se kar se da najbolj prilagodili standardizirani metodi, glede uporabljenega medija, časa inkubacije in predvsem odčitavanja MIK. Številne raziskave, ki so primerjale rezultate občutljivosti s standardizirano metodo in Etestom so potrdile, da je delež ujemanja rezultatov zelo visok in se zato ta metoda lahko uporablja v vsakdanji laboratorijski praksi namesto tehnično bolj zapleteno standardizirano metodo (Sewell in sod., 1994).

Etest je tanek, inerten, ne-porozen, plastičen ozek trak dimenzij  $5 \times 60$  mm. Na eni strani traku je umerjena lestvica vrednosti koncentracij antimikotika v  $\mu\text{g/ml}$ , ter dvo-črkovna kratica antimikotika (Slika 1). Na drugi strani, pa je eksponenten gradient posušenega in stabiliziranega antimikotika. Zvezen gradient pokriva koncentracijsko območje (Preglednica 2), ki ustreza 15 - im (two-fold) razrečitvam po običajnih razrečitvenih metodah.

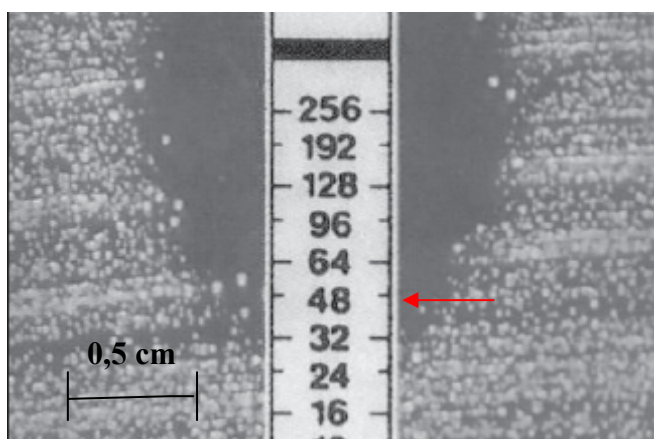
E- test temelji na kombinaciji dilucijskih in difuzijskih testov. Tako kot pri dilucijskih testih, E- test direktno ovrednoti občutljivost v obliki diskretnih vrednosti MIK. Etest ima definiran in zvezni koncentracijski gradient, tako da so lahko MIK vrednosti precej bolj natančne, kot pri običajnih testih, ki temeljijo na nezveznih (dvojnih) serijskih redčitvah. Čeprav je postopek enak kot pri disk difuzijskem testu, zvezni gradient antimikotika pri Etestu jasno ločuje ti dve metodi. Za razliko od disk difuzijske metode, MIK določene z Etestom, niso povezane z molekularno maso, vodotopnostjo in difuzijo antimikotika, ali z različnimi rastnimi stopnjami različnih kvasovk (Etest, 2006). Pri polaganju testa na nacepljeno trdno gojišče, pride do takojšnjega sproščanja antimikotika iz plastične površine v matriks agarja. Neposredno pod trakom se vzpostavi zvezen in stabilen gradient antimikotične koncentracije. Po inkubaciji, ko je rast gliv že vidna, se vzdolž Etesta pojavi simetrična inhibicijska elipsa. Na mestu, kjer rob elipse seka Etest, je vrednost MIK. Za azolne antimikotike (flukonazol, itrakonazol, ketokonazol, vorikonazol) je MIK opredeljen po CLSI kot koncentracija, kjer je rast glive zavrta 80% (Slika 2), kar velja tudi pri odčitavanju rezultatov Etesta, medtem, ko mora biti ta pri polienskih antimikotikih (amfotericin B) zavrta 100% (Slika 3).



Slika 1: Etest: Umerjena lestvica vrednosti koncentracij antimikotika ( $\mu\text{g/ml}$ ) in dvočrkovna kratica antimikotika na traku Etesta (Etest, 2006)



Slika 2: Odčitavanje MIK pri azolih. MIK se odčita tam, kjer je rast 80 % zavrtja ( $0,75\mu\text{g/ml}$ ) (Etest, 2006)



Slika 3: Odčitavanje MIK pri amfotericinu B. MIK se odčita tam, kjer je rast 100 % zavrtja ( $48\mu\text{g/ml}$ ) (Etest, 2006)

Preglednica 2: Koncentracijska območja gradienta antimikotikov na Etestu

<b>Antimikotik</b>	<b>Oznaka</b>	<b>MIK (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>
Amfotericin B	AP	0,002 – 32
Flukonazol	FL	0,016 – 256
Itrakonazol	IT	0,002 – 32
Ketokonazol	KE	0,002 – 32
Vorikonazol	VO	0,002 – 32

### 3 MATERIAL IN METODE

Izhajajoč iz namena dela, ki je bil ugotoviti ali je v obdobjih 1992-1996 in 2003-2005 ob različnih shemah profilaktičnega zdravljenja prišlo do sprememb občutljivosti izolatov kvasovk *C. albicans* in *C. glabrata* za flukonazol, itrakonazol, amfotericin B in vorikonazol, smo v diplomski nalogi uporabili številna gojišča in postopke. Za shranjevanje izolatov gliv kvasovk je bilo uporabljeno gojišče za dolgotrajno shranjevanje izolatov gliv kvasovk (Sanofi Diagnostics Pasteur, Marnes-la-Coquette, Francija). Tioglikolatni bujon, smo uporabili kot bogatitveno gojišče, za izolacijo in identifikacijo izolatov kvasovk, pa smo uporabili Sabouraud agar (SABA), kromogeno gojišče CHROMagar (CHROMagar Company, Paris, Francija) (CH) in koruzni agar (Tween – 80) (KRA). Za testiranje občutljivosti izolatov kvasovk smo uporabili RPMI 1640 gojišče. Podrobna sestava gojišč je podana v obliki tabel v prilogi A. Shematski prikaz dela je podan na sliki 5.

#### 3.1 ZBIRANJE IZOLATOV *C. ALBICANS* IN *C. GLABRATA*

Večino izolatov kvasovk *C. albicans* in *C. glabrata* smo osamili iz nadzornih kužnin bolnikov, ki so se zdravili zaradi različnih hematoloških malignih obolenj na Kliničnem oddelku za hematologijo Kliničnega centra (KOHKC) v Ljubljani. Nadzorne kužnine so vključevale bris žrela, blato in bris črevesa. Posamezni izolati so bili osamljeni tudi iz drugih kužnin iste skupine bolnikov. Izolate iz prvega proučevanega obdobja, to je od 1992-1996, smo pridobili iz stalnih gojišč, medtem ko smo za obdobje 2003-2005 deloma v diplomsko nalogo vključili podatke o občutljivosti izolatov iz arhiva Laboratorija za diagnostiko glivičnih okužb Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo v Ljubljani, deloma pa smo izolate zbirali in testirali prospektivno.

##### 3.1.1 Opis pridobivanja sevov iz stalnih gojišč

Iz stalnih gojišč, nacepljenih v obdobju 1992-1996, smo poskušali oživiti kvasovki *C. albicans* in *C. glabrata*. S sterilnim brisom smo iz stalnega gojišča prenesli kulturo v tioglikolatni bujon, ki je bogatitveno gojišče in omogoča rast in razmnoževanje zelo

majhnega števila celic inokuluma (Scythes in sod., 1996). Nacepljena gojišča smo inkubirali pri 36 °C. Po 72 urni inkubaciji smo kulturo iz gojišča precepili na SABA, gojišča brez rasti pa smo zavrgli. Nacepljene petrijevke s SABA smo inkubirali pri 36 °C vsaj 72 ur.

### 3.1.2 Identifikacija in potrditev izolatov

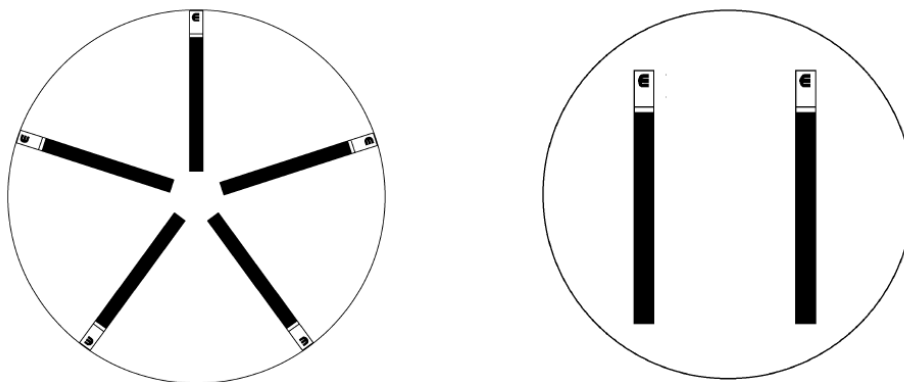
Identifikacijo izolatov *C. albicans* in *C. glabrata* smo potrdili s CH in KRA pripravljenim na inštitutu. Kulturo iz SABA smo precepili na CH (Odds in sod., 1994) in KRA (Chen in sod., 2003), ter inkubirali 48 ur pri 36 °C. Na CH *C. albicans* raste v obliki svetlo do temno zeleno pigmentiranih kolonij različnih oblik, medtem ko *C. glabrata* raste v obliki gladkih kolonij roza do vijolične barve. Za dodatno potrditev smo kulturo nacepili še na KRA (Chen in sod., 2003). Ta se uporablja za identifikacijo glive na osnovi mikroskopske morfologije psevdomicelija. *C. albicans* na KRA tvori za to vrsto značilne strukture, imenovane terminalne klamidospore, ki zrastejo na koncih psevdohif. *C. glabrata* na koruznem agarju prepoznamo po tem, da ne tvori psevdomicelija, kot ostale vrste kvasovk, ampak le gruče unimorfni ovalnih blastospor (Odds in sod., 1994).

Po potrditvi izolatov, smo kulturo iz CH cepili na SABA in jo inkubirali 24 h pri 36 °C ter izvedli testiranje občutljivosti.

## 3.2 TESTIRANJE OBČUTLJIVOSTI

### 3.2.1 Izvedba Etesta

Nekaj kolonij 24 urne kulture kvasovk smo iz SABA s sterilnim bombažnim brisom prenesli v sterilno 0,85 % raztopino NaCl, ter pripravili homegeno suspenzijo gostote 0,5 McFarland standarda (Etest, 2006). V tako pripravljeno raztopino smo pomočili sterilnen bombažen bris, odvečno tekočino smo odstranili s pritiskom na notranji strani ampule, nato smo z njim enakomerno premazali površino RPMI 1640 gojišča v petrijevki. Počakali smo 15 do 20 minut, da se je površina gojišča posušila. Nato smo s sterilno pinceto Etest (AB Biodisk, Solna, Švedska) položili na površino RPMI 1640 gojišča. Pri tem smo morali paziti, da je bila MIC skala obrnjena navzgor in da je bil celoten trakec v stiku z gojiščem. Zračne mehurčke, ki so se pojavili med testom in medijem, smo sprostili z rahlim potegom pincete od nižje proti višji koncentraciji antimikotika. Pri tem Etesta nismo smeli premakniti. Položen Etest prav tako nismo smeli več premikati, saj pride do takojšnje difuzije antimikotika v medij. Načine razporejanja Etesta na gojišče prikazuje slika 4. Plošče s položenimi Etesti smo inkubirali v aerobni atmosferi pri 35 °C 48 ur (Etest, 2006).



Slika 4: Načini polaganja Etesta(ov) na RPMI gojišče v petrijevki (Etest, 2006)

### 3.2.2 Odčitavanje MIK

Vrednosti MIK v  $\mu\text{g/ml}$  smo odčitali po 48 urni inkubaciji neposredno iz skale na Etestu, v točki, kjer je rob inhibicijske elipse sekal Etest. MIK pri flukonazolu, itrakonazolu in vorikonazolu smo odčitali na točki 80 % inhibicije rasti, pri amfotericinu B pa smo MIK odčitali tam, kjer je bila rast popolnoma zavrt (Etest, 2006).

Pri interpretaciji vrednosti MIK smo upoštevali mejne vrednosti, ki jih predpisujejo CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) v dokumentu M27-A in jih prikazuje Preglednica 3 (Etest, 2006).

