

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Maja PEČOVNIK

**MOLEKULARNA OPREDELITEV KLINIČNIH
IZOLATOV GLIVE *Cryptococcus neoformans***

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij – 2. stopnja Mikrobiologija

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Maja PEČOVNIK

MOLEKULARNA OPREDELITEV KLINIČNIH IZOLATOV GLIVE
Cryptococcus neoformans

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij – 2. stopnja Mikrobiologija

MOLECULAR IDENTIFICATION OF CLINICAL ISOLATES OF
FUNGI *Cryptococcus neoformans*

M. SC. THESIS

Master Study Programmes: Field Microbiology

Ljubljana, 2016

Magistrsko delo je zaključek magistrskega študija programa 2. stopnje Mikrobiologije. Delo je bilo opravljeno v Laboratoriju za diagnostiko glivičnih infekcij, na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani in na Oddelku za klinično mikrobiologijo in infekcijske bolezni, v Bolnišnici Canisius – Wilhelmina, v Nijmegenu na Nizozemskem.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje je za mentorico magistrskega dela imenovala doc. dr. Tadejo Matos in za recenzentko prof. dr. Eva Ružić Sabljić.

Mentorica: doc. dr. Tadeja Matos

Recenzentka: prof. dr. Eva Ružić Sabljić

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Nina GUNDE CIMERMAN

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Mentorica: doc. dr. Tadeja MATOS

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

Recenzentka: prof. dr. Eva RUŽIĆ SABLJIC

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

Datum zagovora:

Podpisana izjavljam, da je naloga rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Maja Pečovnik

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)

ŠD Du2

DK UDK 579.61:582.282.23:577.2.08(043)=163.6

KG glive/kvasovke/*Cryptococcus neoformans* /oportunistični patogeni/molekularne metode/tipizacijske metode/PCR/AFLP

AV PEČOVNIK, Maja, dipl. biol. (UNI)

SA MATOS, Tadeja (mentorica)/ RUŽIĆ SABLJIĆ, Eva (recenzentka)

KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij mikrobiologije

LI 2016

IN MOLEKULARNA OPREDELITEV KLINIČNIH IZOLATOV GLIVE *Cryptococcus neoformans*

TD Magistrsko delo (Magistrski študij – 2. stopnja Mikrobiologija)

OP X, 57 str., 6 pregl., 19 sl., 48 vir.

IJ sl

JI sl/en

AI Gliva *Cryptococcus neoformans* je bazidiomicetna kvasovka, ki v zadnjem času vzbuja v mikrobiološki in medicinski javnosti čedalje večje zanimanje. Je oportunistični patogen, povzročitelj kriptokokoze, ki se najpogosteje odraža v vnetju možganskih ovojnici in številnih drugih kliničnih manifestacijah. V Sloveniji populacija *C. neoformans* še ni bila molekularno – biološko raziskana, kar je v nasprotju z globalnim trendom, ki z opredelitvijo serotipov, paritvenih tipov in genotipov v posameznih državah pripomore k razumevanju sestave in dinamike kriptokokne populacije ter virulence posameznih tipov *C. neoformans*. Namen naše raziskave je bil opredeliti serotipe, genotipe in paritvene tipe populacije *C. neoformans* v Sloveniji, z uporabo molekularne tipizacijske metode dolžinski polimorfizem restriksionskih fragmentov (AFLP) ter na podlagi dendrogramov opredeliti sorodnost med posameznimi izolati. V raziskavo smo vključili seve *C. neoformans*, ki so bili osamljeni iz različnih kužnin v Laboratoriju za diagnostiko glivičnih infekcij, Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani, med leti 1998 in 2016. Skupno število bolnikov pri katerih je bila osamljena gliva *C. neoformans* je bilo 19, v raziskavo je bilo vključeno 46 sevov. Največ izolatov (63,0 %) smo uvrstili v serotip D oz. genotip AFLP2/VNIV, 34,8 % izolatov v serotip A oz. genotip AFLP1/VNI in 2,2 % izolatov v serotip AD oz. genotip AFLP3/VNIII. 95,7 % vseh izolatov pripada paritvenemu tipu α.

KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)

DN Du2

DC UDC 579.61:582.282.23:577.2.08(043)=163.6

CX fungi/yeasts/*Cryptococcus neoformans* /opportunistic pathogens/molecular methods/typing methods/ PCR/AFLP

AU PEČOVNIK, Maja

AA MATOS, Tadeja (supervisor)/RUŽIĆ SABLJIĆ, Eva (reviewer)

PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study in Microbiology

PY 2016

TI MOLECULAR IDENTIFICATION OF CLINICAL ISOLATES OF FUNGI
Cryptococcus neoformans

DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes: Field Microbiology)

NO X, 57 p., 6 tab., 19 fig., 48 ref.

LA sl

AL sl/en

AB The fungus *Cryptococcus neoformans* is a basidiomycete yeast, which is raising an increasing interest in microbiological and medical public in recent times. It is an opportunistic pathogen, the cause of cryptococcosis, which is reflected in the inflammation of the meninges and many other clinical manifestations. In Slovenia the population of *C. neoformans* has not yet been molecular - biologically explored, which is in contrast to global trends. The definition of the serotypes, mating types and genotypes in each country contributes to the understanding of the structure and dynamics of cryptococcal population and virulence of certain *C. neoformans* types. The aim of our study was to identify the serotypes, mating types and genotypes of *C. neoformans* population in Slovenia with the use of molecular typing method AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) and to identify similarities between different isolates on the basis of dendograms. The study included samples of different specimens from the Laboratory for diagnosis of fungal infections of the Institute of Microbiology and Immunology, Faculty of Medicine, University of Ljubljana, where the fungus *C. neoformans* were isolated between 1998 and 2016. The total number of patients whose samples were used in the study was 19, all together we have tested 46 samples. Most of the isolates (63.0%) were included in the serotype D, respectively genotype AFLP2/VNIV, 34.8% of isolates of serotype A, respectively genotype AFLP1/VNI and 2.2% of isolates serotype AD, respectively genotype AFLP3/VNIII. 95.7% of the isolates belong to mating type α.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)	III
KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD).....	IV
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	X
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA	2
1.2 HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 OSNOVNE ZNAČILNOSTI GLIVE <i>Cryptococcus neoformans</i>	3
2.2 SEROTIPI, GENOTIPI, PARITVENI TIPI GLIVE <i>C. neoformans</i>	4
2.2.1 Serotipi.....	4
2.2.2 Genotipi	5
2.2.3 Razmnoževanje (parjenje) in paritveni tipi	6
2.3 TIPIZACIJA KRIPTOKOKOV	8
2.3.1 Metoda AFLP za tipizacijo <i>Cryptococcus</i> spp.....	9
2.3.1.1 Restrikcija in ligacija	10
2.3.1.2 Preselektivni PCR	10
2.3.1.3 Selektivni PCR.....	10
2.4 EPIDEMIOLOGIJA	11
2.5 PATOGENEZA IN VIRULENTNI DEJAVNIKI	15
2.5.1 Osnovne značilnosti patogenosti	16
2.5.2 Dejavniki virulence, ki vplivajo na stopnjo patogenosti	17
2.5.2.1 Kapsula	17
2.5.2.2 Sinteza melanina	18
2.5.2.3 Producija manitola	19
2.5.2.4 Drugi faktorji virulence	19
2.6 KLINIČNE MANIFESTACIJE.....	19

2.6.1	Pljučna kriptokokoza	20
2.6.2	Kriptokokoza centralnega živčnega sistema	20
2.6.3	Kriptokokoza ostalih organov	21
2.7	DIAGNOSTIKA	22
2.8	ZDRAVLJENJE IN PREPREČEVANJE.....	24
3	MATERIAL IN METODE.....	25
3.1	VZORCI.....	25
3.2	GOJIŠČA	27
3.3	OŽIVLJANJE KULTUR SEVOV.....	27
3.4	IZOLACIJA CELOKUPNE DNA.....	28
3.5	TIPIZACIJA Z METODO AFLP	28
3.5.1	Restrikcija in ligacija	28
3.5.1.1	Priprava osnovne encimske mešanice.....	29
3.5.1.2	Redčenje restrikcijsko – ligacijske mešanice.....	29
3.5.2	Preselektivni PCR.....	30
3.5.3	Selektivni PCR	30
3.6	KAPILARNA ELEKTROFOREZA.....	32
3.7	ANALIZA REZULTATOV	32
4	REZULTATI	33
4.7	REZULTATI MOLEKULARNE TIPIZACIJE	33
4.8	DENDROGRAMI	35
4.8.1	Skupni dendrogram.....	35
4.8.2	Dendrogrami po bolnikih.....	37
4.8.2.1	Bolnik A.....	37
4.8.2.2	Bolnik B	37
4.8.2.3	Bolnik C	38
4.8.2.4	Bolnik Č	38
4.8.2.5	Bolnik D	39
4.8.2.6	Bolnik E	40
4.8.2.7	Bolnik F	41
4.8.2.8	Bolnik G	42

4.8.2.9	Bolnik H.....	42
5	RAZPRAVA	44
6	SKLEPI	49
7	POVZETEK.....	50
8	VIRI.....	52

ZAHVALA

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Vrste <i>Cryptococcus neoformans</i> in <i>Cryptococcus gattii</i> s pripadajočimi serotipi, AFLP genotipi in molekularnimi genotipi (Bovers in sod., 2008b; Cogliati, 2013).	6
Preglednica 2: Podatki bolnikov, vključenih v raziskavo.	26
Preglednica 3: Nazivi vzorcev, uporabljenih v analizi in število izolatov glive <i>Cryptococcus neoformans</i> osamljenih iz posamezne skupine vzorcev.	27
Preglednica 4: Termični cikli preselektivne amplifikacije.	30
Preglednica 5: Termični cikli selektivne amplifikacije.	31
Preglednica 6: Podatki posameznih sevov glive <i>Cryptococcus neoformans</i> , ki so bili uporabljeni v študiji.	33

KAZALO SLIK

Slika 1: Sorte <i>Cryptococcus neoformans</i> in pripadajoči serotipi (Lengeler in sod., 2001)	5
Slika 2: Spolno razmnoževanje med paritvenimi tipi istega in nasprotnega tipa (Kozubowski in Heitman, 2012)	8
Slika 3: Incidenca kriptokokoze v Franciji v letih od 1985 do 2014 (Institut Pasteur, 2016)	12
Slika 4: Incidenca in umrljivost zaradi kriptokoknega meningitisa na različnih področjih, od leta 1997 do 2007 (Park in sod., 2009)	13
Slika 5: Svetovna geografska razpršenost različnih serotipov glive <i>Cryptococcus neoformans</i> (Antinori, 2013)	14
Slika 6: Patogeneza okužbe z glivama <i>Cryptococcus neoformans</i> in <i>Cryptococcus gattii</i> (Mitchell, 2013)	16
Slika 7: Gliva <i>Cryptococcus neoformans</i> s kapsulo, vidna pod mikroskopom (Baddley in Dismukes, 2011)	22
Slika 8: Kolonije glive <i>Cryptococcus neoformans</i> na Sabouraudovem gojišču (Andreoni in sod., 2004)	23
Slika 9: Kolonije glive <i>Cryptococcus neoformans</i> na »Bird seed« agarju (Andreoni in sod., 2004)	23
Slika 10: Skupni dendrogram izoliranih sevov glive <i>Cryptococcus neoformans</i>	36
Slika 11: Dendrogram izoliranih sevov glive <i>Cryptococcus neoformans</i> pri bolniku A. Na dendrogramu so prikazani odstotki sorodnosti med izolati glede na genotip	37
Slika 12: Dendrogram izoliranih sevov glive <i>Cryptococcus neoformans</i> pri bolniku B. Na dendrogramu so prikazani odstotki sorodnosti med izolati glede na genotip	38
Slika 13: Dendrogram izoliranih sevov glive <i>Cryptococcus neoformans</i> pri bolniku C. Na dendrogramu so prikazani odstotki sorodnosti med izolati glede na genotip	38
Slika 14: Dendrogram izoliranih sevov glive <i>Cryptococcus neoformans</i> pri bolniku Č. Na dendrogramu so prikazani odstotki sorodnosti med izolati glede na genotip	39
Slika 15: Dendrogram izoliranih sevov glive <i>Cryptococcus neoformans</i> pri bolniku D. Na dendrogramu so prikazani odstotki sorodnosti med izolati glede na genotip	40
Slika 16: Dendrogram izoliranih sevov glive <i>Cryptococcus neoformans</i> pri bolniku E. Na dendrogramu so prikazani odstotki sorodnosti med izolati glede na genotip	41
Slika 17: Dendrogram izoliranih sevov glive <i>Cryptococcus neoformans</i> pri bolniku F. Na dendrogramu so prikazani odstotki sorodnosti med izolati glede na genotip	41
Slika 18: Dendrogram izoliranih sevov glive <i>Cryptococcus neoformans</i> pri bolniku G. Na dendrogramu so prikazani odstotki sorodnosti med izolati glede na genotip	42
Slika 19: Dendrogram izoliranih sevov glive <i>Cryptococcus neoformans</i> pri bolniku H. Na dendrogramu so prikazani odstotki sorodnosti med izolati glede na genotip	43