Preglednica 3: Interpretacijski kriteriji CLSI za opredeljevanje občutljivosti gliv kvasovk za antimikotike

Antimikotik	Koda	Interpretacijski kriteriji			
		$S \leq^*$	S-DD**	$R \geq^{***}$	
(MIK $\mu\text{g/ml}$ )					
Flukonazol	FL	<i>Candida</i> spp.	8	16-32	64
Itrakonazol	IT	<i>Candida</i> spp.	0,12	0,25-0.5	1
Vorikonazol	VO	<i>Candida</i> spp.	1	2	4
Amfotericin B	AP	Ni opredeljeno			

- \* občutljivo
- \*\* občutljivo odvisno od doze
- \*\*\* odporno

### 3.3 ZBIRANJE PODATKOV

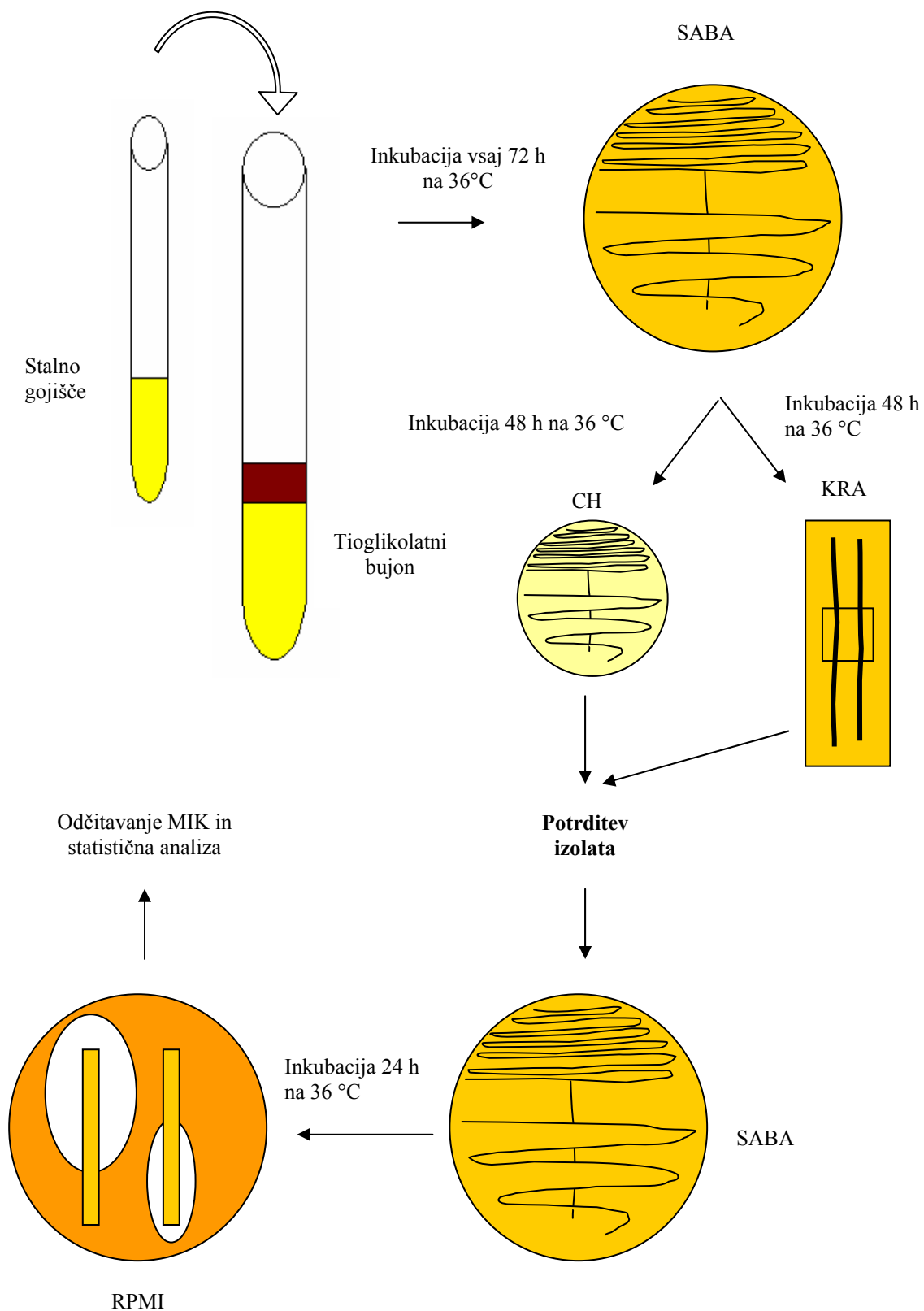
Podatke o bolnikih (spol, starost, vrsta kužnine, datum odvzema kužnine) smo za obdobje 1992–1996 dobili iz dokumentacije, ki je spremljala izolate na stalnih gojiščih. Za leto 2004, smo podatke o bolnikih in občutljivosti izolatov za antimikotike dobili iz računalniškega arhiva Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo, za leto 2005 pa iz spremnih listov bolnikov, od katerih smo iz kužnin osamili kvasovke in jih testirali.

Podatke o vrsti profilaktičnega zdravljenja bolnikov za obe proučevani obdobji, smo dobili na Oddelku za hematologijo Kliničnega centra v Ljubljani. Izpis podatkov je vključeval podatke o vrsti in trajanju profilakse pred odvzemom kužnine, iz katere je bil osamljen izolat kvasovke.



### 3.4 STATISTIČNA ANALIZA

Za statistično primerjavo občutljivosti obeh skupin smo uporabili Mann-Whitneyev U test. Ta neparametrični test, upošteva rangirane rezultate, po moči pa je podoben Studentovemu t-testu. Za uporabo Mann-Whitneyevega U testa (in ne studentovega t-testa), smo se odločili zaradi same metodologije določanja MIK, ki se določa na nelinearni lestvici in zavzema samo fiksne vrednosti. Primernejši je bil tudi zaradi pogoste neenakosti v številu in distribuciji vrednosti v obeh primerjanih skupinah, zaradi majhnega števila vzorcev v nekaterih skupinah. K izbiri testa je prispevala tudi nenormalna porazdelitev MIK, kar pomeni, da večina MIK ni imela Gaussove porazdelitve, temveč levo asimetrično porazdelitev. Večina izolatov ima namreč precej nizke MIK, visoki MIK pa so precej redki. Za mejo statistične pomembnosti je bila določena p-vrednost 0,05.



Slika 5: Shematski prikaz dela

## 4 REZULTATI

Izhajajoč iz namena dela, katerega cilj je bil ugotoviti ali je v obdobjih 1992-1996 in 2003-2005 ob različnih shemah profilaktičnega zdravljenja, prišlo do sprememb v občutljivosti izolatov kvasovk *C. albicans* in *C. glabrata* za flukonazol, itrakonazol, amfotericin B in vorikonazol, smo prišli do sledečih rezultatov, predstavljenih v nadaljevanju.

V začetnem delu diplomske naloge so predstavljeni rezultati preživelosti izolatov kvasovk *C. albicans* in *C. glabrata* osamljenih v obdobju 1992 – 1996, podatki o izvoru izolatov in značilnosti profilaktičnega zdravljenja v prvem in drugem proučevanem obdobju.

Sledi primerjava minimalnih inhibitornih koncentracij (MIK) kvasovk *C. albicans* in *C. glabrata* iz obdobja 1992-1996 in obdobja 2003-2005 testiranih na štiri antimikotike, flukonazol, vorikonazol, itrakonazol in amfotericin B. V prvem delu smo primerjali MIK iz obeh obdobj, ne glede na prejemanje antimikotične profilakse, v drugem delu pa smo vključili tudi ta podatek.

MIK testiranih izolatov smo interpretirali tudi glede na kriterije (S, S-DD, R) CLSI, vendar le za flukonazol, itrakonazol in vorikonazol, saj meje občutljivosti za amfotericin B še niso določene.

### 4.1 PRIDOBIVANJE KVASOVK IZ OBDOBJA 1992-1996 IZ STALNIH GOJIŠČ

Iz stalnih gojišč smo v obdobju od novembra 2004 do aprila 2005 poskušali pridobiti čim večje število izolatov *C. albicans* in *C. glabrata* osamljenih iz nadzornih kužnin bolnikov, ki so se zdravili na KOHKC v obdobju med 1992 in 1996. Stalna gojišča so bila shranjena v temi, na sobni temperaturi. Pridobili smo 87 izolatov *C. albicans* in 73 izolatov *C. glabrata*, ki smo jih uporabili v drugem delu naloge, za testiranje občutljivosti na antimikotike. Iz Preglednice 4 je razvidno, da je delež oživelih izolatov *C. albicans* bistveno višji (85%) od deleža oživelih izolatov *C. glabrata* (25%).

Preglednica 4: Preživelost izolatov kvasovk *C. albicans* in *C. glabrata* iz obdobja 1992-1996

Vrsta kvasovk	Število kvasovk, ki smo jih poskušali oživiti	Število oživljenih kvasovk	Delež preživelih kvasovk (%)
<i>C. albicans</i>	102	87	85
<i>C. glabrata</i>	292	73	25

#### 4.2 PRIMERJAVA MIK IZOLATOV *C. ALBICANS* IN *C. GLABRATA* OSAMLJENIH V OBDOBJIH 1992-1996 IN 2003-2005

Testirali smo občutljivost izolatov *C. albicans* in *C. glabrata* za štiri antimikotike flukonazol, vorikonazol, itrakonazol in amfotericin B. Primerjali smo MIK izolatov osamljenih iz obdobja 1992-1996, z izolati, ki so bili osamljeni v obdobju 2003-2005. Izolati iz obdobja 1992-1996 so bili osamljeni pri 82 bolnikih, medtem ko so bili iz obdobja 2003-2005, osamljeni pri 134 bolnikih. Število izolatov iz posameznih nadzornih kužnin bolnikov, prikazujeta Preglednici 5 in 6. Vrsto in trajanje profilaktičnega zdravljenja bolnikov prikazuje Preglednica 7. V prvem obdobju je 52,4 % bolnikov prejelo eno vrsto, 15,8 % bolnikov dve vrsti in 14,6 % bolnikov tri vrste profilaktičnega zdravljenja. 17,1 % bolnikov ni prejelo nobenega profilaktičnega zdravljenja. V drugem obdobju je 31,3 % bolnikov prejelo eno vrsto, 17,2 % dve vrsti, 8,9 % tri vrste in 0,7 %, štiri vrste profilaktičnega zdravljenja. 41,8 % bolnikov ni prejelo nobene vrste profilaktičnega zdravljenja. Iz prvega obdobja je bilo testiranih 57, iz drugega obdobja pa 89 izolatov *C. albicans*. Ravno tako je bilo iz prvega obdobja testiranih 46, iz drugega obdobja pa 51 izolatov *C. glabrata*. Podatke prikazuje Preglednica 8.

Preglednica 5: Število izolatov *C. albicans* izoliranih iz posameznih nadzornih kužnin za obdobji 1992-1996 in 2003-2005

Izvor izolatov <i>C. albicans</i>	1992-1996	2003-2005
Blato	25	2
Bris žrela	21	54
Bris črevesa	0	26
Sputum	11	35
Drugo	0	21

Preglednica 6: Število izolatov *C. glabrata* izoliranih iz posameznih nadzornih kužnin za obdobji 1992-1996 in 2003-2005

Izvor izolatov <i>C. glabrata</i>	1992-1996	2003-2005
Blato	29	1
Bris žrela	5	9
Bris črevesa	2	26
Sputum	6	11
Drugo	4	4

Preglednica 7: Vrsta in trajanje profilaktičnega zdravljenja pri bolnikih

Antimikotiki	1992-1996		2003-2005	
	% bolnikov (n = 82)	Trajanje profilaktičnega zdravljenja (dnevi)	% bolnikov (n = 134)	Trajanje profilaktičnega zdravljenja (dnevi)
Oronazol	56,1	1 - 95	0,0	/
Flukonazol	38,1	2 - 74	39,5	1 - 70
Itrakonazol	0,0	0	27,6	1 - 92
Vorikonazol	0,0	0	11,2	1 - 78
Amfotericin B	34,1	1 - 59	17,1	1 - 26
Brez vsega	17,1	/	41,8	/

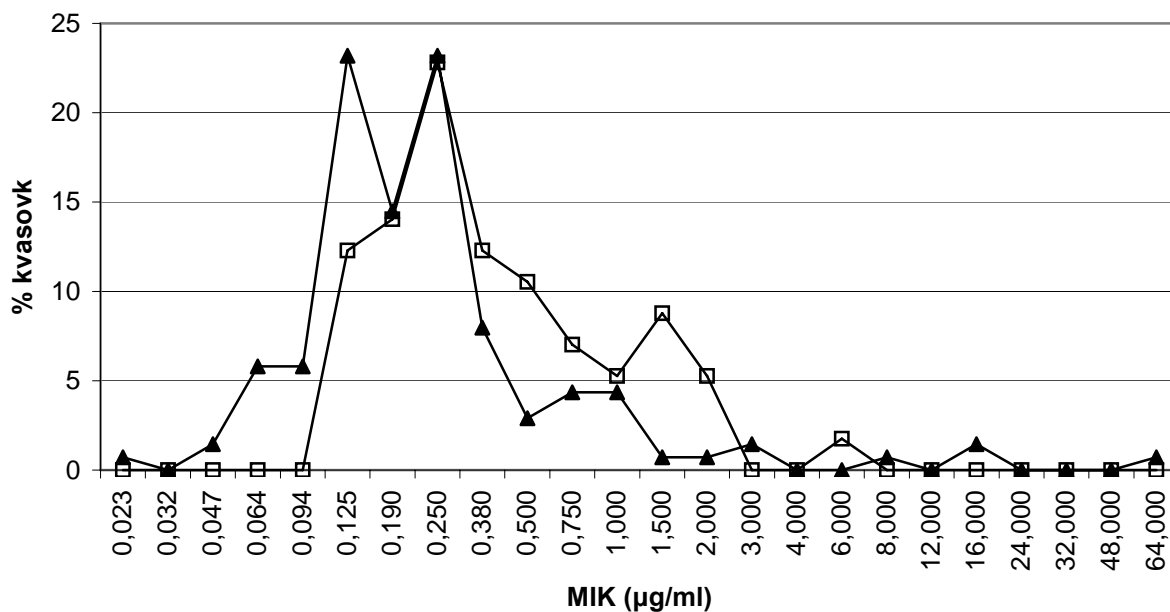
Preglednica 8: Število vseh izolatov *C. albicans* in *C. glabrata* iz obdobji 1992-1996 in 2003-2005

Število vseh izolatov	1992-1996	2003-2005
<i>C. albicans</i>	57	138
<i>C. glabrata</i>	46	51

Statistična analiza je pokazala, da se MIK *C. albicans* iz prvega in drugega obdobja značilno razlikujejo ( $p \leq 0,05$ ). Za vse štiri testirane antimikotike se je izkazalo, da so bili pri izolatih *C. albicans*, presenetljivo, v obdobju 1992-1996 MIK testiranih antimikotikov višje kot pri izolatih osamljenih v obdobju 2003-2005. Rezultate statistične obdelave prikazuje Preglednica 9. Na slikah 6-9 so grafično prikazane razporeditve MIK testiranih antimikotikov pri izolatih *C. albicans* za posamezne antimikotike iz obeh obdobj.

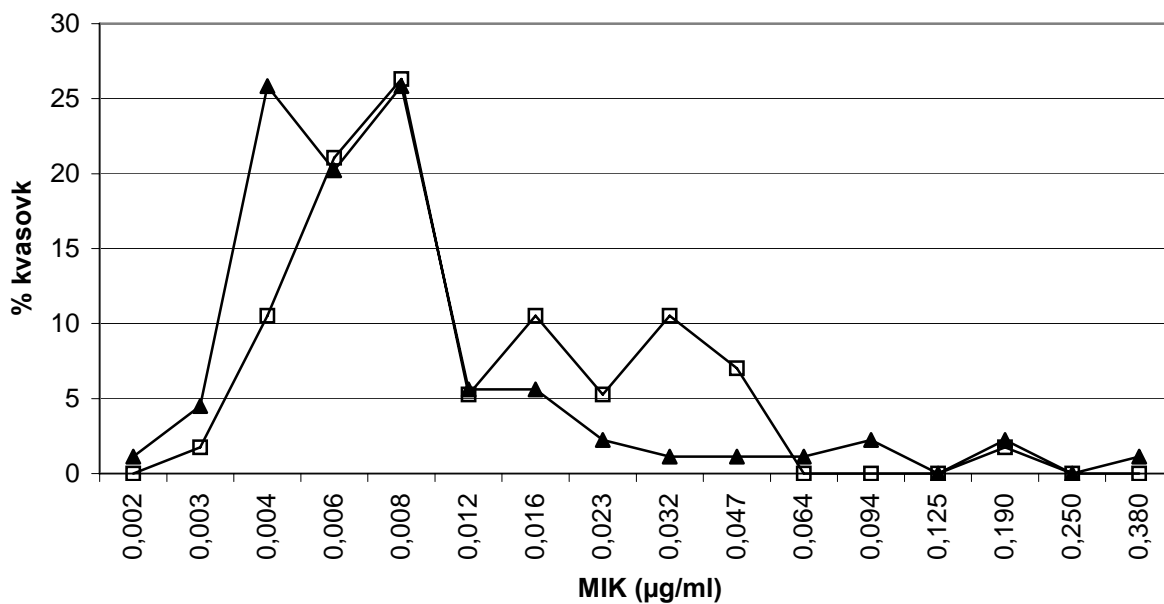
Preglednica 9: Statistična primerjava MIK testiranih antimikotikov pri izolatih *C. albicans* iz obdobj 1992-1996 in 2003-2005

<i>C. albicans</i>		<b>Flukonazol</b>	<b>Vorikonazol</b>	<b>Itrakonazol</b>	<b>Amfotericin B</b>
<b>1992-1996</b>	št. izolatov	57	57	57	57
	MIC <sub>50</sub>	0,380	0,008	0,094	0,380
	MIC <sub>90</sub>	1,500	0,032	0,250	0,500
	Obm. konc.	0,125-6,000	0,003-0,190	0,016-0,750	0,094-0,750
<b>2003-2005</b>	št. izolatov	138	89	97	137
	MIC <sub>50</sub>	0,190	0,006	0,023	0,250
	MIC <sub>90</sub>	1,000	0,023	0,125	0,380
	Obm. konc.	0,023-64,000	0,002-0,380	0,003-1,000	0,008-0,750
<b>p</b>		0,000	0,005	0,000	0,000



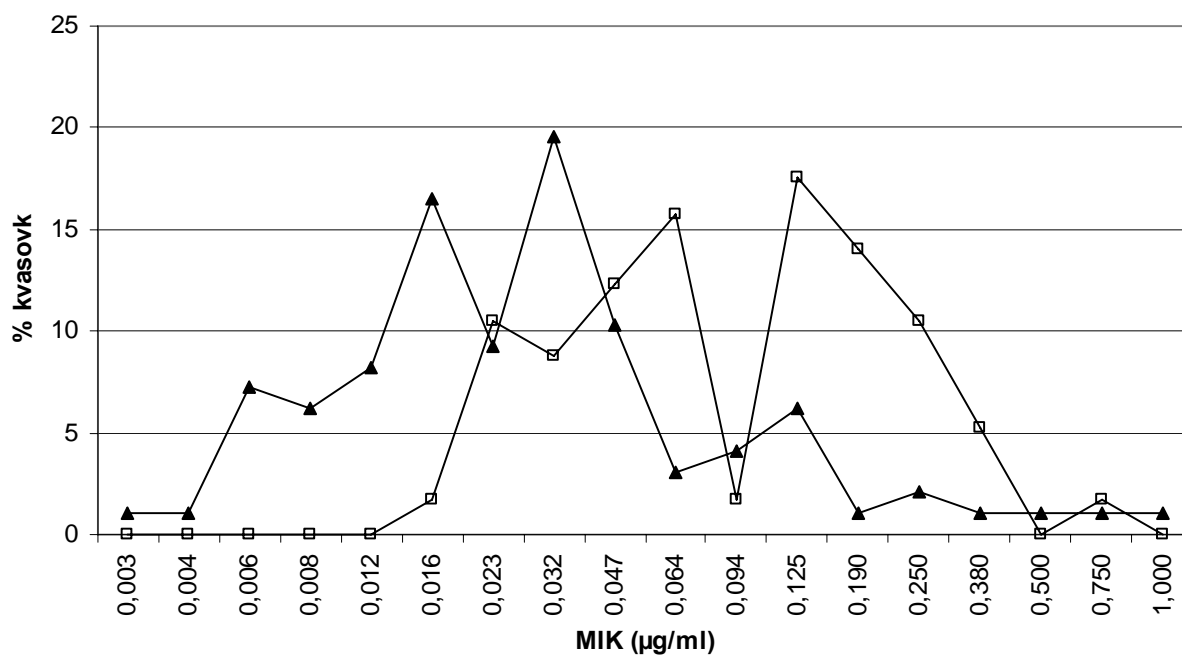
Slika 6: Porazdelitev MIK med izolati kvasovke *C. albicans* v obdobju 1992-2005 za antimikotik flukonazol

□ 1992-1996  
▲ 2003-2005



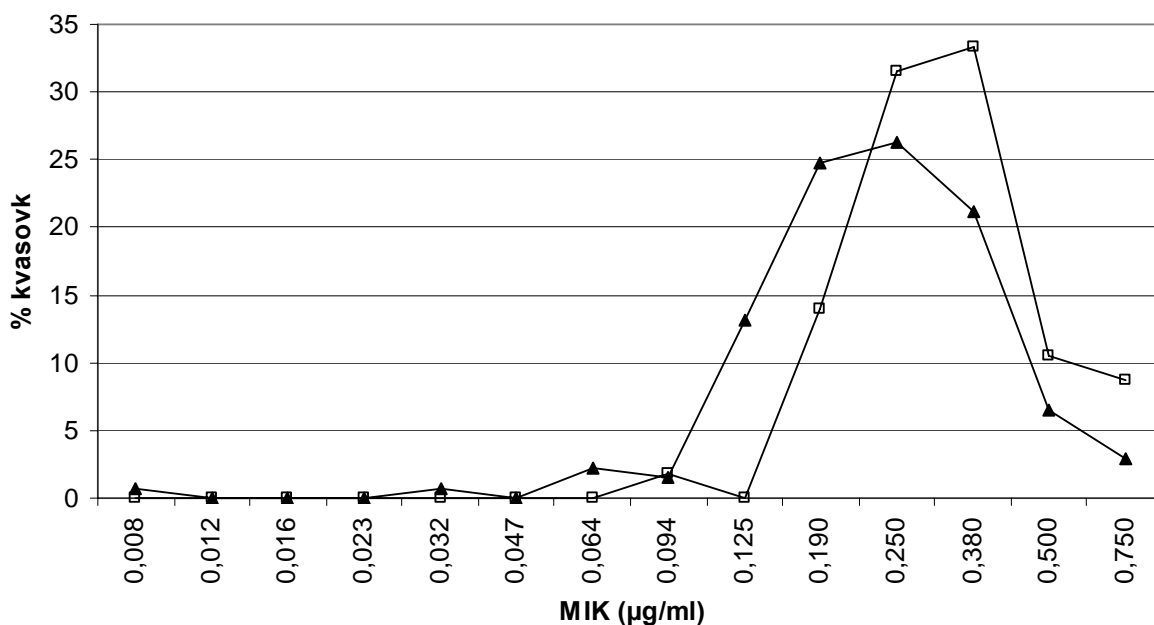
Slika 7: Porazdelitev MIK med izolati kvasovke *C. albicans* v obdobju 1992-2005 za antimikotik vorikonazol

□ 1992-1996  
▲ 2003-2005



Slika 8: Porazdelitev MIK med izolati kvasovke *C. albicans* v obdobju 1992-2005 za antimikotik itraconazol

—□— 1992-1996  
—▲— 2003-2005



Slika 9: Porazdelitev MIK med izolati kvasovke *C. albicans* v obdobju 1992-2005 za antimikotik amfotericin B

—□— 1992-1996  
—▲— 2003-2005



V obdobju 2003-2005 so se že začeli pojavljati posamezni izolati *C. albicans*, ki so popolnoma odporni na flukonazol. V obdobju 1992-1996 takšnih izolatov nismo osamili. (Preglednica 10.).

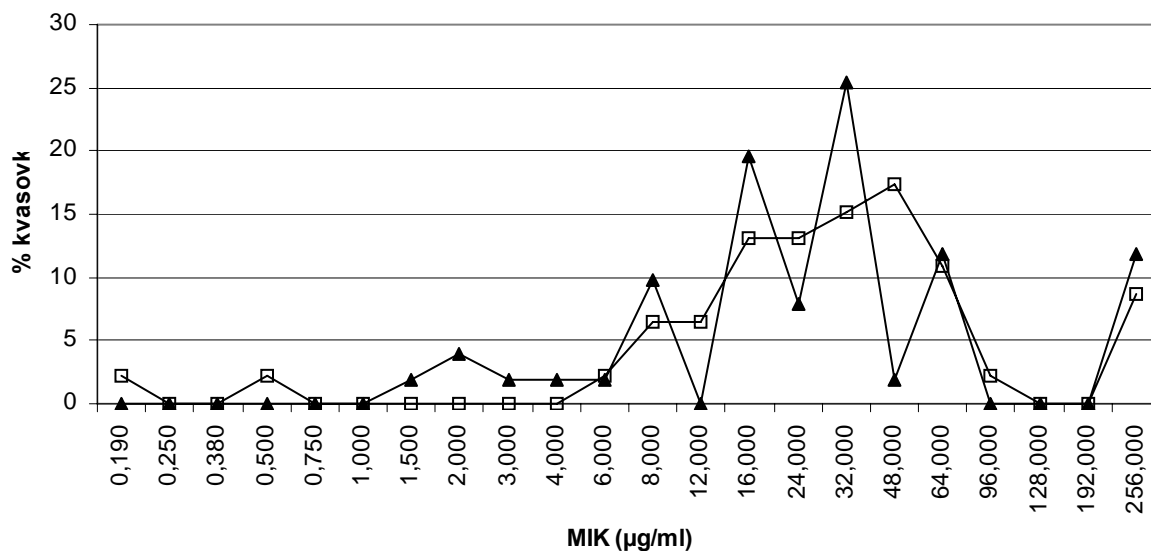
Preglednica 10: Razporeditev izolatov *C. albicans* glede na občutljivostna območja za antimikotike določena po CLSI standardih, za obdobji 1992-1996 in 2003-2005

<i>C. albicans</i>		Flukonazol	Itrakonazol	Vorikonazol
1992-1996	S	57	39	57
	% S	100,0	68,4	100,0
	S-DD	0	17	0
	% S-DD	0,0	29,8	0,0
	R	0	1	0
	% R	0,0	1,7	0,0
2003-2005	S	135	90	89
	% S	97,8	92,8	100,0
	S-DD	2	5	0
	% S-DD	1,4	5,1	0,0
	R	1	2	0
	% R	0,7	2,0	0,0

Iz prvega obdobja je bilo testiranih 46 in iz drugega obdobja 32-51 izolatov *C. glabrata*. MIK flukonazola in amfotericina B se niso statistično pomembno razlikovale med obema obdobjema ( $p \geq 0,05$ ), medtem ko sta bila občutljivostna profila vorikonazola in itrakonazola med obdobjema različna. Ugotovili smo, da je bila *C. glabrata* za vorikonazol bolj občutljiva v obdobju 1992-1996, medtem ko je bila na itrakonazol bolj občutljiva v drugem obdobju. Rezultate statistične obdelave prikazuje Preglednica 11. Na slikah 10-13 so grafično prikazane razporeditve MIK testiranih antimikotikov pri izolatih *C. glabrata* iz obeh obdobji.