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AFLP	dolžinski polimorfizem pomnoženih fragmentov (angl. Amplified Fragment Length Polymorphism)
AT	aspirat traheje
BAL	bronhoalveolarni izpirek
DOPA	3,4-dihidroksifenilalanin (angl. 3,4-dihydroxyphenylalanine)
ELISA	encimsko imunski test (angl. Enzyme - Linked Immuno Sorbent Assay)
GXM	glukuronoksilomanan (angl. Glucuronoxylosemannan)
HIV	virus humane imunske pomanjkljivosti (angl. Human Immunodeficiency Virus)
MALDI – TOF	ionizacija v matriksu z lasersko desorpcijo (angl. Matrix - Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry)
MLEE	multilokusna encimska elektroforeza (angl. Multi - Locus Enzyme Electrophoresis)
MLMT	multilokusno mikrosatelitsko tipiziranje (angl. Multilocus Microsatellite Typing)
MLST	tipizacija na osnovi multilokusnih zaporedij (angl. Multi - Locus Sequence Typing)
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. Polymerase Chain Reaction)
RAPD	naključna amplifikacija polimorfne DNA (angl. Random Amplification of Polymorphic DNA)
RFLP	polimorfizem dolžin restrikcijskih fragmentov (angl. Restriction Fragment Length Polymorphism)
SABA	Sabouradovo gojišče

1 UVOD

Inkapsulirana bazidiomicetna kvasovka *Cryptococcus neoformans*, povzročiteljica kriptokokoze, lahko povzroči smrtno nevarne okužbe, med katere v prvi vrsti sodi meningoencefalitis (Hagen in sod., 2012). Kriptokokoza ima visoko incidenco zlasti pri bolnikih okuženih z virusom humane imunske pomanjkljivosti (HIV), ter pri drugih z drugimi osnovnimi boleznimi, ki imajo okrnjen imunski odziv zaradi drugih vzrokov (zdravljenje s presaditvijo organov in krvotvornih matičnih celic, kemoterapija, biološka zdravila) (Hagen in sod., 2012). Sprva so bile okužbe s *C. neoformans* bolj redke, šele s pojavom pandemije virusa HIV v začetku 80. let 19. stoletja, je prišlo posledično do porasta okužb s *C. neoformans* (Bovers in sod., 2008a). Letno skoraj milijon okuženih z virusom imunske pomanjkljivosti razvije kriptokokozo. Kritično je predvsem območje Podsaharske Afrike, kjer večina bolnikov umre zaradi nedostopnosti do antiretrovirusnega in drugega zdravljenja (Park in sod., 2009).

Glede na trenutne taksonomske razvrstitev, rod *Cryptococcus* šteje več kot 50 vrst, vendar sta le vrsti *C. neoformans* in *C. gatti* pogost vzrok kriptokoknih bolezni pri ljudeh in živalih. Vrsta *C. gattii* je bila priznana kot primarni patogen, *C. neoformans* pa kot povzročitelj oportunističnih okužb. Slednja vrsta je razdeljena na dva serološka tipa, ki ustreza vsak svoji vrsti, in sicer *C. neoformans* - serotip A in *C. deneoformans* - serotip D. *C. neoformans* var. *gattii* (serotipa B in C), so opredelili kot ločeno vrsto, ki so jo poimenovali *C. gattii* (Bovers in sod., 2008a). Znotraj vrst *C. neoformans* in *C. gattii* se pojavlja skupno devet genotipov, ki se med seboj razlikujejo glede na geografsko porazdelitev, serotipe in ekološki izvor (Boekhout in sod., 2001; Bovers in sod., 2008a).

Življenjski cikel obeh patogenih vrst je sestavljen iz vegetativne in spolne faze rasti, z dvema značilnima paritvenima tipoma a in α (MAT α in MAT α) (Cogliati, 2013). Obstoječega razmnoževanja je pomembna lastnost za širjenje genetske variabilnosti glive, kar povečuje verjetnost za razvoj in ohranjanje patogenih lastnosti (Kozubowski in Heitman, 2012).

Opredelitev seroloških tipov, paritvenih tipov in genotipov izolatov glive *C. neoformans* pripomore k razumevanju sestave in dinamike kriptokokne populacije in virulence posameznih tipov *C. neoformans*.

1.1 NAMEN DELA

- Genotipizacija populacije *Cryptococcus neoformans* v Sloveniji.

1.2 HIPOTEZE

- Predvidevamo, da so v Sloveniji prisotni genotipi AFLP1/VNI, AFLP2/VNIV in AFLP3/VNIII.
- Predvidevamo, da so posamezni bolniki okuženi z genotipsko unikatnim sevom.
- Predvidevamo, da je pri bolnikih z dolgotrajno okužbo prisotnih več genotipsko različnih sevov.

2 PREGLED OBJAV

2.1 OSNOVNE ZNAČILNOSTI GLIVE *Cryptococcus neoformans*

Cryptococcus neoformans je bazidiomicetna klinično pomembna vrsta kvasovke, ki povzroča infekcije pri živalih in ljudeh skoraj na vseh področjih sveta (Viviani in Tortorano, 2009). Je predstavnik rodu *Cryptococcus*, oziroma *Filobasidiella* (spolna oblika razmnoževanja), ki ga uvrščamo v družino *Tremellaceae*, red *Tremellales* in razred *Tremellomycetes* (NCBI, 2015). Rod *Cryptococcus* je polifiletski rod, ki vključuje več kot 50 vrst okoljskih kvasovk (Bogovič, 2015; Mitchell, 2013; Viviani in Tortorano, 2009). *C. neoformans* in *C. gattii* sta za človeka edini patogeni vrsti iz rodu *Cryptococcus*, zaradi njune edinstvene sposobnosti rasti pri 37 °C. Občasno lahko povzročajo okužbe pri ljudeh tudi druge vrste, kot so *C. albidus*, *C. laurentii* in *C. curvatus* (Viviani in Tortorano, 2009).

Mikroskopsko so celice glive *C. neoformans* brsteče kvasovke, sferično ovalnih oblik, obdane s polisaharidno kapsulo, katere velikost je odvisna od genetike in pogojev rasti (prehranjevanje, vsebnost CO₂ v okolju, temperatura). Premer celice kvasovke variira med 2 in 5 µm pri sevih brez kapsule, oziroma pri slabo kapsuliranih sevih. Pri močno kapsuliranih sevih se premer giblje med 30 in 80 µm. V naravi in pri osamitvi ima večina sevov tanko kapsulo, medtem ko so za seve, ki okužijo tkivo značilne debele kapsule. *C. neoformans* raste aerobno pri temperaturi med 25 in 37 °C. Na klasičnih mikrobioloških gojiščih jih prepoznamo po svetlečih in sluzastih kolonijah belo krem barve (Viviani in Tortorano, 2009).

C. neoformans je ubikvitaren mikroorganizem, kar pomeni, da se pojavlja po vsem svetu. To vrsto v naravi zlahka osamimo iz suhih golobjih iztrebkov, dreves in tal, ki so zaradi ptičjih iztrebkov bogata z dušikom. V ugodnih pogojih lahko preživi tudi do dve leti. *C. gattii* je manj pogosta vrsta in je bolj kozmopolitska kot se je sprva mislilo. Poleg evkaliptov, so kot ekološko nišo prepoznali tudi nekatere sredozemske rastline. Značilna je predvsem za tropска in subtropska območja ter za mediteranska geografska področja. Obe vrsti povzročata kriptokokozo, ki je posledica vdihavanja izsušenih blastokonidijev in manjših bazidiospor (Viviani in Tortorano, 2009).

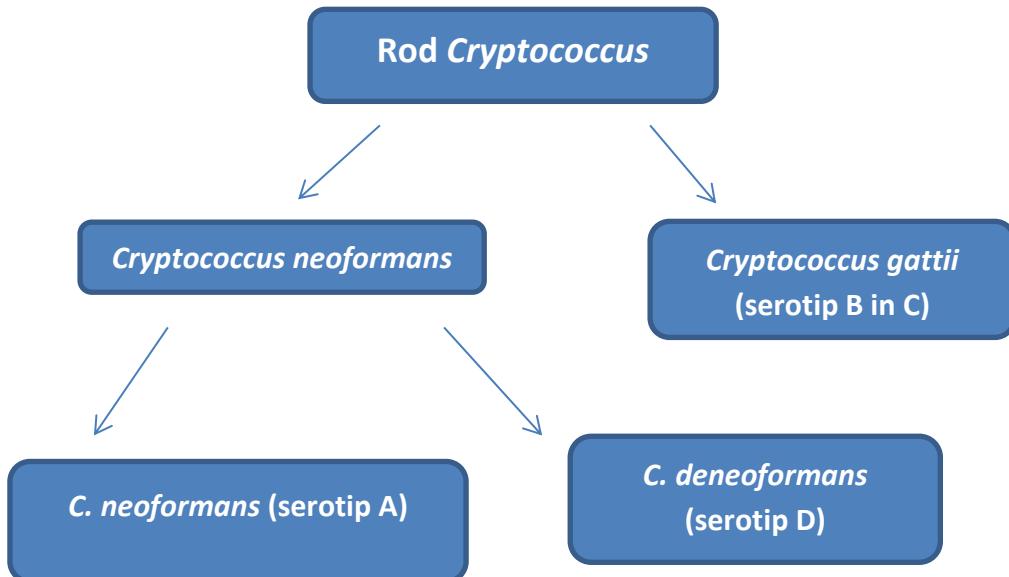
Za razliko od *C. gattii*, ki v 70 - 80 % povzroča bolezen pri imunsko zdravih osebah (večinoma povzroča pljučnico) (Bogovič, 2015), je *C. neoformans* oportunistična patogena gliva, ki povzroča okužbe pri imunsko oslabljenih osebah (Mitchell, 2013; Viviani in Tortorano, 2009). Najpogosteje zbolijo bolniki okuženi z virusom HIV, ogrožene pa so tudi osebe po presaditvi organov, bolniki na dolgotrajni terapiji z glukokortikoidi in bolniki z različnimi rakavimi obolenji. Pri sicer zdravih osebah poteka okužba v večini primerov brez simptomov in znakov (Bogovič, 2015). Skoraj popolna odsotnost vrste *C. gattii* pri bolnikih okuženih z virusom HIV, kaže na veliko razliko v mehanizmu virulence v primerjavi z vrsto *C. neoformans* (Speed in Dunt, 1995).

2.2 SEROTIPI, GENOTIPI, PARITVENI TIPI GLIVE *C. neoformans*

2.2.1 Serotipi

Ustrezno prepoznavanje vrst je v biologiji pomembno, saj tako lažje opredeljujemo patogenost, odpornost in virulentnost mikroorganizma. Pri *C. neoformans* so pričeli kompleksen pojem biološke vrste uporabljati s pričetkom opazovanja parjenja (Kwon - Chung, 1975).

Vrsti *C. neoformans* in *C. gattii* ločimo na podlagi številnih razlik, ki vključujejo geografsko porazdelitev, ekološko nišo, epidemiologijo, patobiologijo, klinično sliko in molekularne značilnosti (Cogliati, 2013). Vrsta *C. neoformans* se dalje razdeli na dva serološka tipa znotraj vrste, in sicer *C. neoformans*, ki predstavlja serotip A in *C. deneoformans*, serotip D. Prav tako obstaja tudi AD hibrid med obema serološkima tipoma (Lengeler in sod., 2001). Vrsta *C. gatti* je klasificirana v dva različna serotipa, serotip B in serotip C (Bartlett in sod., 2012). Delitev sort glive *C. neoformans* na serotipe je prikazana na sliki 1. Serotipe izolatov določimo s PCR analizo gena *RUM1* (Arsic - Arsenijevic in sod., 2014).