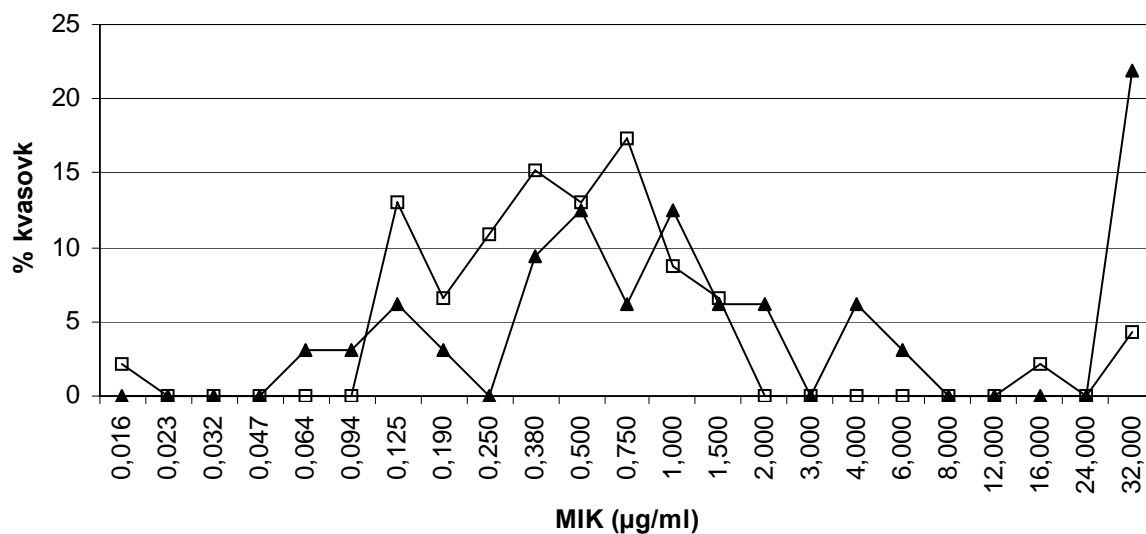
Preglednica 11: Statistična primerjava MIK testiranih antimikotikov pri izolatih *C. glabrata* iz obdobj 1992-1996 in 2003-2005

<i>C. glabrata</i>		Flukonazol	Vorikonazol	Itrakonazol	Amfotericin B
1992-1996	št. izolatov	46	46	46	46
	MIC <sub>50</sub>	32,000	0,500	24,000	0,500
	MIC <sub>90</sub>	128,000	1,500	32,000	1,000
	Obm. konc.	0,190-256,000	0,016-32,000	0,008-32,000	0,032-1,500
2003-2005	št. izolatov	51	32	37	51
	MIC <sub>50</sub>	32,000	1,000	1,000	0,750
	MIC <sub>90</sub>	256,000	32,000	32,000	1,000
	Obm. konc.	1,500-256,000	0,064-32,000	0,250-32,000	0,047-4,000
<b>p</b>		0,464	0,006	0,001	0,162



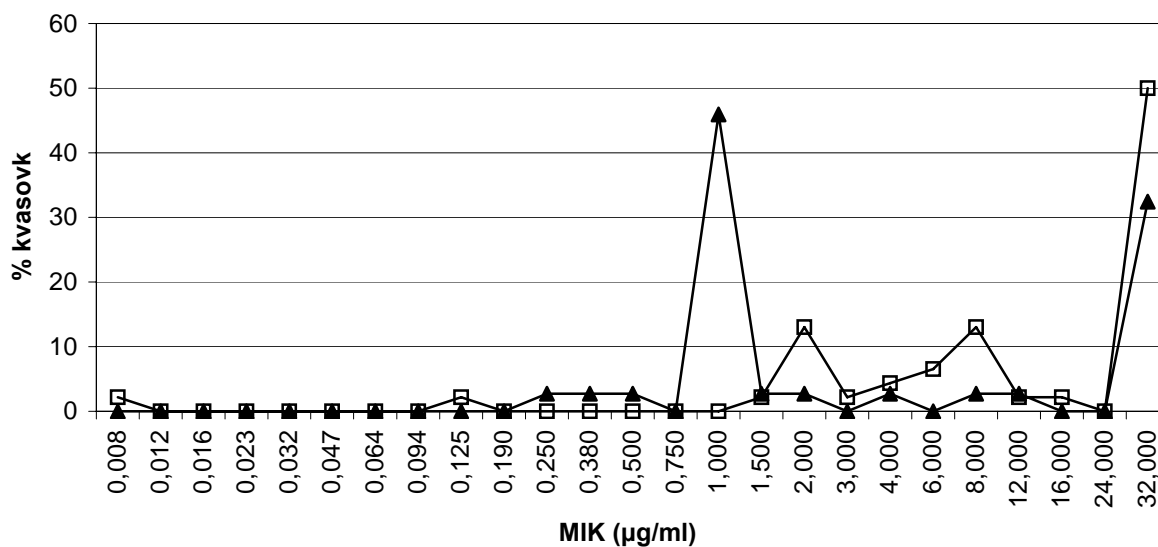
Slika 10: Porazdelitev MIK med izolati kvasovke *C. glabrata* v obdobju 1992-2005 za antimikotik flukonazol

□ 1992-1996  
 ▲ 2003-2005



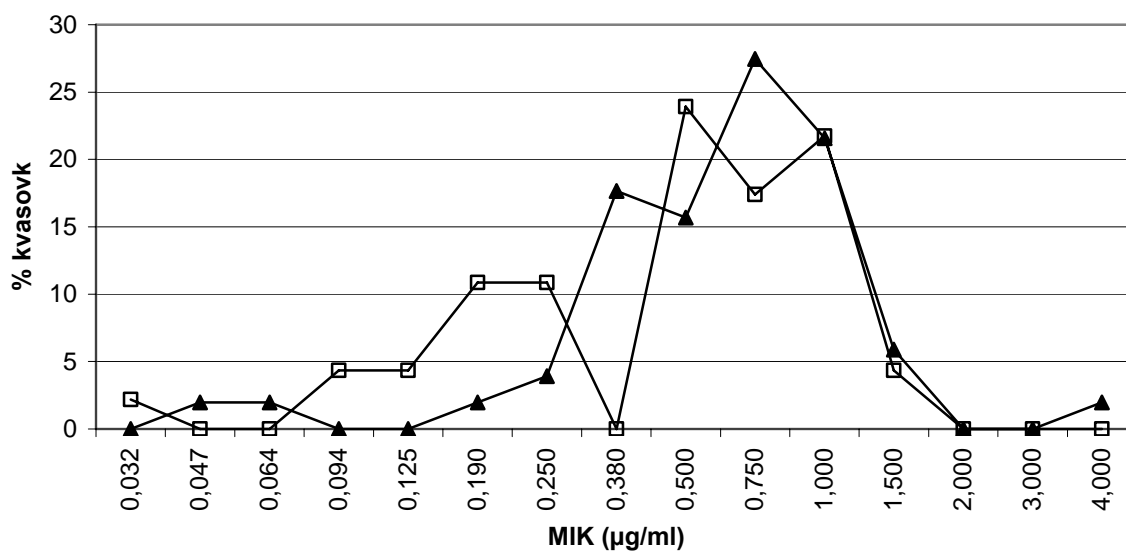
Slika 11: Porazdelitev MIK med izolati kvasovke *C. glabrata* v obdobju 1992-2005 za antimikotik vorikonazol

□ 1992-1996  
 ▲ 2003-2005



Slika 12: Porazdelitev MIK med izolati kvasovke *C. glabrata* v obdobju 1992-2005 za antimikotik itraconazol

□ 1992-1996  
 ▲ 2003-2005



Slika 13: Porazdelitev MIK med izolati kvasovke *C. glabrata* v obdobju 1992-2005 za antimikotik amfotericin B

□ 1992-1996  
▲ 2003-2005

V Preglednici 12 so navedeni deleži izolatov *C. glabrata* glede na občutljivostna območja določena po CLSI standardih za flukonazol, itraconazol in vorikonazol. Delež občutljivih izolatov na flukonazol se je presenetljivo povečal, še vedno pa je nizek in ne dosega četrtrine vseh izolatov (21,5%). *C. glabrata* je za itraconazol izredno slabo občutljiva, saj v drugem obdobju ni bilo niti enega izolata, ki bi bil občutljiv za ta antimikotik.

Preglednica 12: Razporeditev izolatov *C. glabrata* glede na občutljivostna območja za antimikotike določena po CLSI standardih, za obdobji 1992-1996 in 2003-2005

<i>C. glabrata</i>		Flukonazol	Itraconazol	Vorikonazol
<b>1992-1996</b>	S	6	2	40
	% S	13,0	4,3	86,9
	S-DD	22	0	3
	% S-DD	47,8	0,0	6,5
	R	18	44	3
	% R	39,1	95,6	6,5
<b>2003-2005</b>	S	11	0	18
	% S	21,5	0,0	56,2
	S-DD	27	3	6
	% S-DD	52,9	8,1	18,7
	R	13	34	8
	% R	25,5	91,9	25

#### 4.3 STATISTIČNA PRIMERJAVA MIK, Z UPOŠTEVANJEM PROFILAKTIČNEGA ZDRAVLJENJA

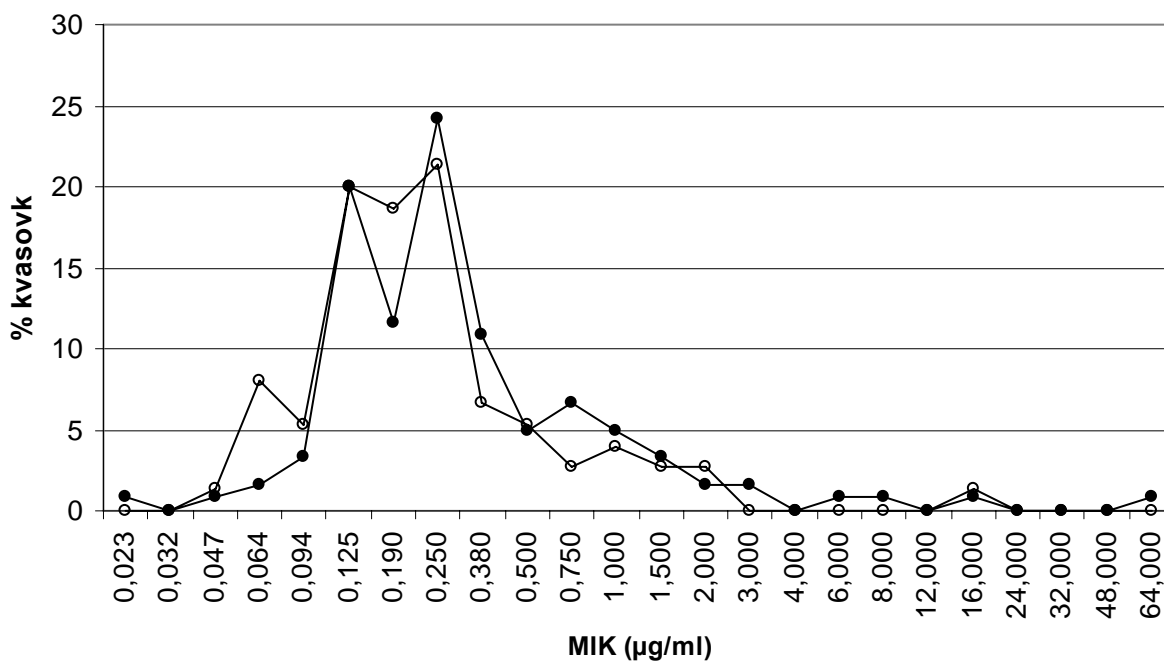
V tem delu naloge smo kvasovke razdelili v dve skupini in jih primerjali glede na to, ali je bolnik, pri katerem je bil izolat osamljen, prejemal profilaktično zdravljenje, ali ne. V skupino s profilaktičnim zdravljenjem smo uvrstili vse izolate bolnikov, ki so prejeli vsaj en antimikotik, medtem ko smo v skupino brez profilaktičnega zdravljenja uvrstili izolate bolnikov, ki niso prejeli nobenega antimikotičnega zdravljenja.

Za *C. albicans*, je statistična primerjava pokazala statistično pomembno razliko MIK flukonazola in amfotericina B, medtem ko pri vorikonazolu in itrakonazolu ni bilo statistično pomembne razlike. Rezultate statistične obdelave za *C. albicans* prikazuje Preglednica 13.

Na slikah 14-17 so grafično prikazane razporeditve MIK testiranih antimikotikov pri izolatih *C. albicans* osamljenih pri bolnikih z in brez profilaktičnega zdravljenja.

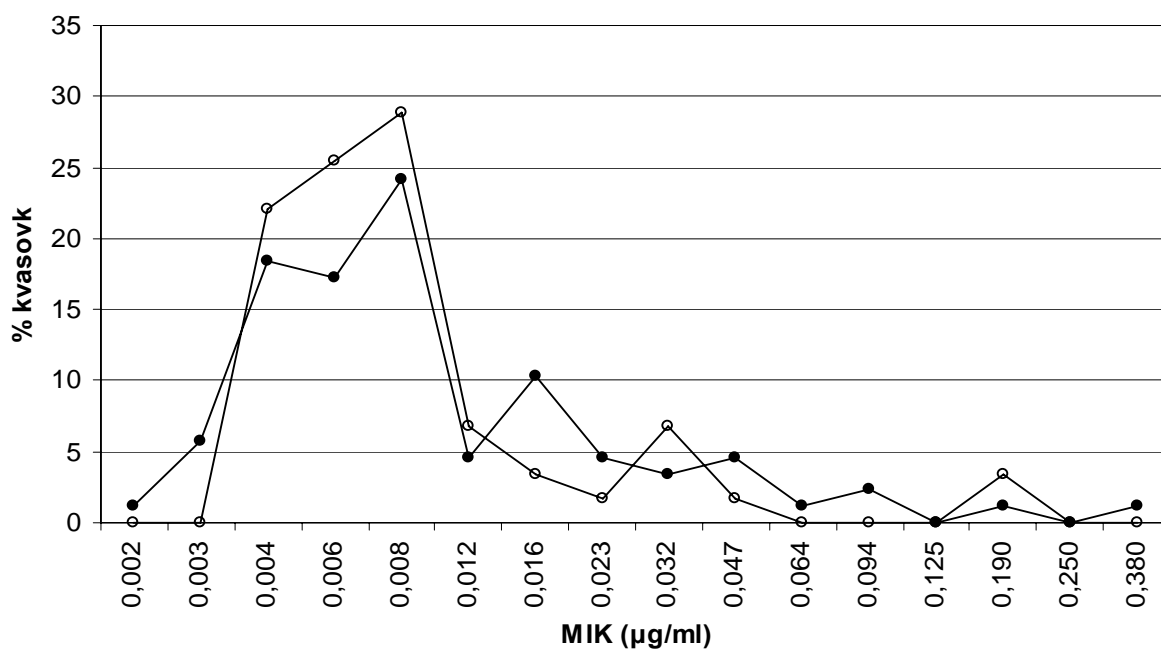
Preglednica 13: Primerjava MIK testiranih antimikotikov pri izolatih *C. albicans* osamljenih pri bolnikih z in brez profilaktičnega zdravljenja

<i>C. albicans</i>		<b>Flukonazol</b>	<b>Vorikonazol</b>	<b>Itrakonazol</b>	<b>Amfotericin B</b>
<b>Profilaktično zdravljenje</b>	št. izolatov	120	87	100	120
	MIC <sub>50</sub>	0,250	0,008	0,032	0,250
	MIC <sub>90</sub>	1,000	0,047	0,190	0,500
	Obm. konc.	0,023-64,000	0,002-0,380	0,003-0,750	0,064-0,750
<b>Brez profilaktičnega zdravljenja</b>	št. izolatov	75	59	54	74
	MIC <sub>50</sub>	0,190	0,008	0,047	0,250
	MIC <sub>90</sub>	1,000	0,032	0,250	0,500
	Obm. konc.	0,047-16,000	0,004-0,190	0,006-0,500	0,008-0,750
<b>p</b>		0,036	0,593	0,168	0,027



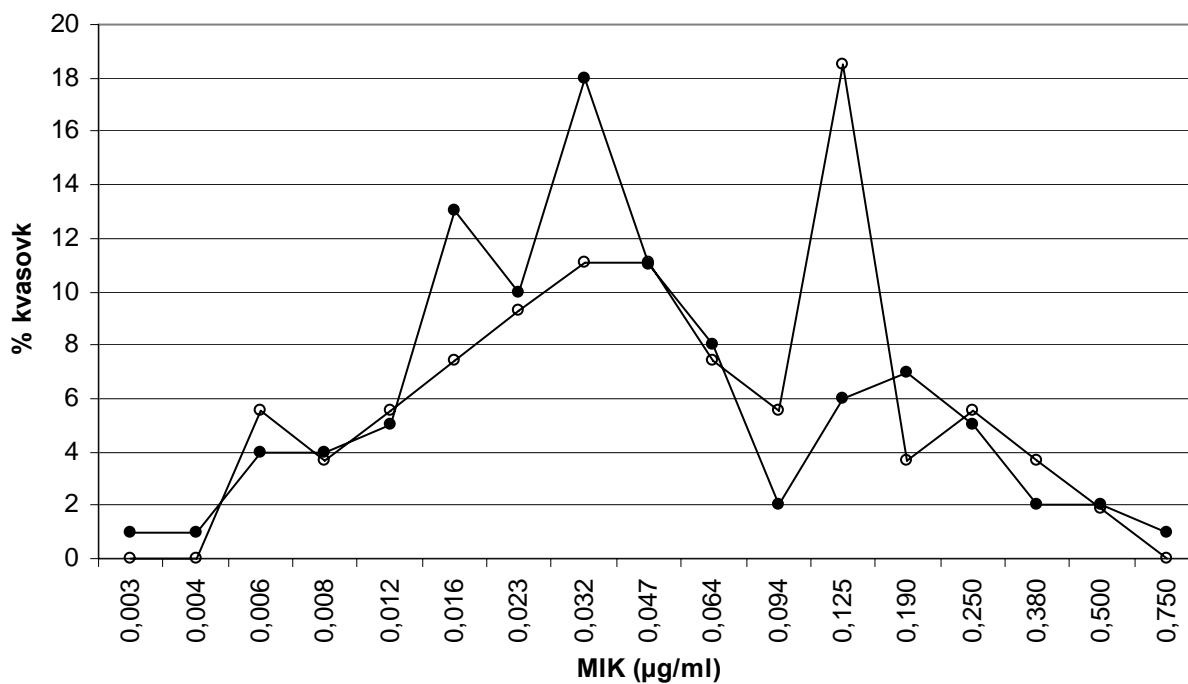
Slika 14: Porazdelitev MIK med izolati kvasovke *C. albicans* z in brez vpliva profilaktičnega zdravljenja za antimikotik flukonazol

○ % Brez profilakse  
● % Z profilakso

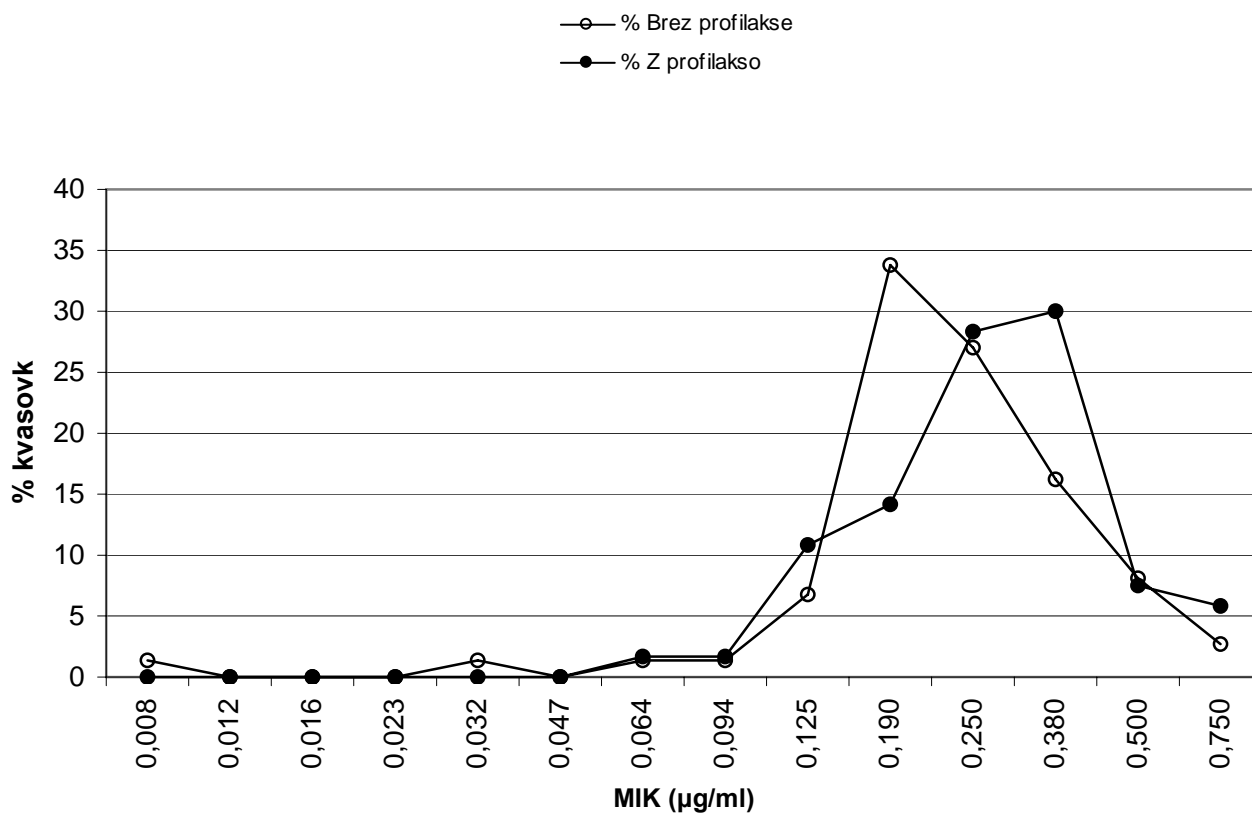


Slika 15: Porazdelitev MIK med izolati kvasovke *C. albicans* z in brez vpliva profilaktičnega zdravljenja za antimikotik vorikonazol

○ % Brez profilakse  
● % Z profilakso



Slika 16: Porazdelitev MIK med izolati kvasovke *C. albicans* z in brez vpliva profilaktičnega zdravljenja za antimikotik itraconazol



Slika 17: Porazdelitev MIK med izolati kvasovke *C. albicans* z in brez vpliva profilaktičnega zdravljenja za antimikotik amfotericin B

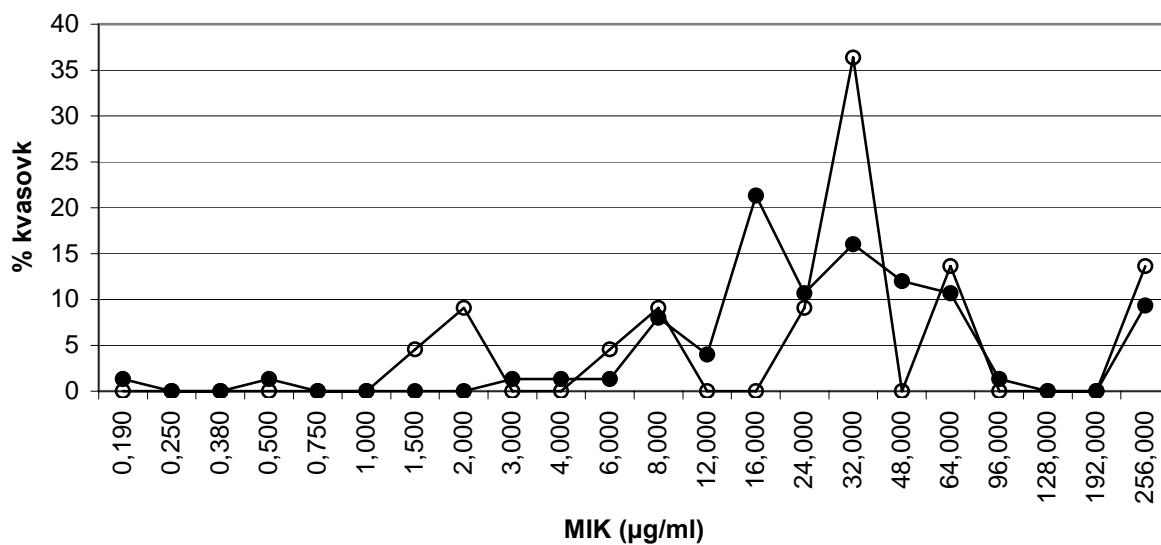


pomembno razliko. Pri ostalih treh antimikotikih ni bilo statistično pomembnih razlik. Rezultate statistične obdelave MIK, za *C. glabrata*, prikazuje Preglednica 14.

Na slikah 18-21. so grafično prikazane razporeditve MIK izolatov *C. glabrata* za posamezne antimikotike iz obeh obdobj.

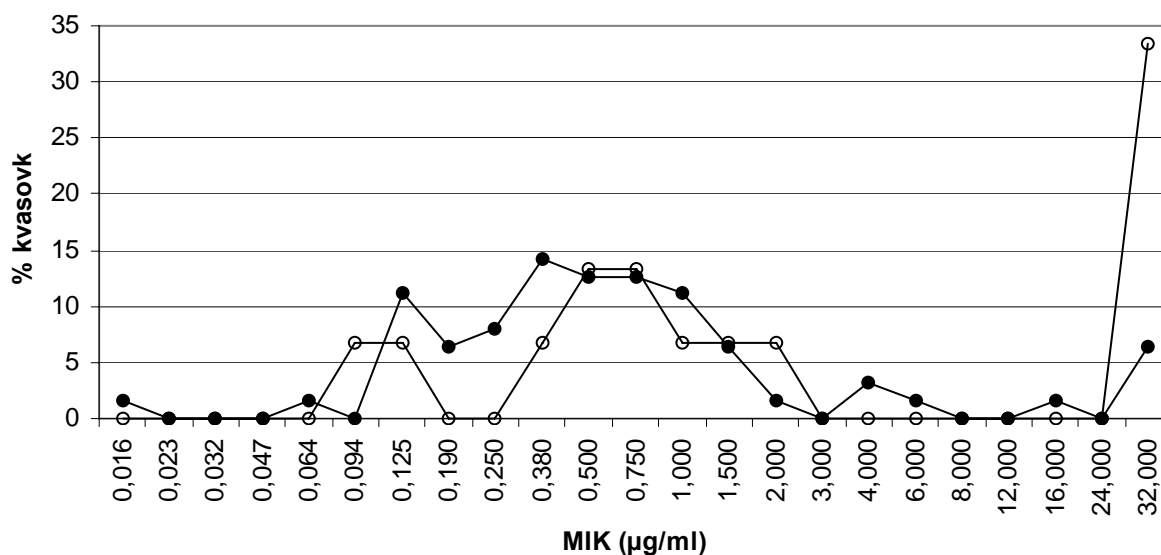
Preglednica 14: Primerjava MIK testiranih antimikotikov pri izolatih *C. glabrata* osamljenih pri bolnikih, z in brez profilaktičnega zdravljenja

<i>C. glabrata</i>		<b>Flukonazol</b>	<b>Vorikonazol</b>	<b>Itrakonazol</b>	<b>Amfotericin B</b>
<b>Profilaktično zdravljenje</b>	št. izolatov	75	63	67	75
	MIC <sub>50</sub>	24,000	0,500	8,000	0,500
	MIC <sub>90</sub>	128,000	4,000	32,000	1,000
	Obm. konc.	0,190-256,000	0,016-32,000	0,008-32,000	0,032-4,000
<b>Brez profilaktičnega zdravljenja</b>	št. izolatov	22	15	16	22
	MIC <sub>50</sub>	32	1	6	0,75
	MIC <sub>90</sub>	256	32	32	1
	Obm. konc.	1,500-256,000	0,094-32,000	0,250-32,000	0,250-1,500
<b>p</b>		0,828	0,047	0,382	0,306



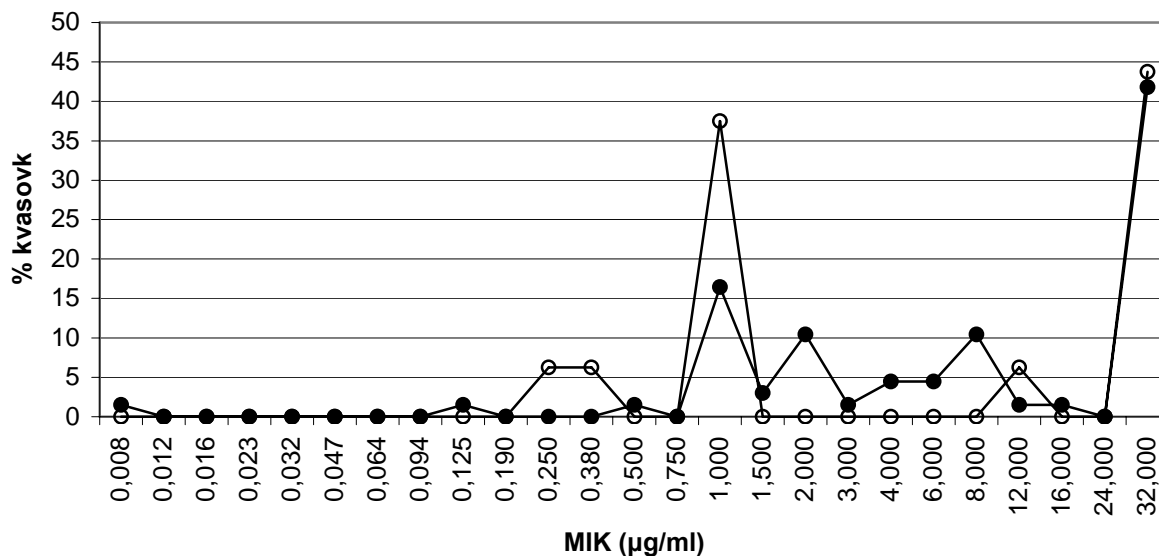
Slika 18: Porazdelitev MIK med izolati kvasovke *C. glabrata* z in brez vpliva profilaktičnega zdravljenja za antimikotik flukonazol