Slika 1: Sorte *Cryptococcus neoformans* in pripadajoči serotipi (Lengeler in sod., 2001).

2.2.2 Genotipi

Genotipizacija izolatov patogene glive *C. neoformans*, predлага precejšnje genetsko razhajanje med *C. neoformans* in *C. deneoformans* na eni, in *C. gattii* na drugi strani (Boekhout in sod., 2001). Znotraj vrst *C. neoformans* in *C. gattii* je trenutno poznanih devet molekularnih genotipov. Vrsta *C. neoformans* se razdeli na genotipe VNI, VNII, VNB, VNIII in VNIV, znotraj vrste *C. gattii* pa so značilni genotipi VGI, VGII, VGIII in VGIV (preglednica 1). Za genotipizacijo kriptokokov se uporablja različne molekularne tipizacijske metode, vendar pa je najpogosteje uporabljena tipizacijska metoda AFLP (dolžinski polimorfizem pomnoženih fragmenotov), ki ima pred ostalimi številne prednosti (Cogliati, 2013).

Skupno se znotraj vrst *C. neoformans* in *C. gattii* pojavlja devet AFLP genotipov (preglednica 1) (Bovers in sod., 2008b). *C. neoformans* uvrščamo v AFLP genotip 1, *C. deneoformans* v AFLP genotip 2, hibrid oba omenjenih vrst pa v AFLP genotip 3. Genotip AFLP1 se razdeli še na dva podtipa, in sicer genotip AFLP1A in AFLP1B. Sevi *C. gattii* pripadajo AFLP genotipom 4, 5, 6 in 7. Medvrstnemu hibridu med *C. gattii* in *C. deneoformans* pripisujemo AFLP genotip 8, hibridu med *C. gattii* in *C. neoformans* pa

genotip 9 (Bovers in sod., 2008b). Genotipizacija sevov *Cryptococcus* spp. nam omogoča ugotoviti ali je kriptokokoza povzročena z enim genotipom ali predstavlja sočasno okužbo z dvema ali več genotipi (Guinea in sod., 2010).

Preglednica 1: Vrste *Cryptococcus neoformans* in *Cryptococcus gattii* s pripadajočimi serotipi., AFLP genotipi in molekularnimi genotipi (Bovers in sod., 2008b; Cogliati, 2013).

Vrsta	Serotip	AFLP genotip	Molekularni genotip
<i>C. neoformans</i>	A	AFLP1	VNI
<i>C. neoformans</i>	A	AFLP1A	VNB ali VNII
<i>C. neoformans</i>	A	AFLP1B	VNB ali VNII
<i>C. deneoformans</i>	D	AFLP2	VNIV
<i>C. neoformans</i> x <i>C. deneoformans</i>	AD	AFLP3	VNIII
<i>C. gattii</i>	B ali C	AFLP 4	VGI
<i>C. gattii</i>	B ali C	AFLP5	VGII
<i>C. gattii</i>	B ali C	AFLP6	VGIII
<i>C. gattii</i>	B ali C	AFLP7	VGIV
<i>C. gattii</i> x <i>C. deneoformans</i>	B ali C	AFLP8	/
<i>C. gattii</i> x <i>C. neoformans</i>	B ali C	AFLP9	/

Legenda kratic: AFLP genotip – genotip določen z molekularno metodo dolžinski polimorfizem pomnoženih fragmentov (ang. Amplified Fragment Length Polymorphism).

2.2.3 Razmnoževanje (parjenje) in paritveni tipi

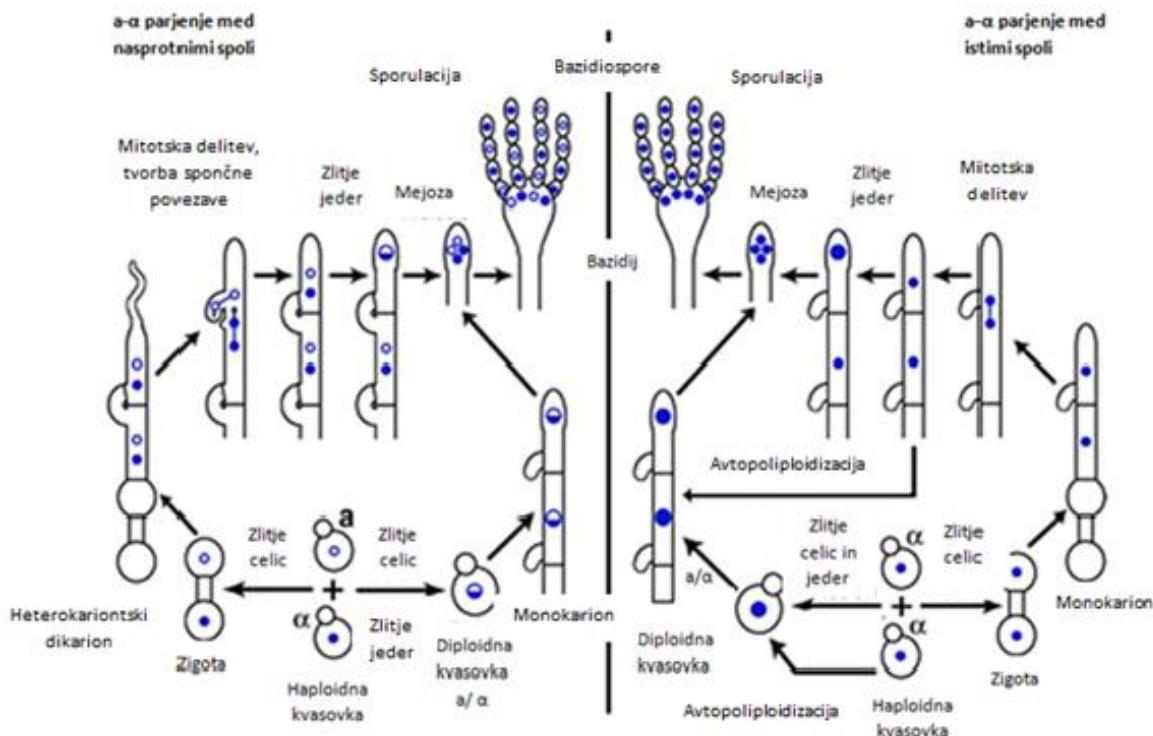
Življenjski cikel *C. neoformans* je sestavljen iz vegetativne in spolne faze rasti, kar imenujemo dimorfni prehod med haploidno obliko kvasovke in diploidno hifo. Najbolj razširjena oblika v naravnem okolju in kliničnih izolatih je enocelična brsteča kvasovka, ki se razmnožuje vegetativno z mitotičnimi delitvami (Kozubowski in Heitman, 2012; Lengeler in sod., 2001).

Poleg nespolnega, vegetativnega razmnoževanja, je za glivo *C. neoformans* značilen tudi spolni cikel razmnoževanja (slika 2). Obstajata dva paritvena tipa kvasnih celic, in sicer paritveni tip α in paritveni tip a, katera določa enotni *MAT* lokus z dvema aleloma (Hull in Heitman, 2002). Med haploidno fazo rasti celice določenega paritvenega tipa zaznajo

celico nasprotnega paritvenega tipa. Celice med parjenjem proizvajajo filamentozno strukturo, imenovano konjugacijska cev, ki se usmeri proti paritvenemu partnerju. Po celični fuziji se ustvari dikariontski micelij, sestavljen iz filamentov, za katere so značilna nekondenzirana starševska jedra in spončne povezave. Pod ustreznimi pogoji v okolju, se konice teh filamentov razvijejo v nabrekle celice, imenovane bazidiji. V tej novo nastali strukturi pride do zlitja jeder (kariogamije), ki mu sledi mejoza, preko katere nastanejo štiri haploidna jedra. Haploidna jedra se v nadaljevanju mitotsko delijo in brstijo izven bazidija, pri čemer ustvarijo štiri dolge verige bazidiospor. Te spore kalijo in proizvajajo vegetativne kvasne celice. Diploidna faza *C. neoformans* je običajno prehodna in je večinoma okoljska, klinični izolati pa so običajno haploidni (Lengeler in sod., 2001).

Poleg parjenja med nasprotnimi paritvenimi tipi, pri *C. neoformans* poznamo tudi istospolno parjenje med enakimi paritvenimi tipi, ki se imenuje monokariontska ali haploidna rodnost (Wickes in sod., 1996). Podobno kot pri parjenju med nasprotnimi paritvenimi tipi, tudi haploidna rodnost vodi v oblikovanje hif in nastanka bazidijev in trosov. Filamenti so pri tej vrsti parjenja monokariontski in spončne povezave niso zlate (Kozubowski in Heitman, 2012).

Parjenje je možen vir hibridnih vrst *C. neoformans*. Hibridi se najpogosteje oblikujejo med serotipi A in D enakih ali nasprotnih paritvenih tipov (α AD α , aAD α , α AD α) in so klinično zelo pomembni. Obstajajo tudi poročila o križancih različnih sevov istega serotipa (α AA α) in križanci med serotipi različnih vrst *C. neoformans* in *C. gattii* (Kozubowski in Heitman, 2012).



Slika 2: Spolno razmnoževanje med paritvenimi tipi istega in nasprotnega tipa (Kozubowski in Heitman, 2012).

2.3 TIPIZACIJA KRIPTOKOKOV

Uporabljajo se številne molekularne tipizacijske metode, za razlikovanje različnih podskupin znotraj posamezne vrste iz rodu *Cryptococcus*, in sicer: multilokusna encimska elektroforeza (MLEE), tipizacija na osnovi multilokusnih zaporedij (MLST), verižna reakcija s polimerazo (PCR), naključna amplifikacija polimorfne DNA (RAPD), polimorfizem dolžin pomnoženih fragmentov (AFLP), polimorfizem dolžin restrikcijskih fragmentov (RFLP), multilokusno mikrosatelitsko tipiziranje (MLMT) in tipizacija z masno spektrometrijo (MALDI-TOF) (Cogliati, 2013).

Kljub temu, da obstajajo številne molekularne tehnike za identifikacijo in genotipizacijo *C. neoformans* in *C. gattii*, so se le metode PCR, AFLP in MLST izkazale kot uspešne za izdelavo primerljivih rezultatov. Najpogosteje se uporablja tipizacijska metoda AFLP, ki ima pred ostalimi številne prednosti (Cogliati, 2013).

2.3.1 Metoda AFLP za tipizacijo *Cryptococcus spp.*

Dolžinski polimorfizem pomnoženih fragmentov (AFLP) je metoda, ki se najpogosteje uporablja za raziskavo genetske strukture in epidemioloških odnosov, pri izbranih izolatih kriptokokov (Boekhout in sod., 2001). Združuje metodo RFLP in fleksibilno tehnologijo, ki temelji na selektivnem PCR namnoževanju restrikcijskih fragmentov, ki so produkt razreza genomske DNA z restrikcijskimi endonukleazami. Stopnja variabilnosti med organizmi je določena z odkrivanjem razlik v prepoznavnih mestih restrikcijskih encimov, ki nastanejo s spremembami v zaporedju nukleotidov (Vos in sod., 1995). AFLP tehnika se uporablja za istočasno vizualizacijo več sto pomnoženih restrikcijskih fragmentov DNA. Vzorci namnoženih fragmentov se lahko uporabljajo v namen spremljanja identitete izolata ali za preverjanje stopnje podobnosti med različnimi izolati iz rodu *Cryptococcus*. Polimorfizmi omogočajo genotipizacijo posameznih vrst in razlikovanje med njimi na podlagi razlik alelov (Applied Biosystems, 2010; Vos in sod., 1995).

Vloga AFLP tehnike v mikrobni tipizaciji vključuje diferenciacijo in sledenje izjemno sorodnih mikrobov in ločevanje na nivoju vrste ali nižje. AFLP tehnika omogoča visoko ločljivost pri genotipizaciji za taksonomsko aplikacijo, odkrivanje polimorfizmov v raziskavah evolucije genoma, določitev povezanosti patogenih organizmov v epidemioloških študijah, mapiranje kloniranih fragmentov bakterij in kvasovk v umetnih kromosomih (Applied Biosystems, 2010).

Glavna prednost metode AFLP pred ostalimi tipizacijskimi metodami je zahtevana majhna količina DNA. Metoda AFLP zaradi uporabe le dveh vrst oligonukleotidnih začetnikov, omogoča dobro primerljivost in ponovljivost rezultatov, kar je v nasprotju z RAPD tipizacijsko metodo, pri kateri se uporablja več samostojnih oligonukleotidnih začetnikov. To vodi v slabšo primerljivost in ponovljivost rezultatov. Prednost je tudi v visoki ločljivosti, zaradi strogih pogojev metode PCR. Tehnika AFLP deluje na različne vzorce DNA, poleg tega pri opravljanju metode ni potrebno predhodno poznavanje nukleotidnega zaporedja genoma preiskovanih mikrobov. Metoda zajema celoten genom in je primerna za ločevanje ozko sorodnih organizmov znotraj vrste (Applied Biosystems, 2010).

Prvi korak tehnike AFLP je restrikcija in ligacija, sledita preselektivni PCR in selektivni PCR. Temu sledi še elektroforeza in obdelava rezultatov v računalniškem programu (Applied Biosystems, 2010).

2.3.1.1 Restrikcija in ligacija

Prvi korak AFLP tehnike je izdelava restriksijskih fragmentov, z uporabo dveh restriksijskih endonukleaz (EcoRI in MseI). Restrikcija in ligacija lahko potekata v eni sami reakciji, v primeru, da so pufri kompatibilni. Če pufri niso kompatibilni, reakciji tečeta zaporedno. Bistvo restrikcije je priprava podlage za adapterje, ligacija pa omogoča lepljenje adapterskih parov na pripravljeno matrično DNA (Applied Biosystems, 2010).

2.3.1.2 Preselektivni PCR

Pri preselektivni amplifikaciji se uporablja dva preselektivna oligonukleotidna začetnika, EcoRI in MseI, poimenovana po restriksijskih encimih. Sekvence adapterjev in restriksijska mesta služijo kot vezavna mesta za oligonukleotidne začetnike za kasnejšo selekcijo, oziroma za selektivno amplifikacijo restriksijskih fragmentov. Samo genomski fragmenti, ki imajo adapter na vsakem koncu, se pomnožijo eksponentno med PCR pomnoževanjem. Ta korak uspešno očisti tarčne sekvene stran od sekven, ki so ojačane samo linearno, se pravi tiste, ki imajo samo en modificiran konec (Applied Biosystems, 2010).

2.3.1.3 Selektivni PCR

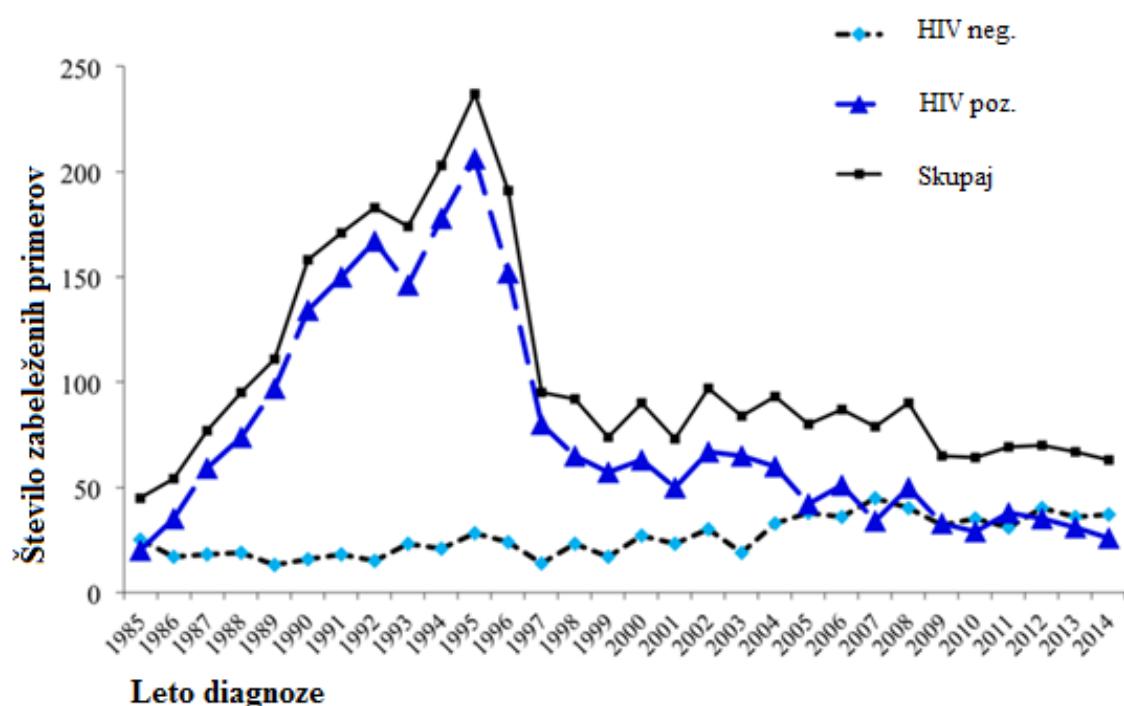
Selektivna amplifikacija teče tako, da zmanjša kompleksnost mešanice in lahko delce kasneje ločimo z elektroforezo na poliakrilamidnem gelu. Pri selektivni amplifikaciji se uporablja bolj selektivni oligonukleotidni začetniki, kot pri preselektivni amplifikaciji. Uporablja se vsega 18 selektivnih oligonukleotidnih začetnikov iz »AFLP Microbial Fingerprinting« kompleta; 9 EcoR1 fluorescentnih oligonukleotidnih začetnikov in 9 MseI oligonukleotodnih začetnikov. V primeru tipizacije kriptokokov se uporablja selektivna oligonukleotidna začetnika EcoR1-AC FAM in MseI-G. Po pomnoževanju s temi oligonukleotidnimi začetniki, je del vzorcev mogoče analizirati na biosistemskem DNA

sekvenatorju. Selektivno pomnoževanje ojači predvsem EcoR1-MseI končne fragmente. EcoR1-EcoR1 fragmenti se ne ojačijo dobro, MseI-MseI fragmenti pa se ne obarvajo, saj ne vsebujejo fluorescentnih barvil (Applied Biosystems, 2010).

2.4 EPIDEMIOLOGIJA

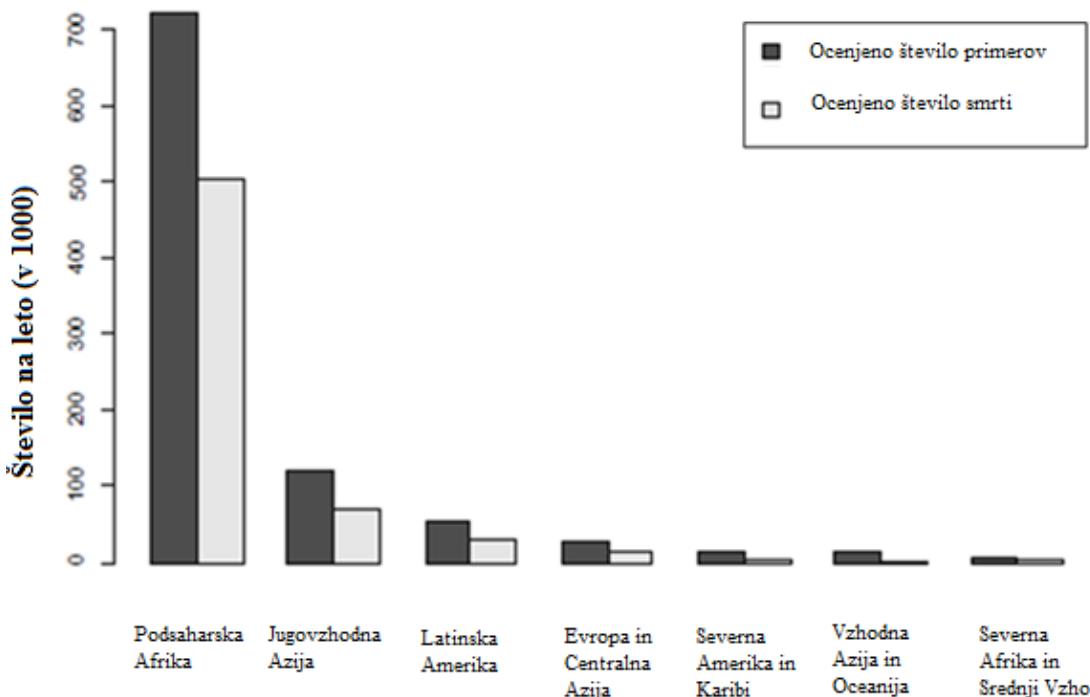
Kriptokokoza je pomembna infekcijska bolezen v svetovnem merilu. Bolezen prizadene predvsem bolnike z okvarjeno celično posredovano imunostjo. Glavni dejavnik tveganja je predhodna okužba z virusom HIV (Sloan in Parris, 2014). Bolnike s HIV-om v glavnem kriptokokoza ogrozi, ko število njihovih limfocitov CD4 (limfociti T, ki pomagajo limfocitom B pri sintezi protiteles) pada pod 100 celic/ μL (Jarvis in Harrison, 2007). Večino preostalih primerov okužb predstavljajo prejemniki imunosupresivne terapije (npr. zdravljenje s kortikosteroidi), bolniki po presaditvi čvrstih organov in krvotvornih matičnih celic in bolniki z rakom. V nekaterih okoljih so za kriptokokozo dovzetne tudi osebe z normalnim imunskim odzivom, predvsem kadar gre za okužbe povzročene z vrsto *C. gattii* (Sloan in Parris, 2014).

V začetku 20. stoletja so o kriptokokozi redko poročali. V začetku leta 1965 so prvič opazili večjo incidenco kriptokokoze, predvsem zaradi napredka v serološki diagnostiki za odkrivanje kriptokoknega polisaharida v telesnih tekočinah (Viviani in Tortorano, 2009). Prevalenca se je drastično zvišala v zadnjih 30. letih s pandemijo HIV-a (Viviani in Tortorano, 2009; Sloan in Parris, 2014). V letih med 1985 in 1993, so poročali o skoraj petkratnem povečanju incidence kriptokokoze v Franciji in v drugih državah po svetu, kot posledica povečanega števila okuženih z virusom HIV (slika 3). Francija je namreč edina država, v kateri se že več let izvaja epidemiološko spremljanje vseh glivnih okužb po celotni državi, podoben trend kriptokokoze pa lahko posplošimo tudi na ostale države po svetu, predvsem države z visokimi standardi (Dromer in sod., 2004). Po razvoju učinkovite protiretrovirusne terapije leta 1997, je pojav novih kriptokoknih okužb v državah z višjim standardom upadel (slika 3) (van Elden in sod., 2000). Primeri kriptokokoze, ki se v teh državah še pojavljajo, so pri ljudeh z neodkrito okužbo z virusom HIV in pri socialno - ekonomsko ogroženih HIV pozitivnih posameznikih, ki nimajo dostopa do protiretrovirusnih zdravil (Viviani in Tortorano, 2009).



Slika 3: Incidenca kriptokokoze v Franciji v letih od 1985 do 2014 (Institut Pasteur, 2016).