○ — Brez profilakse  
 ● — Z profilakso



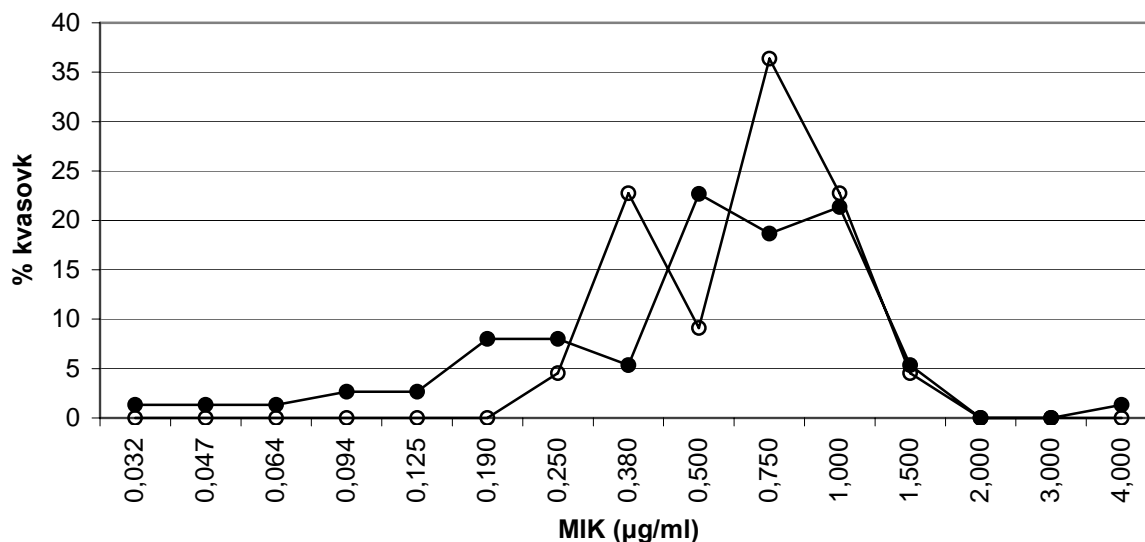
Slika 19: Porazdelitev MIK med izolati kvasovke *C. glabrata* z in brez vpliva profilaktičnega zdravljenja za antimikotik vorikonazol

○ — % Brez profilakse  
 ● — % Z profilakso



Slika 20: Porazdelitev MIK med izolati kvasovke *C. glabrata* z in brez vpliva profilaktičnega zdravljenja za antimikotik itraconazol

○ % Brez profilakse  
 ● % Z profilakso



Slika 21: Porazdelitev MIK med izolati kvasovke *C. glabrata* z in brez vpliva profilaktičnega zdravljenja za antimikotik amfotericin B

○ % Brez profilakse  
 ● % Z profilakso

Naredili smo tudi statistično primerjavo MIK testiranih antimikotikov, med obdobjema za *C. albicans*, kjer izolati niso bili izpostavljeni profilaktičnemu zdravljenju. Pri flukonazolu, itrakonazolu in amfotericinu B je statistična primerjava pokazala signifikantno razliko, medtem ko pri vorikonazolu ni bilo statistično pomembne razlike. Takšne primerjave za *C. glabrato* nismo mogli narediti, saj v obdobju 1992-1996 ni bilo izolata, ki ne bi bil pod vplivom profilaktičnega zdravljenja. Rezultati statistične primerjave so zbrani v Preglednici 15.

Preglednica 15: Primerjava MIK testiranih antimikotikov pri izolatih *C. albicans*, osamljenih pri bolnikih, ki niso prejeli profilaktičnega zdravljenja za obdobji 1992-1996 in 2003-2005

<i>C. albicans</i>		Flukonazol	Vorikonazol	Itrakonazol	Amfotericin B
<b>1992-1996</b>	št. izolatov	16	16	16	16
	MIC <sub>50</sub>	0,250	0,008	0,125	0,250
	MIC <sub>90</sub>	2,000	0,032	0,25	0,500
	Obm. konc.	0,125-2,000	0,004-0,047	0,023-0,380	0,094-0,750
<b>2003-2005</b>	št. izolatov	59	43	38	58
	MIC <sub>50</sub>	0,190	0,008	0,032	0,190
	MIC <sub>90</sub>	0,500	0,012	0,250	0,380
	Obm. konc.	0,047-16,000	0,004-0,190	0,006-0,500	0,008-0,750
<b>p</b>		0,033	0,431	0,001	0,006

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

Izhajajoč iz delovne hipoteze, ki pravi, da se je MIK testiranih antimikotikov pri izolatih kvasovk *C. albicans* in *C. glabrata* povečala, zaradi povečane uporabe antimikotikov, smo prišli do sledečih zaključkov in sklepov.

### 5.1 RAZPRAVA

V zadnjem desetletju se je incidenca glivičnih okužb povečala. Vzrok temu je predvsem povečanje števila bolnikov v intenzivnih enotah, povečanje in dolgotrajna uporaba širokospektralnih antibiotikov, hematološke bolezni, ter zdravljenje z visokimi odmerki kortikosteroidov. Največje tveganje za okužbe, imajo bolniki po presaditvah krvotvornih matičnih celic in notranjih organov, po zapletenih operativnih posegih trebušne votline in tisti z vstavljenimi katetri (Snydman, 2003).

Zaradi povečanja incidence glivičnih okužb v obdobju zadnjih desetih let, posledično prihaja do večje porabe protiglivnih zdravil. Poleg do sedaj uporabljenih antimikotikov (amfotericin B, ketokonazol, flukonazol, itrakonazol), se v zadnjem času na tržišču pojavljajo nova in varnejša protiglivna zdravila. Mednje sodijo novejši azolni antimikotiki, kot so vorikonazol, ravukonazol in posakonazol. Poleg naštetih, so se na tržišču pojavili tudi antimikotiki iz skupine ehinokandinov. Predstavniki teh so kaspofungin, mikafungin in anidulafungin (Beović B. 2004).

Med glivami so najpogostejše povzročiteljice okužb kvasovke, med katerimi še vedno prevladuje *C. albicans*. Obsežna uporaba flukonazola, je privedla do spremembe v pojavljanju posameznih vrst kvasovk. Tako se v zadnjem času povečuje število okužb, povzročenih s strani ne-albicans vrst rodu *Candida*, med katere sodijo predvsem *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis* in *C. parapsilosis* (Banerjee in sod.,1991; Snydman, 2003).

Zaradi povečane porabe protiglivnih zdravil v zadnjih desetletjih, se postavlja vedno več vprašanj, kako in v kakšni meri ta zdravila vplivajo na občutljivost gliv. Raziskave so pokazale, da je gliva sposobna razviti odpornost proti enemu ali več protiglivnih zdravil. Znano je, da glive uporabljajo različne mehanizme odpornosti, kot so mutacije na genu *ERG 11*, prekomerno izražanje genov *CDR* itd. (Matos in Beović, 2001). Dokazali so, da

se »in vitro«, lahko navzkrižna odpornost proti več azolom, razvije že po štirih dneh izpostavljenosti glive flukonazolu (Borst A. in sod., 2005).

Kljub povečani uporabi protiglivnih zdravil, pa je bilo v eni izmed raziskav dokazano, da se odpornost kvasovk rodu *Candida* v desetih letih ni bistveno spremenila (Chen in sod., 2003).

Vprašanje odporosti kvasovk, tako ostaja odprta tema za nadaljnje raziskave.

Na KOHKC v Ljubljani, kjer je potekal del diplomske naloge, smo poskušali ugotoviti, ali se je občutljivost kvasovk, izoliranih iz nadzornih kužnin tamkajšnjih bolnikov, med obdobjema 1992-1996 in 2003-2005, spremenila.

V obdobju 1992-1996 so bolniki na KOHKC kot profilaktično zdravljenje uporabljali dva azolna antimikotika, ketokonazol in flukonazol. Slednji se je začel v večjem obsegu uporabljati šele v letu 1993. V tem obdobju so uporabljali tudi amfotericin B kot profilaktično zdravilo, vendar samo pri bolnikih s povišanim tveganjem za nastanek glivičnih okužb s plesnimi. Amfotericin B so v tem obdobju uporabljali za zdravljenja glivičnih okužb, ob poslabšanju klinične slike, če je bolnik ob tem že prejemal profilakso z azoli. V obdobju 2003-2005 je bilo glavno profilaktično zdravilo flukonazol, pridružila pa sta se še itrakonazol in vorikonazol. Predvsem slednji se je uporabljal pri bolnikih s povišanim tveganjem za razvoj okužb z ne-albicans vrstami rodu *Candida* in plesnimi. Prav tako so bolniki prejemali tudi amfotericin B, vendar v manjšem obsegu, kot v prvem obdobju, medtem ko ketokonazola v obdobju 2003-2005 niso prejemali.

### **5.1.1 Pridobivanje izolatov kvasovk iz stalnih gojišč**

V prvem delu naloge smo skušali iz stalnih gojišč Laboratorija za diagnostiko glivičnih okužb na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo v Ljubljani, pridobiti čim več izolatov gliv kvasovk, vrst *C. albicans* in *C. glabrata*, osamljenih iz nadzornih kužnin bolnikov, ki so se zdravili na KOHKC v obdobju 1992-1996. Osamljeni izolati gliv med obdobjem od zasaditve na stalno gojišče do izvedbe naše diplomske naloge niso bili presajani in so tako ohranili lastnosti, ki so jih imeli ob osamitvi. Oživili smo 87 izolatov *C. albicans* in 73 izolatov *C. glabrata* (Preglednica 4). Iz rezultatov je razvidno, da je delež oživelih izolatov

*C. albicans* bistveno višji (85%) od deleža oživelih izolatov *C. glabrata* (25%), zato bi bilo v prihodnje potrebno skrajšati čas med presaditvami izolatov na stalnih gojišč, kar posebno velja za izolate *C. glabrata*. Izolate smo nato pripravili za testiranje občutljivosti za štiri antimikotike, flukonazol, itrakonazol, vorikonazol in amfotericin B, in v drugem delu rezultate občutljivosti primerjali z izolati, ki so bili osamljeni v letih 2003-2005.

### **5.1.2 Primerjava občutljivosti izolatov *C. albicans* in *C. glabrata* osamljenih v obdobjih 1992-1996 in 2003-2005**

V drugem delu naloge smo primerjali občutljivost izolatov *C. albicans* in *C. glabrata* osamljenih v obdobju 1992-1996 s tistimi, ki so bili osamljeni v obdobju 2003-2005. Ugotovili smo, da so bile MIK vseh štirih testiranih antimikotikov pri izolatih *C. albicans* osamljenih v prvem obdobju, statistično značilno višje, v primerjavi z izolati iz kasnejšega obdobja (Preglednica 9). Prav tako so bile MIK itrakonazola pri izolatih *C. glabrata* osamljenih v prvem obdobju statistično značilno višje v primerjavi z izolati iz kasnejšega obdobja (Preglednica 11). Glede na podatke o porabi antimikotikov, ki so kvantitativno ovrednoteni šele v zadnjih letih in kažejo na stalni porast uporabe antimikotikov na KOHKC (ustni vir – dr. Zver), smo bili ob teh rezultatih presenečeni.

V literaturi smo našli le eno raziskavo, ki je podobno kot naša diplomska naloga, proučevala občutljivost izolatov *Candida* spp. za flukonazol v 10 letnem obdobju. Ugotovili so, da kljub povečani porabi antimikotikov v tem obdobju, ni prišlo do statistično značilne spremembe odpornosti na ta antimikotik (Chen in sod., 2003). Ob natančnejšem pregledu naših rezultatov smo ugotovili, da je delež bolnikov iz prvega obdobja, ki niso prejeli profilaktičnega zdravljenja bistveno manjši (19,0 %) od skupine bolnikov iz drugega proučevanega obdobja (44,7 %), kar bi do neke mere lahko razložilo omenjene rezultate.

Domnevamo, da je višja odpornost v obdobju 1992-1996, predvsem posledica uporabe ketokonazola in flukonazola. Številne raziskave so potrdile prisotnost navzkrižne odpornosti med azoli, kot so flukonazol, itrakonazol, vorikonazol in ketokonazol. Dokazano je tudi, da lahko kvasovka, izpostavljena starejšim antimikotikom, razvije navzkrižno odpornost na novejša azole, kot je vorikonazol (Panackal in sod., 2006). Višje MIK amfotericina B pri izolatih *C. albicans* iz obdobja 1992-1996, so verjetno posledica

večje uporabe le tega, saj je bila izbira antimikotikov takrat skromnejša kot danes. Razlike v MIK amfotericina B, pri *C. glabrati* nismo dokazali (Preglednica 9).

V našo diplomsko nalogo smo vključili le po en izolat na bolnika, vendar izvor izolatov ostaja neznan. Prav tako ne vemo, koliko časa so bili testirani izolati pod vplivom antimikotikov. Čeprav so glive kvasovke iz rodu *Candida* pomembni bolnišnični patogeni je o epidemiologiji le-teh malo znanega. V eni izmed raziskav, kjer so proučevali izvor izolatov so ugotovili, da so lahko izolati pridobljeni tudi eksogeno iz bolnišničnega okolja, bodisi preko rok medicinskega osebja ali posredno preko predmetov (Vazquez in sod., 1998).

Občutljivost glive *C. glabrata* za flukonazol in amfotericin B se med obdobjema ni značilno razlikovala, medtem, ko so bili izolati *C. glabrata* osamljeni v prvem obdobju, značilno bolj občutljivi za vorikonazol, kot izolati osamljeni v drugem obdobju. Vorikonazol se je začel uporabljati šele v drugem proučevanem obdobju, kar bi lahko razložilo porast MIK vorikonazola, v primerjavi z izolati iz prvega proučevanega obdobja.