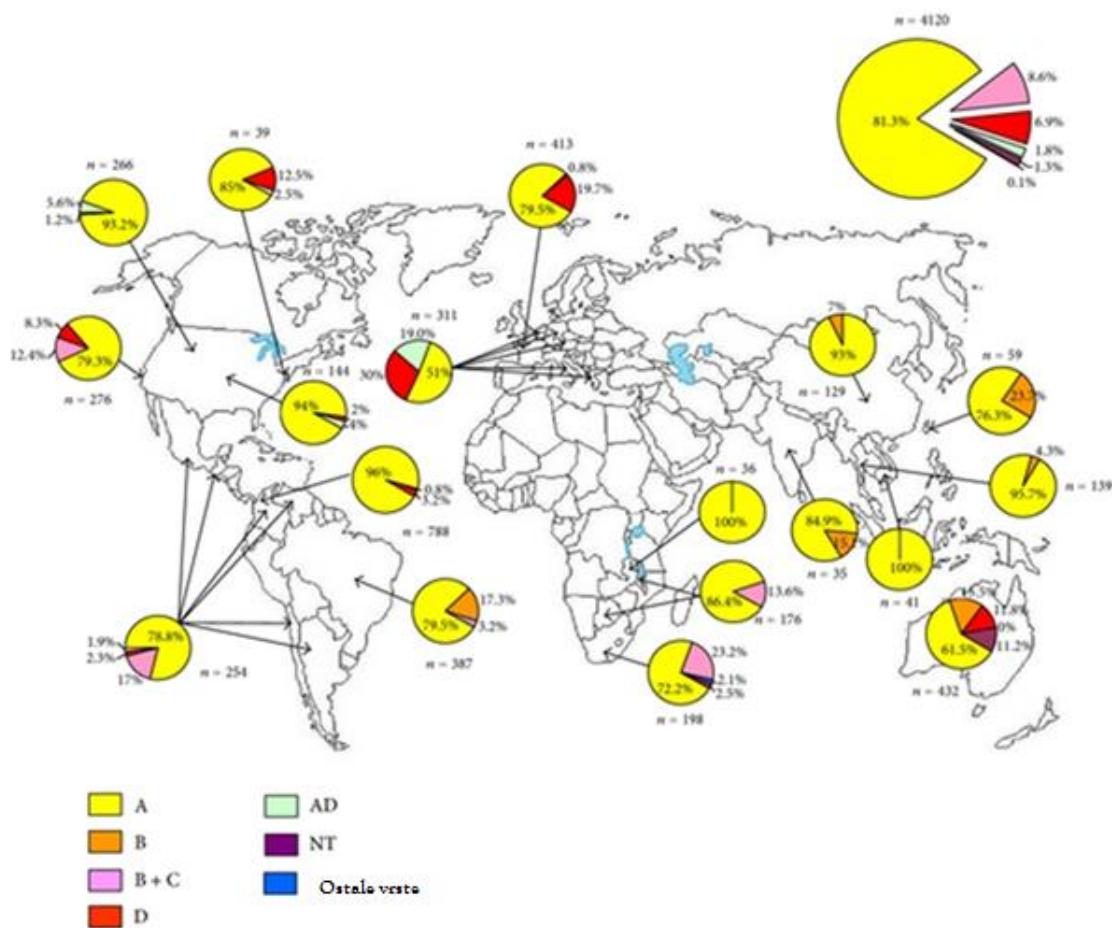
Trend bolezni je v državah v razvoju veliko slabši (slika 4). Podsaharska Afrika od nekdaj velja za območje z največjim deležem s HIV okuženih bolnikov. Zaradi nepopolnega dostopa do protiretrovirusne terapije se incidenca kriptokoknega meningitisa v številnih afriških državah in tudi na področju Jugovzhodne Azije in Latinske Amerike ni zmanjšala ob prehodu v novo tisočletje (Sloan in Parris, 2014). V svetovnem merilu, se letno pojavi okoli 975.900 primerov kriptokoknega meningitisa, od tega je kar 720.000 primerov ocenjenih v Podsaharski Afriki, s 70,0 % smrtnostjo in približno 120.000 primerov v Jugovzhodni Aziji (Bamba in sod., 2012; Park in sod., 2009).



Slika 4: Incidencija in umrljivost zaradi kriptokoknega meningitisa na različnih področjih, od leta 1997 do 2007 (Park in sod., 2009).

Slika 5 prikazuje svetovno geografsko razpršenost različnih serotipov *C. neoformans*. Pri ljudeh je serološki tip *C. neoformans* (serotip A) najpogostejši povzročitelj kriptokokoze po vsem svetu, z izjemo nekaterih predelov Evrope, kjer je prevladujoči serološki tip *C. deneoformans* (serotip D) in se pojavlja hibridi AD (Viviani in Tortorano, 2009; Barchiesi in sod., 2005). V eksperimentalnih živalskih modelih so pri serotipu A ugotovili višjo virulenco, kot pri serotipu D, in prav tako višjo virulenco pri paritvenem tipu α, kot pri paritvenem tipu a (Barchiesi in sod., 2005). Virulanca hibridov AD je predvsem odvisna od kromosomske sestave. Višjo virulenco imajo hibridi, pri katerih večinski genom pripada serotipu A (Hu in sod., 2008). Kljub temu, da za serotipa A in D velja, da pretežno povzročata bolezni pri imunsko oslabljenih posameznikih, je zaskrbljujoče dejstvo novejših raziskav, da se serotip D vse bolj pojavlja tudi pri osebah z normalnim imunskim odzivom (Lui in sod., 2006).

C. gatti (serotip B in C) je povezan z okužbami pri osebah z normalnim imunskim odzivom v tropskih in subtropskih območjih, kjer uspevajo evkaliptusi in sredozemsko rastlinje, in sicer v Avstraliji, Srednji in Južni Ameriki, Indiji, na Kitajskem, Tajske, v Novi Zelandiji in na mediteranskem geografskem območju (Sloan in Parris, 2014). Med izolati *C. gattii* je serotip B pogostejši od serotipa C na vseh območjih, razen na področju Podsaharske Afrike (Viviani in Tortorano, 2009).

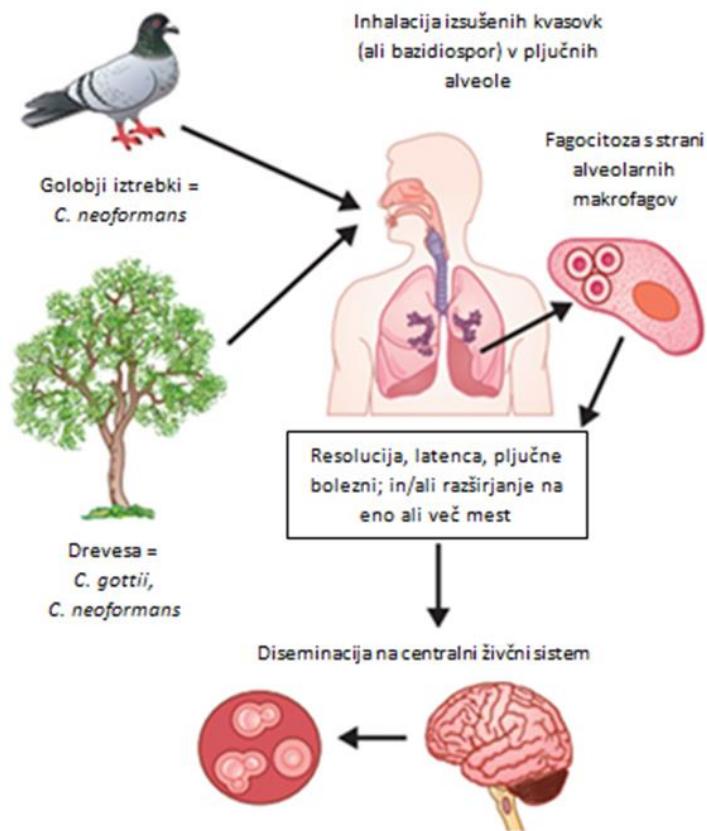


Slika 5: Svetovna geografska razpršenost različnih serotipov glive *Cryptococcus neoformans* (Antinori, 2013).

2.5 PATOGENEZA IN VIRULENTNI DEJAVNIKI

Do okužbe pride z vdihovanjem kvasnih celic, ki so v naravi suhe, minimalno inkapsulirane in enostavno aerosolizirane. Primarna pljučna okužba je večinoma asimptomatska, ali pa so simptomi podobni gripi in spontano izzvenijo. Pri imunsko oslabljenih bolnikih se lahko kvasovke hitro razmnožijo in hematogeno razširijo na druge dele telesa, prednostno na centralni živčni sistem, kjer povzročajo kriptokokni meningitis ali meningoencefalitis. Okužba se redkeje razširi na druge organe, kot so koža, nadledvična žleza, kosti, oči in prostata (slika 6) (Viviani in Tortorano, 2009).

Za uvrstitev med patogene, mora organizem povzročiti okužbo pod določenimi pogoji. Ker so osebe z okrnjenim imunskim odzivom bolj dovetne za okužbe s *C. neoformans*, je ta opredeljen kot oportunistični patogen. Dejavnike, ki omogočajo *C. neoformans*, da povzroči bolezen, lahko razdelimo v dve veliki skupini. Prva obsega osnovne značilnosti glive, ki so potrebne za vzpostavitev okužbe in preživetje v človeškem gostitelju. V drugo skupino spadajo dejavniki virulence, ki vplivajo na stopnjo patogenosti (Buchanan in Murphy, 1998).



Slika 6: Patogeneza okužbe z glivama *Cryptococcus neoformans* in *Cryptococcus gattii* (Mitchell, 2013).

2.5.1 Osnovne značilnosti patogenosti

Za vstop organizma v alveolarne prostore pljuč, mora ta proizvajati viabilne oblike manjše od premera 4 µm. Tipična vegetativna oblika *C. neoformans* je kvasna oblika s premerom celice med 2,5 in 10 µm. Bazidiospore, ki nastanejo pri spolnem razmnoževanju so v premeru velike približno 1,8 - 3 µm, kar ustrezja velikostnemu razredu, ki lahko okuži pljuča (Buchanan in Murphy, 1998).

Druga osnovna značilnost glive, ki ima na podlagi številnih študij prav tako pomemben vpliv na patogenezo so paritveni tipi *C. neoformans*. Kwon - Chung in sod. (1992) so raziskovali paritvene tipe izolatov *C. neoformans* v okoljskih in kliničnih vzorcih in odkrili

30 - 40 krat višjo frekvenco α - paritvenega tipa od a - paritvenega tipa. Študije so pokazale tudi, da so α paritveni tipi bistveno bolj agresivni kot sevi paritvenega tipa a.

Bistvena lastnost, ki omogoča preživetje znotraj človeškega gostitelja je zmožnost rasti pri temperaturi 37 °C (Viviani in Tortorano, 2009), v atmosferi s približno 5 % CO₂ in pri pH 7,3 oziroma 7,4 (Odom in sod., 1997). Razen izolatov vrst *C. neoformans*, *C. gattii* in občasno *C. laurentii* ter *C. albidus*, ostale vrste rodu *Cryptococcus* nimajo sposobnosti rasti pri temperaturi 37 °C in zaradi tega za človeka niso patogene (Viviani in Tortorano, 2009). Za sposobnost rasti pri 37 °C mora imeti organizem nepoškodovan gen, ki kodira kalcinevrin A (Odom in sod., 1997). Po aktivaciji kalcinevrina, ki je posledica glivičnega stresa, lahko kalcinevrin defosforilira specifične proteine, ki so odgovorni za patogenost in rast v gostiteljskem organizmu. Kalcinevrin A mutante ne morejo preživeti *in vitro* pri temperaturi 37 °C, v atmosferi s 5 % CO₂ in alkalnem pH. Iz tega sledi, da omenjene mutante ne morejo preživeti v človeškem gostitelju. V podporo tem spoznanjem so Odom in sod. (1997) dokazali, da mutante niso patogene za imunsko oslabljene kunce. Zdi se, da je kalcinevrin A osnovni pogoj za preživetje *C. neoformans* v človeškem gostitelju in nujno potreben dejavnik patogenosti omenjene kvasovke.

2.5.2 Dejavniki virulence, ki vplivajo na stopnjo patogenosti

Virulentni dejavniki povečujejo stopnjo patogenosti mikroba. *C. neoformans* ima številne virulentne dejavnike. Splošno virulenco izolata je tako nemogoče pripisati zgolj posameznemu dejavniku, temveč je ta odvisna od skupnega delovanja mnogih dejavnikov, ki skupaj povzročajo napredajočo bolezen. Glavni virulentni dejavniki so kapsula kriptokokov, proizvodnja melanina in manitola ter potencialni dejavniki, ki vključujejo superoksid dismutazo, proteazo, fosfolipazo in drugi. Polisaharidi kapsule in topne ekstracelične sestavine *C. neoformans* so verjetno prevladujoč dejavnik virulence (Buchanan in Murphy, 1998).

2.5.2.1 Kapsula

Gliva *C. neoformans* je v naravnem okolju slabo inkapsulirana in ravno zaradi tega lažje doseže pljučne mešičke. V gostitelju pride zaradi fiziološke koncentracije CO₂, omejitve

železovega iona in nevtralno/alkalnega pH do povečanja polisaharidne kapsule, kar naredi glivo odporno proti obrambi gostitelja (Viviani in Tortorano, 2009). Glavni polisaharid kapsule je glukuronoksilomanan (GXM), ki ima pri različnih seroloških tipih glive manjše razlike v strukturi, na podlagi katerih serotipe med sabo tudi ločimo (Cherniak in sod., 1980). Kapsula ima številne pomembne lastnosti in funkcije; zaradi svojega negativnega naboja ščiti patogena pred fagocitozo in ubijanjem z nevtrofilci, monociti in makrofagi, saj visok negativni nabolj povzroči elektrostatično odbojnost med glivo in negativno nabitimi efektorskimi gostiteljskimi celicami. Ker kapsula blokira fagocitozo in se vsi citokini inducirajo v postopku fagocitoze, se zaradi tega pri kapsuliranih glivah ne inducirajo. Pomanjkanje proizvodnje vnetnih citokinov prav tako vpliva na zaščito gostitelja. Kapsula lahko inhibira tudi migracije levkocitov iz krvi na vnetna mesta (Buchanan in Murphy, 1998; Karkowska - Kuleta in sod., 2009).

2.5.2.2 Sinteza melanina

Melanin, ki se nahaja v celični steni kvasovke in daje kvasnim celicam rjavo barvo, omogoča večjo celično integriteto in zaradi večjega negativnega naboja ščiti pred fagocitozo. Druge domnevne funkcije vključujejo zaščito pred oksidanti in temperaturnimi ekstremi, ultravijolično svetlobo in pred redukcijo železa. Melaninizirane kvasovke naj bi bile tudi manj občutljive za amfotericin B, v primerjavi z nemelaniniziranimi kvasovkami, kar prispeva k nezmožnosti učinkovitega zdravljenja okužb pri imunsko oslabljenih posameznikih (Viviani in Tortorano, 2009). Pomen proizvodnje melanina za virulenco *C. neoformans* je bil prvič opisan v začetku leta 1980. Rhodes in sod. (1982) so poročali, da so v naravi prisotne mutante *C. neoformans*, ki jim primanjkuje melanina in so v miših manj virulentne, kot sevi, ki proizvajajo melanin.

Zmožnost produkcije melanina je odvisna od prisotnosti encima fenoloksidaza, ki katalizira reakcijo pretvorbe 3,4-dihidroksifenilalanina (DOPA) do dopakvinona. Dopakvinon se kasneje pretvori v dopakrom, čemur sledi končna avtooksidacija do melanina. *C. neoformans* nima encima potrebnega za endogeno proizvodnjo dihidroksi fenolov. Zaradi tega mora biti sposoben pridobiti fenolne spojine iz okolja, da lahko proizvaja melanin. Možgansko tkivo je bogato s kateholamini, kot je DOPA in je verjetno ravno zaradi tega najljubša tarča okužbe s *C. neoformans*. Vendar organizem ne more

uporabiti kateholaminov kot edini vir ogljika, zato možgani niso prednostna hranilna niša, pač pa služijo kot niša za preživetje. Mutacije gena *CNLAC1*, ki kodira encim fenoloksidaza, povzročijo izgubo virulence pri *C. neoformans*. To nakazuje, da je omenjeni encim, ki vpliva na produkциjo melanina pomemben virulentni dejavnik (Buchanan in Murphy, 1998).

2.5.2.3 Producija manitola

Okužba centralnega živčnega sistema je pogosto povezana s proizvodnjo velike količine D-manitola (Karkowska - Kuleta in sod., 2009). Chaturvedi in sod. (1996) so na podlagi raziskav z mutantami ugotovili, da je proizvodnja manitola povezana s povečano odpornostjo proti osmotskim in topotnim stresom, poleg tega pa preprečuje oksidativne poškodbe glive, kar poveča njeno patogenost.

2.5.2.4 Drugi faktorji virulence

V določeni fazì okužbe, *C. neoformans* proizvaja hidrolitične encime, kot so proteaze in fosfolipaze, ki igrajo pomembno vlogo pri poškodbi tkiv gostitelja (Karkowska - Kuleta in sod., 2009). Glavna vloga proteaz je razgradnja proteinov človeške plazme (Buchanan in Murphy, 1998). Kriptokokne zunajcelične fosfolipaze, pa lahko privedejo do destabilizacije in uničenja membran in celične lize. Fosfolipaza igra pomembno vlogo tudi pri vzdrževanju integritete celične stene in tako vpliva na preživetje glive, zlasti pri povišani temperaturi. Na glivno odpornost proti reaktivnim zvrstjem kisika pa poleg produkcije manitola in melanina vpliva tudi proizvodnja superoksid dismutaze, peroksidaze, glutation peroksidaze in glutation reduktaze (Karkowska - Kuleta in sod., 2009).

2.6 KLINIČNE MANIFESTACIJE

Primarna oblika kriptokokoze se običajno pojavi v pljučih, kot posledica vdihovanja infektivnih delcev kvasovke (Viviani in Tortorano, 2009). Pojavljajo se ugibanja ali okužbo povzroči izsušena nekapsulirana kvasna celica ali bazidiospora, ki predstavlja

spolno razmnoževalno obliko glive. Inkapsulirana kvasna celica je namreč prevelika, da bi dosegla spodnja dihala. Okužba lahko ostane lokalizirana v pljučih ali pa se po krvnem obtoku razširi na druga tkiva. Glavna tarča okužbe je centralni živčni sistem (Viviani in Tortorano, 2009). Simptomi in znaki kriptokokoze so neznačilni in so odvisni predvsem od mesta okužbe in učinkovitosti imunske obrambe gostitelja. Inkubacijska doba ni točno določena in lahko traja nekaj tednov, mesecov ali celo let (Bogovič, 2015).

2.6.1 Pljučna kriptokokoza

Pri večini bolnikov ta oblika poteka asimptomatsko ali se kaže v blagih do zmernih simptomih, kot so dispnea, produktivni kašelj, splošno slabo počutje, bolečine v prsnem košu, hujšanje in redkeje hemoptiza. Povišana telesna temperatura, nočno potenje in izguba telesne teže so značilni simptomi pri HIV pozitivnih bolnikih (Baddley in Dismukes, 2011). Za neobičajne kriptokokne pljučnice so značilni tudi vnetni vozliči v pljučih, bilateralni infiltrati, limfadenopatija, plevralni izlivni in redkeje tudi nastanek votlin v pljučih. Rentgenske značilnosti kriptokokne pljučnice niso specifične (Viviani in Tortorano, 2009).

Pri imunsko oslabljenih bolnikih se okužba iz pljuč pogosto razširi na druga tkiva. Raziskave kažejo, da se nezdravljena primarna pljučna kriptokokoza pri HIV pozitivnih bolnikih v večini primerov razvije v sistemsko diseminirano kriptokokozo. Zaradi tega je pomembno zgodnje odkrivanje in zdravljenje primarne pljučne kriptokokoze, pri HIV pozitivnih in ostalih imunsko oslabljenih bolnikih in zaustavitev napredovanja te življenjsko ogrožajoče bolezni (Viviani in Tortorano, 2009).

2.6.2 Kriptokokoza centralnega živčnega sistema

Gliva *C. neoformans* je močno nevrotropna in teži k razširjanju, od primarnih manifestacij v pljučih, na centralni živčni sistem. Prizadene možganovino in možganske ovojnice (Viviani in Tortorano, 2009). Okužba je lahko akutna ali kronična. Bolezen nastopi z glavobolom in povišano telesno temperaturo, kar nakazuje na draženje možganskih ovojnici. Simptomi vključujejo tudi utrujenost, otopelost, otrplost vratu, vrtoglavico in motnje vida. Zapleti v centralnem živčnem sistemu se kažejo z motoričnimi, senzoričnimi,

nevrološkimi izpadi, mentalnimi motnjami in povišanim intrakranialnim tlakom. Pojavijo se lahko tudi simptomi demence ali nenadna koma (Subramanian in Mathai, 2005; Viviani in Tortorano, 2009).

Klinični potek bolezni pri bolnikih s HIV-om in pri bolnikih z drugo osnovno bolezni jo se med seboj razlikuje. Pri bolnikih, okuženih z virusom HIV, se simptomi običajno pojavijo pozno v teku možganske kriptokokoze, ko je glivna obremenitev v možganih visoka in se okužba že širi na druge organe in tkiva. Pri bolnikih, katerih osnovna predhodna bolezen ni HIV, je nastop bolezni postopen in simptomi kriptokokoze se lahko kažejo že več mesecev pred postavitvijo diagnoze (Viviani in Tortorano, 2009).

2.6.3 Kriptokokoza ostalih organov

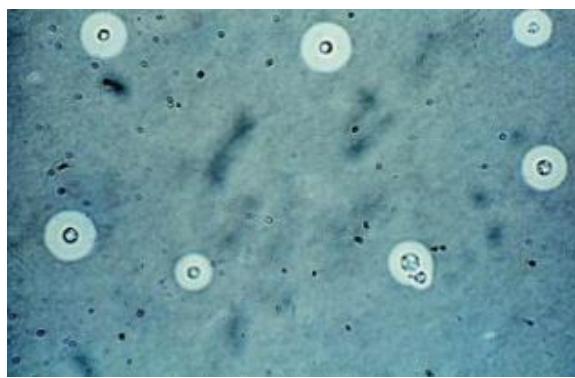
Kriptokokni meningitis lahko povzroči prizadetost možganskih živcev kar vodi v poškodbe vida (Bogovič, 2015). Očesne okužbe vključujejo keratitis, papiloedem, skotom, horiorertinitis in očesno paralizo, kar pogosto privede do nepopravljive izgube vida. Intraokularne okužbe so posledica infiltracije kvasovk iz subarahnoidalnega prostora ali hematogenega razširjanja iz drugih okuženih mest (Viviani in Tortorano, 2009).

Občasno se okužba razširi na bezgavke, predvsem na vratne in supraklavikularne. Kožne spremembe se pojavljajo pri 10 - 15 % bolnikov (Viviani in Tortorano, 2009). Lahko so zelo raznolike in neznačilne. Kažejo se v obliki makul, papul, pustul, drobnih vozličev, razjed, aknam podobnih lezij, abscesov, granulomov in plakov. Pri bolnikih z močno oslabelo imunostjo (predvsem pri bolnikih obolelih z virusom HIV) se lahko pojavi tudi nekrotizirajoči celulitis (Bogovič, 2015; Viviani in Tortorano, 2009). Kriptokokoza kosti je redka, vendar huda okužba, ki jo je težko diagnosticirati, zaradi podobnosti z nekaterimi rakavimi obolenji. Simptomi so lahko odsotni ali prisotni v obliki bolečin in oteklin (Viviani in Tortorano, 2009). Diseminirana oblika kriptokokoze se občasno razširi tudi na nadledvično žlezo, srce, vranico in jetra. Prostata se je izkazala kot asimptomatski rezervoar okužbe, zlasti pri bolnikih s HIV-om (Bogovič, 2015; Viviani in Tortorano, 2009).

2.7 DIAGNOSTIKA

Najpogostejša kužnina, ki jo ob sumu na okužbo s *C. neoformans* obravnava mikrobiološki laboratorij je likvor, saj se okužba najpogosteje izraža v obliki kroničnega meningitisa. Drugi vzorci, ki se prav tako uporablajo v diagnostiki, so izkašljaj, aspirat traheje (AT), bronhoalveolarni izpirek (BAL), hemokultura, seč in bioptični vzorci tkiv, kjer obstaja sum za lokalizirano okužbo ali vnetno žarišče diseminirane okužbe s *C. neoformans* (Bogovič, 2015; Viviani in Tortorano, 2009).

Zgodnja diagnoza in uvedba ustreznega protiglivnega zdravljenjena, sta nujni za zmanjšanje teže bolezni in ozdravitev. Diagnostika je kompleksna in jo sestavlja več mikrobioloških laboratorijskih preiskav (Campbell in sod., 1996). Najhitrejša metoda v diagnostiki je priprava direktnega mikroskopskega preparata, ki temelji predvsem na dokazovanju polisaharidne kapsule, značilne za *C. neoformans*. Kapsulo je pod mikroskopom mogoče opaziti ob dodatku indijskega črnila. Koloidni delci črnila, zaradi sestave kapsule ne morejo prodroti v kvasovko in se značilno razporedijo tako, da se kapsula vidi kot halo oziroma bistra cona okoli mikroorganizma (slika 7). Poleg tega, se lahko na podlagi mikroskopiranja oceni približno glivno breme okužbe (Viviani in Tortorano, 2009).



Slika 7: Gliva *Cryptococcus neoformans* s kapsulo, vidna pod mikroskopom (Baddley in Dismukes, 2011).