### **5.1.3 Vpliv profilaktičnega zdravljenja na občutljivost gliv kvasovk za antimikotike**

V tem delu naloge smo skušali ugotoviti kako je profilaktično zdravljenje vplivalo na občutljivost kvasovk na antimikotike. Primerjali smo izolate bolnikov, ki so prejeli profilaktično zdravljenje z antimikotiki s tistimi, ki profilaktičnega zdravljenja niso prejeli.

Vse podatke o profilaktičnem zdravljenju, smo dobili iz popisov bolezni za posameznega bolnika. Bolniki, ki so bili hospitalizirani na KOHKC so v odvisnosti od vrste in oblike bolezni, obiskovali bolnišnico samo v določenih obdobjih, bodisi zaradi poslabšanja stanja ali zaradi zdravljenja osnovne bolezni. Za diplomsko nalogo je problematično predvsem obdobje, ki ga je bolnik prebil doma. Pri določenih bolnikih smo sicer uspeli pridobiti napotke z antimikotičnim zdravljenjem, ki ga je zdravnik predpisal bolniku, vendar je nemogoče vedeti, ali je bolnik zdravila tudi redno prejemal. Določeni bolniki so bili premeščeni iz drugih oddelkov Kliničnega centra ali iz drugih bolnišnic po Sloveniji.



Podatki o profilaktičnem zdravljenju na teh oddelkih so bili mnogokrat v popisih bolnikov nepopolni.

Bolniki na KOHKC, so glede na vrsto hematološke maligne bolezni, prejeli različne oblike zdravljenja. Posrednega ali neposrednega vpliva zdravljenja osnovne bolezni na občutljivost kvasovk za antimikotike ne poznamo. Prav tako absorpcija antimikotikov, kot tudi ostalih zdravil, ni enaka pri vseh bolnikih.

Ugotovili smo, da se pri *C. albicans* statistično značilno razlikujejo MIK flukonazola in amfotericina B (Preglednica 13). MIK so bile višje v skupini bolnikov, ki so prejeli profilaktično zdravljenje, kar kaže na vpliv antimikotičnega profilaktičnega zdravljenja. Vpliva profilaktičnega zdravljenja na občutljivost za vorikonazol in itrakonazol nismo dokazali. Pri *C. albicans* MIK slednjih antimikotikov namreč niso značilno različne ( $p > 0,05$ ). Pri izolatih *C. glabrata* osamljenih pri bolnikih z ali brez profilaktičnega zdravljenja z antimikotiki se MIK flukonazola, itrakonazola in amfotericina B niso statistično razlikovale.

Izjema je bil le vorikonazol, pri katerem se je izkazalo, da so njegove MIK statistično značilno višje v skupini bolnikov, ki profilaktičnega zdravljenja niso prejeli (Preglednica 14). Menimo, da je vzrok za ta presenetljiv rezultat predvsem majhno število izolatov (samo 15 izolatov). Tudi za ostale tri antimikotike, rezultate težko komentiramo, saj tudi tu število izolatov *C. glabrata* osamljenih pri bolnikih brez profilaktičnega zdravljenja ni presegalo 22 vzorcev.

Vprašanje, kakšen vpliv ima dolgotrajno shranjevanje kvasovk na njihovo odpornost, ostaja do neke mere odprto. Glede na to, da smo tudi iz obdobja 1992-1996 izolirali visoko odporne seve kvasovk (Preglednica 12), smo mnenja, da shranjevanje nima bistvenega pomena pri spremembi občutljivosti kvasovk. Poleg tega, izolati od prvotnega shranjevanja do izvedbe naše diplomske naloge niso bili presajani iz starih na nova stalna gojišča, kar bi lahko privedlo do sprememb v odpornosti. Domneve v zvezi s tem, bi lahko potrdili ali ovrgli na podlagi rezultatov rednega testiranja občutljivosti shranjenih izolatov. Testiranje bi izvajali v določenih časovnih intervalih, s tem da bi vedno uporabljali isto metodo testiranja.

## 5.2 SKLEPI

- Z diplomsko nalogo smo dokazali, da so se MIK večine testiranih antimikotikov pri izolatih kvasovk *C. albicans* in *C. glabrata*, osamljenih iz nadzornih kužnin, v obdobju 2003-2005 znižale v primerjavi z izolati osamljenimi v obdobju 1992-1996.
- Hipotezo o zmanjšanju občutljivosti, zaradi povečane uporabe antimikotikov v zadnjih desetletjih, smo ovrgli.
- Pri izolatih *C. albicans* so bile v obdobju 1992-1996 MIK flukonazola, itrakonazola, vorikonazola in amfotericina B, statistično značilno višje, kot v obdobju 2003-2005.
- Pri izolatih *C. glabrata* so bile v obdobju 1992-1996 samo MIK itrakonazola višje, kot v obdobju 2003-2005. MIK vorikonazola, so bile višje v obdobju 2003-2005, medtem ko za flukonazol in amfotericin B nismo dokazali statistično pomembnih razlik med obdobjema.
- Pri izolatih *C. albicans* osamljenih pri bolnikih, ki so prejeli profilaktično zdravljenje in tistimi, ki te niso prejeli, ni statistično pomembnih razlik v MIK vorikonazola in itrakonazola, medtem ko so MIK flukonazola in amfotericina B pri bolnikih brez profilaktičnega zdravljenja statistično značilno nižje, kot pri bolnikih s profilaktičnim zdravljenjem.

## 6 POVZETEK

Glive kvasovke so preprosti evkarionti, ki jih uvrščamo v samostojno kraljestvo. V medicini so najpomembnejše kvasovke rodu *Candida* in veljajo za najpogostejše povzročitelje oportunističnih okužb. Najbolj pogosta med njimi je *C. albicans*, sledijo *C. glabrata*, *C. parapsilosis* in *C. tropicalis*. Kvasovke z drugimi mikroorganizmi sestavljajo normalno človeško floro. Ob motenem ravnovesju z njimi, pride do obolenja, ki je lahko površinsko, v hujših primerih pa tudi sistemsko. Poznanih je veliko dejavnikov tveganja za nastanek oportunističnih okužb (Matos, 2002). O virulenčnih dejavnikih ni veliko znanega. Za zdravljenje se uporabljajo antimikotiki, med katerimi se največ uporabljajo azoli in polieni. Zaradi njihove uporabe se v zadnjih desetletjih pojavlja vedno večji delež kvasovk, z zmanjšano občutljivostjo na tovrstna zdravila. Naša diplomska naloga je temeljila na primerjavi občutljivosti izolatov kvasovk *C. albicans* in *C. glabrata* iz obdobja 1992-1996 in 2003-2005. Namen je bil ugotoviti, ali se je občutljivost kvasovk spremenila zaradi povečane uporabe antimikotikov. Pri vseh izolatih smo testirali občutljivost za antimikotike flukonazol, vorikonazol, itrakonazol in amfotericin B, z metodo difuzije antimikotičnega gradienta (Etest). Za statistično primerjavo MIK iz obeh obdobja, smo uporabili Mann - Whitney-ev U test. Statistična primerjava MIK izolatov *C. albicans*, je pokazala, da so bile MIK vseh testiranih antimikotikov, višje v obdobju 1992-1996, kot v obdobju 2003-2005. Pri izolatih *C. glabrata* je bila razlika MIK flukonazola in amfotericina B neznatna. MIK itrakonazola so bile statistično značilno višje v obdobju 1992-1996, medtem ko so bile MIK vorikonazola višje v obdobju 2003-2005. Za vsako kvasovko posebej smo ugotavljali tudi vpliv profilaktičnega zdravljenja na MIK antimikotikov. Statistična primerjava pri *C. albicans* je pokazala signifikantno razliko pri flukonazolu in amfotericinu B, s tem da so bile MIK obeh antimikotikov višje pri izolatih osamljenih pri skupini s profilaktičnim zdravljenjem. Spremembe v občutljivosti na vorikonazol in itrakonazol nismo dokazali. Pri izolatih *C. glabrata* smo signifikantno razliko dokazali samo pri vorikonazolu, s tem da je bila manj občutljiva pri skupini brez profilakse. Z diplomsko nalogo smo dokazali, da se je občutljivost kvasovk *C. albicans* in *C. glabrata* osamljenih iz bolnikov na KOHKC v obdobju 1992-1996 povečala v primerjavi z obdobjem 2003-2005. Posledično smo hipotezo, da se je občutljivost kvasovk zaradi povečane uporabe antimikotikov zmanjšala, ovrgli.

## 7 VIRI

Banerjee S.N., Emori T.G., Culver D.H., Gaynes R.P., Jarvis W.R., Horan T. 1991. Secular trends in nosocomial primary bloodstream infections in the united states. *American Journal of Medicine*, 91, 3B: 86S-89S

Barret-Bee K., Hayes Y., Wilson R.G., Ryley J.F. 1985. A comparison of phospholipase activity, cellular adherence and pathogenicity of yeasts. *Journal of General Microbiology*, 131, 5: 1217-1221

Barns S.M., Lane D.J., Sogin M.L., Bibeau C., Weisburg W.G. 1991. Evolutionary relationships among pathogenic *Candida* species and relatives. *Journal of Bacteriology*, 173, 7: 2250-2255

Beck-Sague C.M., Jarvis T.R. 1993. Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections in the United States. *Journal of Infectious Diseases*, 167, 5: 1247-1251

Beović B., Lejko-Zupanc T. 2004. Novosti v zdravljenju glivičnih okužb. *Medicinski Razgledi*, 43, 2: 83-96

Birch M., Robson G., Law D., Denning D.W. 1996. Evidence of multiple extracellular phospholipase activities of *Aspergillus fumigatus*. *Infection and Immunity*, 64, 3: 751-755

Borst A., Raimer M.T., Warnock D.W., Morrison C.J., Arthington-Skaggs B.A. 2005. Rapid acquisition of stable azole resistance by *Candida glabrata* isolates obtained before the clinical introduction of fluconazole. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49, 2: 783-787

Bow E.J., Laverdiere M., Lussier N., Rotstein C., Cheang M.S., Ioannou S. 2002. Antifungal prophylaxis for severely neutropenic chemotherapy recipients: a meta analysis of randomized-controlled clinical trials. *Cancer*, 94, 12: 3230-3246

Brooks G. F., Butel J.S., Ornston L.N., Jawetz E., Melnick J.L., Adelberg E.A. 1998. Jawetz, Melnick & Adelberg`s medical microbiology. 21<sup>st</sup> ed. Norwalk, Appleton & Lange: 583 - 615

Calderone R.A., Fonzi W.A. 2001. Virulence factors of *Candida albicans*. Trends in Microbiology, 9, 7: 327-335

Cassone A., DeBernardis F., Mondello F., Ceddia T., Agatensi L. 1987. Evidence for a correlation between proteinase secretion and vulvovaginal candidosis. Journal of Infectious Diseases, 156, 5: 777-783

Chandra J., Kuhn D.M., Mukherjee P.K., Hoyer L.L., McCormick T., Ghannoum M.A. 2001. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. Journal of Bacteriology, 183, 18: 5385-5394

Chavez M., Bernal S., Valverde A., Gutierrez M.J., Quindos G., Mazuelos E.M. 1999. In-vitro activity of voriconazole (UK-109,496), LY303366 and other antifungal agents against oral *Candida* spp. isolates from HIV-infected patients. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 44, 5: 697-700

Chen S.C., Muller M., Zhou J.Z., Wright L.C., Sorrell T.C. 1997. Phospholipase activity in *Cryptococcus neoformans*: a new virulence factor? Journal of Infectious Diseases, 175, 2: 414-420

Chen Y.C., Chang S.C., Luh K.T., Hsieh W.C. 2003. Stable susceptibility of *Candida* blood isolates to fluconazole despite increasing use during the past 10 years. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 52, 1: 71-77

Cornely O.A., Bohme A., Buchheidt D., Glasmacher A., Kahl C., Karthaus M., Kern W., Kruger W., Maschmeyer G., Ritter J., Salwender H.J., Sandherr M., Schiel X., Schuttrumpf S., Sieniawski M., Silling G., Ullmann A.J., Wolf H.H. 2003. Prophylaxis of invasive fungal infections in patients with hematological malignancies and solid tumors--

guidelines of the Infectious diseases working party (AGIHO) of the German society of hematology and oncology (DGHO). *Annals of Hematology*, 82, 2: 186-200

Cruciani M., Mengoli C., Malena M., Bosco O., Serpelloni G., Grossi P. 2006. Antifungal prophylaxis in liver transplant patients: A systematic review and meta-analysis. *Liver Transplantation*, 12, 5: 850-858

Deacon J. W. 1997. *Modern mycology*. Oxford, Osney Mead: 1-28

The Fungi. 2005. Chicago, Illinois, Doctorfungus Corporation (december 2005)  
<http://www.doctorfungus.org/imageban/synonyms/Torulopsis.htm> (januar 2006): 1 str.

Epstein J.B., Koimiyana K., Duncan D., 1986. Oral tropical steroids and secondary oral candidiasis. *Journal of Medicine*, 41: 223 - 227

Etest. 2006. Solna, Sweden, AB Biodisk (march 2006)  
[http://www.abbiotest.com/bd\\_litt\\_prodPackIns.html](http://www.abbiotest.com/bd_litt_prodPackIns.html) (march 2006): 1 str.