Diagnozo lahko potrdimo z osamitvijo povzročitelja na standardnih mikoloških gojiščih (Bogovič, 2015; Viviani in Tortorano, 2009). Kulture je potrebno inkubirati pri temperaturi 35 - 37 °C vsaj tri do štiri dni. V primeru negativnega rezultata je potrebno čas inkubacije podaljšati tudi do tri tedne, zaradi možne počasne rasti mikroorganizma (Andreoni in sod.,

2004). Kolonije, značilne za *C. neoformans*, so na Sabouraudovem gojišču (SABA) morfološko gladke, sijoče, vlažne in sluzave. Barva variira med krem in svetlo rumeno (slika 8). S starostjo postajajo kolonije vse temnejše. Na tako imenovanem »bird seed« agarju, ki vsebuje ekstrakte semen abesinske gizotije (*Guizotia abyssinica*), *C. neoformans* tvori rjave oziroma črne kolonije, zaradi produkcije fenoloksidaze (slika 9) (Andreoni in sod., 2004). Osamitev povzročitelja omogoča nadaljno testiranje občutljivosti za antimikotike.



Slika 8: Kolonije glive *Cryptococcus neoformans* na Sabouraudovem gojišču (Andreoni in sod., 2004).



Slika 9: Kolonije glive *Cryptococcus neoformans* na »Bird seed« agarju (Andreoni in sod., 2004).

Zanesljiv način za potrditev kriptokokne okužbe je dokaz kapsularnega antiga na serološko diagnostiko. Antigen lahko dokažemo v serumu, likvorju, seču ali BAL-u. V serološki diagnostiki se najpogosteje uporablja metoda lateksne aglutinacije in encimsko - imunska metoda (ELISA). Obe odlikuje izredna hitrost rezultatov, saj so ti znani že po

nekaj urah, visoka specifičnost in občutljivost. Pomanjkljivost predstavlja možni lažno pozitivni in lažno negativni rezultati, zato je potrebno serološko diagnostiko vedno izvajati v kombinaciji z drugimi metodami (Viviani in Tortorano, 2009). V sklopu molekularnih metod, verižna reakcija s polimerazo (PCR) nudi odlično alternativo za zgodnje odkrivanje kriptokokoze v primerjavi z običajnimi metodami. PCR je hitra metoda, ki lahko zazna nizko glivno breme in se lahko uporablja za manjše količine vzorca (Paschoal in sod., 2004).

2.8 ZDRAVLJENJE IN PREPREČEVANJE

Kriptokokoza zdravijo s protiglivnimi zdravili (Bogovič, 2015). Zdravljenje je odvisno od anatomskeih značilnosti bolezni, teže bolezni in imunskega statusa bolnika (Baddley in Dismukes, 2011). Pri pljučni kriptokokozi in zunajpljučni oblikki kriptokokoze, brez prizadetosti živčevja, je zdravljenje s flukonazolom učinkovito pri večini bolnikov. Kriptokokni meningitis se začne zdraviti z amfotericinom B, z dodatkom ali brez flucitozina, nato se zdravljenje nadaljuje s flukonazolom (Baddley in Dismukes, 2011; Bogovič, 2015). Bolniki, okuženim z virusom HIV in bolniki po presaditvi organov pogosto potrebujejo vseživljenjsko vzdrževalno terapijo s flukonazolom (Baddley in Dismukes, 2011).

Boljši dostop do protiretrovirusnega zdravljenja je izboljšal prognozo pri bolnikih okuženih z virusom HIV (WHO, 2011). Zgodnje protiretrovirusno zdravljenje pri bolnikih obolenih z virusom HIV, je najbolj pomembna preventivna strategija za zmanjševanje pojavnosti in znižanje visoke umrljivosti povezane s kriptokoknim meningitisom. Pomembno je, da bolniki pričnejo z zdravljenjem preden število CD4 limfocitov pade pod 200 celic/mm³. Ostali preventivni ukrepi vključujejo izogibanje okolju, ki predstavlja možen vir za okužbo (WHO, 2011).

3 MATERIAL IN METODE

V raziskavo smo vključili 46 izolatov glive *C. neoformans*, katere smo na podlagi tipizacijske metode AFLP razvrstili v različne genotipe.

3.1 VZORCI

V raziskavo smo vključili izolate glive *C. neoformans* iz različnih kužnin, ki so bili osamljeni v Laboratoriju za diagnostiko glivičnih infekcij, Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani, med leti 1998 in 2016. Skupno število bolnikov, katerih izolate smo v študiji uporabili, je bilo 19, vsega pa smo testirali 46 izolatov. Od desetih bolnikov je bil pridobljen po en izolat, od devetih bolnikov pa smo pridobili po dva ali več izolatov. Natančni podatki o bolnikih in izolatih so prikazani v preglednici 2. Vsi, razen dveh bolnikov, so imeli eno epizodo kriptokokne okužbe v razponu 1 - 135 dni. Ena epizoda je opredeljena z vsaj eno pozitivno kulturo, več kot ena epizoda pa je definirana, ko osamimo pri bolniku dve pozitivni kulti v intervalu ≥ 1 leto. En bolnik je imel dve epizodi, ki sta bili ločeni več kot dve leti in pol, pri drugem bolniku pa sta bile epizodi diagnostificirani v intervalu 1,3 leta.

Kriptokokni izolati so bili osamljeni iz likvorjev, hemokultur, izkašljajev, brisov ran, bronhoalveolarnih izpirkov, biopsij kože, aspiratov traheje in urina (preglednica 3). Vzorci so bili pridobljeni iz zbirke Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani.

Kot kontrole, za uvrstitev kliničnih kriptokoknih izolatov v ustrezni genotip, smo uporabili referenčne seve *C. neoformans* (CBS10515, genotip AFLP1/VNI; Bt1, genotip AFLP1A/VNB/VNII; WM626, genotip AFLP1B/VNII), *C. deneoformans* (CBS10511 in CBS10513, genotip AFLP2/VNIV), hibrid *C. neoformans* x *C. deneoformans* (W628, genotip AFLP3/VNIII), za *C. gattii* (W179, genotip AFLP4/VGI), *C. bacillisporus* (W161, genotip AFLP5/VGIII), *C. deuterogattii* (W178, genotip AFLP6/VGII), *C. tetragattii* (CBS10101, genotip AFLP7/VGIV), *C. decagattii* (IHEM14941, genotip AFLP10/VGIV), hibrid *C. gattii* x *C. deneoformans* (CBS10488, genotip AFLP8) in hibrid *C. gattii* x *C. neoformans* (CBS10496, genotip AFLP9).

Preglednica 2: Podatki bolnikov, vključenih v raziskavo.

Številka	Bolnik	Spol	Leto prve okužbe	Starost pri prvi okužbi (leta)	Klinika	Osnovno zdravstveno stanje	30-dnevno preživetje	Število izolatov
1	A	Moški	1998	44	INF	HIV	+	2
2	B	Moški	2005	61	INF	TX ledvice	+	2
3	C	Moški	2004	37	INF	HIV	+	2
4	Č	Ženski	2008	31	INF	HIV	-	4
5	D	Moški	2013	29	INF	HIV	+	9
6	E	Ženski	2014	85	INF	PMR, DB2, rak dojke, NSTEMI	-	2
7	F	Moški	2016	55	INF	HIV	+	6
8	G	Ženski	2016	74	OI	Limfom	+	7
9	H	Moški	2015	15	PED	CF	+	2
10	I	Moški	2008	57	INF	TX ledvice	+	1
11	J	Ženski	2008	70	EIT	NSTEMI	+	1
12	K	Ženski	1999	30	INF	HIV	+	1
13	L	Ženski	2006	43	EIT	STEMI	-	1
14	M	Ženski	2005	29	INF	Ne-Hodgkinov limfom	-	1
15	N	Moški	2005	60	INF	TX ledvice	+	1
16	O	Moški	2005	47	INF	HIV	+	1
17	P	Moški	2014	56	INF	Sepsa	+	1
18	R	Moški	2016	13	PED	Pljučnica	+	1
19	S	Moški	2016	44	INF	HIV	+	1

Legenda kratic: A – S: oznaka bolnika; INF – infektivna klinika; OI – Onkološki inštitut; PED – Pediatrična klinika; EIT- Enota intenzivne terapije; HIV – okužba z virusom humane imunske pomanjkljivosti; TX – transplantacija; PMR – Revmatična polimialgija; DB2 – slatkorna bolezen tipa 2; NSTEMI – srčni infarkt brez povišanega ST-segmenta; STEMI – Srčni infarkt s povišanim ST-segmentom; CF – Cistična fibroza. 30-dnevno preživetje : + bolnik je preživel okužbo, - bolnik okužbe ni preživel.

Preglednica 3: Nazivi vzorcev, uporabljenih v analizi in število izolatov glive *Cryptococcus neoformans* osamljenih iz posamezne skupine vzorcev.

Naziv vzorca	Število izolatov (%)
Likvor	19 (41,3 %)
Kri/Hemokultura	15 (32,6 %)
Biopsija kože	2 (4,3 %)
Bris rane	3 (6,5 %)
Aspirat traheje	1 (2,2 %)
Bronhoalveolarni izpirek	2 (4,3 %)
Izkašljaj	3 (6,5 %)
Urin	1 (2,2 %)
	Σ 46 (100 %)

3.2 GOJIŠČA

Uporabili smo komercialno dostopna gojišča.

- Sabouradov agar (SABA) z dodanim gentamicinom in kloramfenikolom, z 2 % glukozo; proizvajalec BioMérieux (Marcy-l'Étoile, Francija).
- Kromogeno gojišče: Chromagar candida; proizvajalec Mast Diagnostica Labortechnik (Reinfeld, Nemčija)

3.3 OŽIVLJANJE KULTUR SEVOV

Oživljanje kultur sevov smo izvedli v Laboratoriju za diagnostiko glivičnih infekcij, na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani. Vzorce sevov *C. neoformans* shranjenih pri temperaturi - 80 °C smo prenesli na sobno temperaturo, kjer smo jih pustili približno deset minut, da se je gojišče odmrznilo in kratko vorteksirali. Nato smo vzeli polno zanko (10 µL) kulture in jo nacepili na Sabouradov agar (SABA) ter inkubirali pri temperaturi 37 °C približno 3 - 5 dni, odvisno od hitrosti rasti/revitalizacije posameznega seva. Po pretečeni inkubaciji smo seve ponovno precepili na SABA in kromogeno gojišče ter inkubirali tri dni. Pri tem smo preverili, da imamo čisto kulturo.

3.4 IZOLACIJA CELOKUPNE DNA

Izolacijo celokupne DNA smo izvedli v Laboratoriju za diagnostiko glivičnih infekcij, na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani. S Sabouradovega agarja smo vzeli polno zanko kulture *C. neoformans* ($10 \mu\text{L}$) in jo dodali v 1 mL »MagNA Pure Tissue Lysis« pufra za razgradnjo tkiv (Roche Diagnostics, Mannheim, Nemčija). To smo ponovili za vseh 46 vzorcev. Delo je potekalo v laminariju, biološki komori za varno delo II. stopnje. Po dodatku kulture pufru, smo zmes s keramičnimi kroglicami homogenizirali dvakrat po eno minuto, pri 7.000 obratih. Temu je sledilo centrifugiranje, eno minuto pri 13.000 obratih. V laminariju smo nato odpepitirali $700 \mu\text{L}$ supernatanta in mu dodali $20 \mu\text{L}$ proteinaze K (Roche - Diagnostics). Zmes smo inkubirali pri temperaturi 65°C , približno eno uro. Sledila je desetminutna inkubacija pri 95°C , nato smo zmes postavili za pet minut v hladilnik, da se je ohladila na sobno temperaturo ali še nižje. V novo epruvetko smo odpepitirali $420 \mu\text{L}$ posameznega vzorca in epruvetko vstavili v aparat MagNa Pure Compact (Roche), za izolacijo DNA. Za vsak posamezni vzorec smo $50 \mu\text{L}$ izolirane DNA shranili pri temperaturi -20°C do analize.

3.5 TIPIZACIJA Z METODO AFLP

V tej študiji smo uporabili metodo AFLP, za raziskavo genske strukture in epidemioloških odnosov izbranih izolatov kriptokokov. Ta metoda je bila izvedena na Oddeleku za klinično mikrobiologijo in infekcijske bolezni, v Bolnišnici Canisius-Wilhelmina, v Nijmegenu na Nizozemskem. AFLP tipizacijo smo izvedli v skladu s protokolom kompleta »AFLP Microbial Fingerprinting« (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornija, ZDA), z modifikacijami povzetimi po protokolu, objavljenem v »Hybrid genotypes in the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*« (Boekhout in sod., 2001).

3.5.1 Restrikcija in ligacija

V našem primeru smo restrikcijo in ligacijo izvedli istočasno, saj lahko zaradi skupnega pufra reakciji potekata hkrati.