Fidel P.L., Vazquez J.A., Sobel J.D. 1999. *Candida glabrata*: Review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*. *Clinical Microbiology Reviews*, 12, 1: 80-96

Ghannoum M.A., Rice L.B. 1999. Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 12, 4:501-517

Hajjeh R.A., Sofair A.N., Harrison L.H., Lyon G.M., Arthington-Skaggs B.A., Mirza S.A., Phelan M., Morgan J., Lee-Yang W., Ciblak M.A., Benjamin L.E., Sanza L.T., Huie S., Yeo S.F., Brandt M.E., Warnock D.W. 2004. Incidence of bloodstream infections due to *Candida* species and in vitro susceptibilities of isolates collected from 1998 to 2000 in a population-based active surveillance program. *Journal of Clinical Microbiology*, 42, 4: 1519-1527

Hawser S.P., Daouglas L.J. 1994. Biofilm formation by *Candida* species on the surface of catheter materials *in vitro*. *Infection and Immunity*, 62, 3: 915-921

Haynes K. 2001. Virulence in *Candida* species. *Trends in Microbiology*, 9, 12: 591-596

Hostetter M.K. 1994. Adhezins and ligands involved in the interaction of *Candida* spp. With epithelial and endothelial surfaces. *Clinical Microbiology Reviews*, 7, 1: 29-42

Hube B., Ruchel R., Monod M., Sanglard D., Odds F.C. 1998. Functional aspects of secreted *Candida* proteinases. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 436: 339-344

Ibrahim A.S., Mirbod F., Filler S.G., Yoshiko B., Cole G., Kitajima Y., Edwards J.E., Jr., Nosawa Y., Ghannoum M.A. 1995. Evidence implicating phospholipase as a virulence factor of *Candida albicans*. *Infection and Immunity*, 63, 5: 1993-1998

Karabinis A., Hill C., Leclercq B., Tancrede C., Baume D., Andremont A. 1988. Risk factors for candidemia in cancer patients: a case-control study. *Journal of Clinical Microbiology*, 26, 3: 429-432

Klotz S.A., Drutz D., Harrison J.L., Huppert M. 1983. Adherence and penetration of vascular endothelium by *Candida* yeasts. *Infection and Immunity*, 42, 1: 374-384

Komshian S.V., Uwaydah A.K., Sobel J.D., Crane L.R. 1989. Fungemia caused by *Candida* species and *Torulopsis glabrata* in the hospitalized patient: frequency, characteristics, and evaluation of factors influencing outcome. *Reviews of Infectious Diseases*, 11, 3: 379-390

Kvaal C., Lachke S.A., Srikantha T., Daniels K., McCoy J., Soll D.R. 1999. Misexpression of the opaque-phase-specific gene *PEP1* (*SAP1*) in the white phase of *Candida albicans* confers increased virulence in a mouse model of cutaneous. *Infection and Immunity*, 67, 12: 6652-6662

Manfredi M., McCullough M.J., Polonelli L., Conti S., Al-Karaawi Z.M., Vescovi P., Porter S.R. 2006. In vitro antifungal susceptibility to six antifungal agents of 229 *Candida* isolates from patients with diabetes mellitus. *Oral Microbiology and Immunology*, 21, 3: 177-182

Matos T., Beović B. 2001. Odpornost na protiglivična zdravila. *Medicinski razgledi*, 40, 2: 65-72

Matos T. 2002. Oportunistične glive. V: *Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo*. Gubina M., Ihan A. (ur.). Ljubljana: *Medicinski razgledi* : 481-499

Miller M.G., Johnson A.D. 2002. White opaque switching in *Candida albicans* is controlled by mating-type locus homeodomain proteins and allows efficient mating. *Cell*, 110, 3: 293-302

Mukherjee P.K., Ghannoum M.A. 2002. Secretory proteins in fungal virulence. V: Calderone R.A., Cihlar R.L., (eds.) *Fungal pathogenesis: Principles and clinical applications*. New York, Marcel Dekker. 51-79.

Odds F.C., Bernaerts R. 1994. CHROMagar *Candida*, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important *Candida* species. *Journal of Clinical Microbiology*, 32: 1923-1929

Odds F.C. 1988. *Candida* and candidosis. 2<sup>nd</sup> ed. Baltimore, W.B. Sanders Company: 480 str. Cit. po.: Fidel P.L., Vazquez J.A., Sobel J.D. 1999. *Candida glabrata*: Review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*. *Clinical Microbiology Reviews*, 12, 1: 80-96

Onishi J., Mainz M., Thompson J., Curotto J., Dreikorn S., Rosenbach M., Douglas C., Abruzzo G., Flattery A., Kong L., Cabello A., Vicente F., Pelaez F., Diez M.T., Martin I., Bills G., Giacobbe R., Dombrowski A., Schwartz R., Morris S., Harris G., Tsipouras A.,



Wilson K., Kurtz M.B. 2000. Discovery of novel antifungal (1,3)-beta-D-glucan synthase inhibitors. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44, 2: 368-377

Ostrosky-Zeichner L., Rex J.H., Pappas P.G., Hamill R.J., Larsen R.A., Horowitz H.W., Powderly W.G., Hyslop N., Kauffman C.A., Cleary J., Mangino J.E., Lee J. 2003. Antifungal susceptibility survey of 2,000 bloodstream *Candida* isolates in the United States. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47, 10: 3149-3154

Panackal A.A., Gribskov J.L., Staab J.F., Kirby K.A., Rinaldi M., Marr K.A. 2006. Clinical significance of azole antifungal drug cross-resistance in *Candida glabrata*. *Journal of Clinical Microbiology*, 44, 5: 1740-1743

Pappas P.G., Rex J.H., Sobel J.D., Filler S.G., Dismukes W.E., Walsch T.J., Edwards J.E. 2004. Guidelines for treatment of candidiasis. *Clinical Infectious Diseases*, 38, 2: 161-189

Pfaller M.A., Bale M., Buschelman B., Lancaster M., Espinel-Ingroff A., Rex J.H., Rinaldi M.G. 1994. Selection of candidate quality control isolates and tentative quality control ranges for in vitro susceptibility testing of yeast isolates by National Committee for Clinical Laboratory Standards proposed standard methods. *Journal of Clinical Microbiology*, 32, 7: 1650-1653

Pfaller M.A., Rex J.H., Rinaldi M.G. 1996. Antifungal susceptibility testing: technical advances and potential clinical applications. *Clinical Infectious Diseases*, 24, 5: 776-84

Pfaller M.A., Messer S.A., Hollis R.J., Jones R.N., Diekema D.J. 2002. In vitro activities of ravuconazole and voriconazole compared with those of four approved systemic antifungal agents against 6,970 clinical isolates of *Candida* spp. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46, 6: 1723-1727

Pfaller M.A., Diekema D.J. 2004. Twelve years of fluconazole in clinical practice: global trends in species distribution and fluconazole susceptibility of bloodstream isolates of *Candida*. *Clinical Microbiology and Infection*, 10, 1: 11-23

Pfaller M.A., Messer S.A., Boyken L., Tendolkar S., Hollis R.J., Diekema D.J. 2004a. Geographic variation in the susceptibilities of invasive isolates of *Candida glabrata* to seven systemically active antifungal agents: a global assessment from the ARTEMIS Antifungal Surveillance Program conducted in 2001 and 2002. *Journal of Clinical Microbiology*, 42, 7: 3142-3146

Pfaller M.A., Messer S.A., Boyken L., Rice C., Tendolkar S., Hollis R.J., Diekema D.J. 2004b. Cross-resistance between fluconazole and ravuconazole and the use of fluconazole as a surrogate marker to predict susceptibility and resistance to ravuconazole among 12,796 clinical isolates of *Candida* spp. *Journal of Clinical Microbiology*, 42, 7: 3137-3141

Pomerantz S., Sarosi G.A., 1992. Fungal diseases in AIDS. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 5: 226-230

Rex J.H., Pappas P.G., Karchmer A.W., Sobel J., Edwards J.E., Hadley S., Brass C., Vazquez J.A., Chapman S.W., Horowitz H.W., Zervos M., McKinsey D., Lee J., Babinchak T., Bradsher R.W., Cleary J.D., Cohen D.M., Danziger L., Goldman M., Goodman J., Hilton E., Hyslop N.E., Kett D.H., Lutz J., Rubin R.H., Scheld W.M., Schuster M., Simmons B., Stein D.K., Washburn R.G., Mautner L., Chu T.C., Panzer H., Rosenstein R.B., Booth J. 2003. A randomized and blinded multicenter trial of high-dose fluconazole plus placebo versus fluconazole plus amphotericin B as therapy for candidemia and its consequences in nonneutropenic subjects. *Clinical Infectious Diseases*, 36, 10: 1221-1228

Richet H.M., Andremont A., Tancrede C., Pico J.L., Jarvis W.R. 1991. Risk factors for candidemia in patients with acute lymphocytic leukemia. *Reviews of Infectious Diseases*, 13, 2: 211-215

Ross I.K., DeBernardis F., Emerson G.W., Cassone A., Sullivan P.A. 1990. The secreted aspartate proteinase of *Candida albicans*: physiology of secretion and virulence of a proteinase-deficient mutant. *Journal of General Microbiology*, 136, 4: 687-694

Schwartz R.S., Mackintosh F.R., Schrier S.L., Greenberg P.L. 1984. Multivariate analysis of factors associated with invasive fungal disease during remission induction therapy for acute myelogenous leukemia. *Cancer*, 53, 3: 411-419

Scythes K.D., Louie M., Simor A.E. 1996. Evaluation of nutritive capacities of 10 broth media. *Journal of Clinical Microbiology*, 34, 7:1804-1807

Sewell D.L., Pfaller M.A., Barry A.L. 1994. Comparison of broth macrodilution, broth microdilution, and E test antifungal susceptibility tests for fluconazole. *Journal of Clinical Microbiology*, 32, 9: 2099-2102

Sheehan D.J., Hitchcock C.A., Sibley C.M. 1999. Current and emerging azole antifungal agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12, 1: 40-79

Sinnott J.T. 4th, Cullison J.P., Sweeney M.P. 1987. *Candida (Torulopsis) glabrata*. *Infection Control*, 8, 8: 334-336

Snydman D.R. 2003. Shifting patterns in the epidemiology of nosocomial *Candida* infections. *Chest*, 123: 500-503

Sobel J.D., Muller G., Buckley H.R. 1984. Critical role of germ tube formation in the pathogenesis of candidal vaginitis. *Infection and Immunity*, 44, 3: 576-580

Soll D.R. 1992. High-frequency switching in *Candida albicans*. *Clinical Microbiology Reviews*, 5, 2:183-203

Soll D.R. 1997. Gene regulation during high-frequency switching in *Candida albicans*. *Microbiology*, 143: 279-288

Vazquez J.A., Dembry .LM., Sanchez V., Vazquez M.A., Sobel J.D., Dmuchowski C., Zervos M.J. 1998. Nosocomial *Candida glabrata* colonization: an epidemiologic study. *Journal of Clinical Microbiology*, 36, 2: 421-426

Walsh T.J., Pappas P., Winston D.J., Lazarus H.M., Petersen F., Raffalli J., Yanovich S., Stiff P., Greenberg R., Donowitz G., Schuster M., Reboli A., Wingard J., Arndt C., Reinhardt J., Hadley S., Finberg R., Laverdiere M., Perfect J., Garber G., Fioritoni G., Anaissie E., Lee J. 2002. Voriconazole compared with liposomal amphotericin B for empirical antifungal therapy in patients with neutropenia and persistent fever. *New England Journal of Medicine*, 346, 4: 225-234

Wey S.B., Mori M., Pfaller M.A., Woolson R.F., Wenzel R.P. 1989. Risk factors for hospital-acquired candidemia. A matched case-control study. *Archives of Internal Medicine*, 149, 10: 2349-2353

Whelan W.L., Simon S., Beneke E.S., Rogers A.L. 1984. Auxotrophic variants of *Torulopsis glabrata*. *FEMS Microbiology Letters*, 24: 1-4

Whittaker R.H. 1969. New concepts of kingdoms of organisms. *Science*, 163: 150-160

Yang Y.L. 2003. Virulence factors of *Candida* species. *Journal of Microbiology, Immunology, and Infection*, 36, 4: 223-228

## **ZAHVALA**

Iskreno se zahvaljujem mentorici prof. dr. Katji Seme, za sprejeto mentorstvo in potrpežljivosti pri izdelavi diplomske naloge.

Posebej se zahvaljujem somentorici asist. dr. Tadeji Matos za nesebično in dosledno pomoč pri strokovnem usmerjanju, ter svetovanju pri izdelavi diplomske naloge.

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

Zahvala gre tudi laborantkama Tatjani Marinko in Janji Svolfjšak za strokovno pomoč pri praktičnem laboratorijskem delu.

Posebna zahvala gre tudi dr. Samotu Zveru in tajništvu Kliničnega oddelka za hematologijo Kliničnega centra v Ljubljani, za priskrbitev podatkov o bolnikih, ter dr. Janezu Ravniku za pomoč pri statistični obdelavi podatkov.

Iz srca pa se zahvaljujem mojima staršema, ki sta me potrpežljivo spremljala na moji težavni poti do zaključka študija.

## PRILOGE

Priloga A: Recepture gojišč uporabljenih v diplomski nalogi. Vse sestavine se uporabljajo na 1 l destilirane vode.

Gojišče za dolgotrajno shranjevanje izolatov gliv

Sestavine	Masa (g)
Goveji ekstrakt	5,0
Natrijev klorid	3,0
Pepton	10,0
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$	2,0
Agar	10,0

Tioglikolatni bujon (Difco™)

Sestavine	Masa (g)
S slinavko prebavljeni Kazein	15
Kvasni ekstrakt	5
Dekstroza	5,5
Natrijev klorid	2,5
L-Cistin	0,5
Na- tioglikolat	0,5
Resazurin	0,001
Agar	0,75

Sabouraud dekstrozni agar (SABA)

Sestavine	Masa (g)
Neopepton	10
Dekstroza	40
Agar	19

Koruzni agar (KRA)

Sestavine	Masa (g)
Koruzna moka	40
Dekstroza	10
Agar	10
Tween 80	10

Nadaljevanje Priloga A: Recepture gojišč uporabljenih v diplomski nalogi. Vse sestavine se uporabljajo na 1 l destilirane vode.

Kromogeno gojišče (CH)

Sestavine	Masa (g)
Kromaton ( CHROMagar pepton)	10,2
Posebna kromogena mešanica	22,0
Kloramfenikol	0,5
Agar	15,0

RPMI 1640 gojišče

Sestavine	Masa (g)
RPMI 1640	10,4
Glukoza	20,0
MOPS 0,165M	34,5
Agar	15,0
L- glutamin	0,3