3.5.1.1 Priprava osnovne encimske mešanice

Pri pripravi osnovne encimske zmesi za potek reakcije restrikcije in ligacije, smo za vsak posamezni vzorec uporabili:

- 10 ng genomske DNA,
- eno enoto restrikcijske endonukleaze *MseI*,
- pet enot restrikcijske endonukleaze *EcoR1*,
- tri enote T4 DNA ligaze.

Reakcija je potekala pri celotnem volumnu 5,5 µL, z dodatkom:

- 0,36 µM vmesnika EcoR1 (iz AFLP kompleta),
- 3,64 µM vmesnika *MseI* (iz AFLP kompleta),
- 0,1 M NaCl,
- 0,91 mM Tris/HCl (pH 7,8),
- 0,18 mM MgCl₂,
- 0,18 mM ditiotreitol,
- 18 µM ATP,
- 91,36 µg BSA mL⁻¹.

Restrikcijsko ligacijsko mešanico smo inkubirali dve uri pri temperaturi 37 °C in razredčili z dodatkom 25 µL bidestilirane vode.

3.5.1.2 Redčenje restrikcijsko – ligacijske mešanice

V tej točki smo restrikcijsko - ligacijske vzorce redčili na ustrezno koncentracijo, za nadaljnjo metodo PCR. V prvem koraku smo dodali 189 µL 1X TE pufra v vsako posamezno restrikcijsko - ligacijsko mešanico in dobro premešali. Vzorce smo shranili pri temperaturi 2 - 6 °C. V kolikor vzorcev ne bi uporabili za kasnejše reakcije v roku enega meseca, je potrebno shranjevanje pri temperaturi med - 15 in - 25 °C.

3.5.2 Preselektivni PCR

Pri preselektivni amplifikaciji smo uporabili dva preselektivna oligonukleotidna začetnika, EcoR1 in MseI.

V PCR-mikrocentrifugirki smo združili sledeče:

- 4,0 µL razredčene DNA pripravljene v reakciji restrikcije in ligacije,
- 0,5 µL AFLP EcoR1 preselektivnega oligonukleotidnega začetnika (iz AFLP kompleta),
- 0,5 µL AFLP MseI preselektivnega oligonukleotidnega začetnika (iz AFLP kompleta),
- 15,0 µL AFLP amplifikacijske jedrne mešanice (iz AFLP kompleta).

Termični pogoji preselektivne stopnje pomnoževanja, so optimizirani za generiranje konstantne končne mase fragmentov. Cikli so v našem primeru potekali pod naslednjimi pogoji: dve minuti pri temperaturi 72 °C, sledilo je 20 ciklov po 20 sekund, pri temperaturi 94 °C, 30 sekund pri temperaturi 56 °C in dve minuti pri 72 °C (preglednica 4). PCR produkt smo nato še redčili s 25 µL bidestilirane vode in shranili pri temperaturi 4 °C.

Preglednica 4: Termični cikli preselektivne amplifikacije.

Začetek	CIKEL				Shranjevanje
	Vsak od 20 ciklov				
72 °C 2 min.	94 °C 20 sec.	56 °C 30 sec.		72 °C 2 min.	4 °C

Uspešnost pomnoževanja smo preverili na agaroznem gelu.

3.5.3 Selektivni PCR

V našem primeru smo za amplifikacijo sevov glive *C. neoformans* uporabili selektivna oligonukleotidna začetnika EcoR1-AC FAM in MseI-G. Po pomnoževanju s temi oligonukleotidnimi začetniki, je del vzorcev mogoče analizirati s pomočjo DNA sekvenatorja. Selektivno pomnoževanje primarno pomnoži predvsem EcoR1-MseI končne

fragmente. EcoR1-EcoR1 fragmenti se ne pomnožujejo dobro, MseI-MseI fragmenti pa ne emitirajo svetlobe, saj ne vsebujejo fluorescentnih barvil.

V PCR-mikrocentrifugirki smo združili sledeče:

- 1,5 µL razredčenega produkta preselektivne amplifikacije,
- 0,5 µL MseI oligonukleotidnega začetnika pri koncentraciji 0,5 µM,
- 0,5 µL z barvilkom označenega EcoR1 oligonukleotidnega začetnika pri koncentraciji 1 µM,
- 7,5 µL AFLP jedrne amplifikacijske mešanice.

PCR je potekal z izvedbo toplotnih ciklov prikazanih v preglednici 5.

Preglednica 5: Termični cikli selektivne amplifikacije.

Začetek/shranjevanje	CIKEL			Število ciklov
94 °C 2 min.	94 °C 20 sec.	66 °C 30 sec.	72 °C 2 min.	1
-	94 °C 20 sec.	65 °C 30 sec.	72 °C 2 min.	1
-	94 °C 20 sec.	64 °C 30 sec.	72 °C 2 min.	1
-	94 °C 20 sec.	63 °C 30 sec.	72 °C 2 min.	1
-	94 °C 20 sec.	62 °C 30 sec.	72 °C 2 min.	1
-	94 °C 20 sec.	61 °C 30 sec.	72 °C 2 min.	1
-	94 °C 20 sec.	60 °C 30 sec.	72 °C 2 min.	1
-	94 °C 20 sec.	59 °C 30 sec.	72 °C 2 min.	1
-	94 °C 20 sec.	58 °C 30 sec.	72 °C 2 min.	1
-	94 °C 20 sec.	57 °C 30 sec.	72 °C 2 min.	1
-	94 °C 20 sec.	56 °C 30 sec.	72 °C 2 min.	20
60 °C 30 min.		-		1
4 °C		-		1

3.6 KAPILARNA ELEKTROFOREZA

Kapilarna elektroforeza je bila izvedena na Oddeleku za klinično mikrobiologijo in infekcijske bolezni, v Bolnišnici Canisius-Wilhelmina, v Nijmegenu na Nizozemskem, in sicer po priporočilih proizvajalca Applied Biosystems na ABI 377 sekvenatorju.

3.7 ANALIZA REZULTATOV

Rezultate smo analizirali s pomočjo računalniškega programa BioNumerics ver. 7.6 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgija). Dendrograme smo rekonstuirali z metodo neutežnih parnih skupin z aritmetično sredino (angl. unweighted pair group method with arithmetic mean, UPGMA) z 0,7 % toleranco. Na razvejiščih dendrogramov je dodan odstotek kofenetske korelacije, ki pove zanesljivost razvejitev.

4 REZULTATI

Glede na dobljene rezultate, smo izolate glive *C. neoformans*, vključene v študijo, razdelili v tri genotipe.

4.7 REZULTATI MOLEKULARNE TIPIZACIJE

V preglednici 6 so zbrani podatki vseh 46 sevov glive *C. neoformans*, ki so bili uporabljeni v študiji.

Preglednica 6: Podatki posameznih sevov glive *Cryptococcus neoformans*, ki so bili uporabljeni v študiji.

Bolnik	Kužnina	Datum izolacije	Protokolna številka	Vrsta	Paritveni tip/serotip	Genotip (genotip opredeljen po metodi AFLP/ molekularni genotip)
A	likvor	24.10.1998	4462	<i>C. deneoformans</i>	a/D	AFLP2/VNIV
A	likvor	26.10.1998	4471	<i>C. deneoformans</i>	a/D	AFLP2/VNIV
B	Bris rane	29.7.2005	6180	<i>C. deneoformans</i>	a/D	AFLP2/VNIV
B	Biopsija kože	9.11.2006	9119	<i>C. deneoformans</i>	a/D	AFLP2/VNIV
C	Likvor	30.12.2004	9635-1	<i>C. deneoformans</i>	a/D	AFLP2/VNIV
C	Likvor	30.12.2004	9635-2	<i>C. deneoformans</i>	a/D	AFLP2/VNIV
Č	Hemokultura	20.5.2008	4825	<i>C. neoformans</i>	a/A	AFLP1/VNI
Č	BAL	26.5.2008	4909	<i>C. neoformans</i>	a/A	AFLP1/VNI
Č	Hemokultura	27.5.2008	5056	<i>C. neoformans</i>	a/A	AFLP1/VNI
Č	Hemokultura	27.5.2008	5057	<i>C. deneoformans</i>	a/D	AFLP2/VNIV
D	BAL	16.7.2013	7332	<i>C. deneoformans</i>	a/D	AFLP2/VNIV
D	Likvor	18.7.2013	7448-1	<i>C. deneoformans</i>	a/D	AFLP2/VNIV
D	Likvor	18.7.2013	7448-2	<i>C. deneoformans</i>	a/D	AFLP2/VNIV
D	Bris rane	23.7.2013	7550	<i>C. deneoformans</i>	a/D	AFLP2/VNIV
D	Likvor	6.8.2013	8014	<i>C. deneoformans</i>	a/D	AFLP2/VNIV
D	Likvor	22.8.2013	8685	<i>C. deneoformans</i>	a/D	AFLP2/VNIV
D	Likvor	26.8.2013	8833	<i>C. deneoformans</i>	a/D	AFLP2/VNIV
D	Likvor	3.9.2013	9154	<i>C. deneoformans</i>	a/D	AFLP2/VNIV

Se nadaljuje ...

Nadaljevanje preglednice 6: Podatki posameznih sevov glive *Cryptococcus neoformans*, ki so bili uporabljeni v študiji.

Bolnik	Kužnina	Datum izolacije	Protokolna številka	Vrsta	Paritveni tip/serotip	Genotip (genotip opredeljen po metodi AFLP/ molekularni genotip)
D	Likvor	26.1.2016	1027	<i>C. deneoformans</i>	a/D	AFLP2/VNIV
E	Hemokultura	7.2.2014	1860	<i>C. deneoformans</i>	a/D	AFLP2/VNIV
E	Hemokultura	7.2.2014	1861	hibrid <i>C. neoformans</i> x <i>C. deneoformans</i>	a/A-a/D	AFLP3/VNIII
F	Hemokultura	2.4.2016	4117	<i>C. neoformans</i>	a/A	AFLP1/VNI
F	Hemokultura	2.4.2016	4165	<i>C. neoformans</i>	a/A	AFLP1/VNI
F	Likvor	3.4.2016	4163	<i>C. neoformans</i>	a/A	AFLP1/VNI
F	Likvor	5.4.2016	4183	<i>C. neoformans</i>	a/A	AFLP1/VNI
F	Likvor	13.4.2016	4554	<i>C. neoformans</i>	a/A	AFLP1/VNI
F	Likvor	21.4.2016	4921	<i>C. neoformans</i>	a/A	AFLP1/VNI
G	Hemokultura	20.1.2016	813	<i>C. deneoformans</i>	a/D	AFLP2/VNIV
G	Hemokultura	20.1.2016	1052	<i>C. deneoformans</i>	a/D	AFLP2/VNIV
G	Hemokultura	20.1.2016	1053	<i>C. deneoformans</i>	a/D	AFLP2/VNIV
G	Hemokultura	23.1.2016	986	<i>C. deneoformans</i>	a/D	AFLP2/VNIV
G	Hemokultura	23.1.2016	1188	<i>C. deneoformans</i>	a/D	AFLP2/VNIV
G	Hemokultura	24.1.2016	1017	<i>C. deneoformans</i>	a/D	AFLP2/VNIV
G	Hemokultura	24.1.2016	1018	<i>C. deneoformans</i>	a/D	AFLP2/VNIV
H	Izkašljaj	22.7.2015	9093	<i>C. neoformans</i>	a/A	AFLP1/VNI
H	Izkašljaj	4.12.2015	14741	<i>C. neoformans</i>	a/A	AFLP1/VNI
I	Bris rane	6.3.2008	2168	<i>C. neoformans</i>	a/A	AFLP1/VNI
J	Aspirat traheje	12.5.2008	4571	<i>C. neoformans</i>	a/A	AFLP1/VNI
K	likvor	18.5.1999	1518	<i>C. neoformans</i>	a/A	AFLP1VNI
L	Hemokultura	26.7.2006	6135	<i>C. neoformans</i>	a/A	AFLP1/VNI
M	Likvor	8.7.2005	5530	<i>C. deneoformans</i>	a/D	AFLP2/VNIV
N	Biopsija kože	20.7.2005	5803	<i>C. deneoformans</i>	a/D	AFLP2/VNIV

Se nadaljuje ...

Nadaljevanje preglednice 6: Podatki posameznih sevov glive *Cryptococcus neoformans*, ki so bili uporabljeni v študiji.

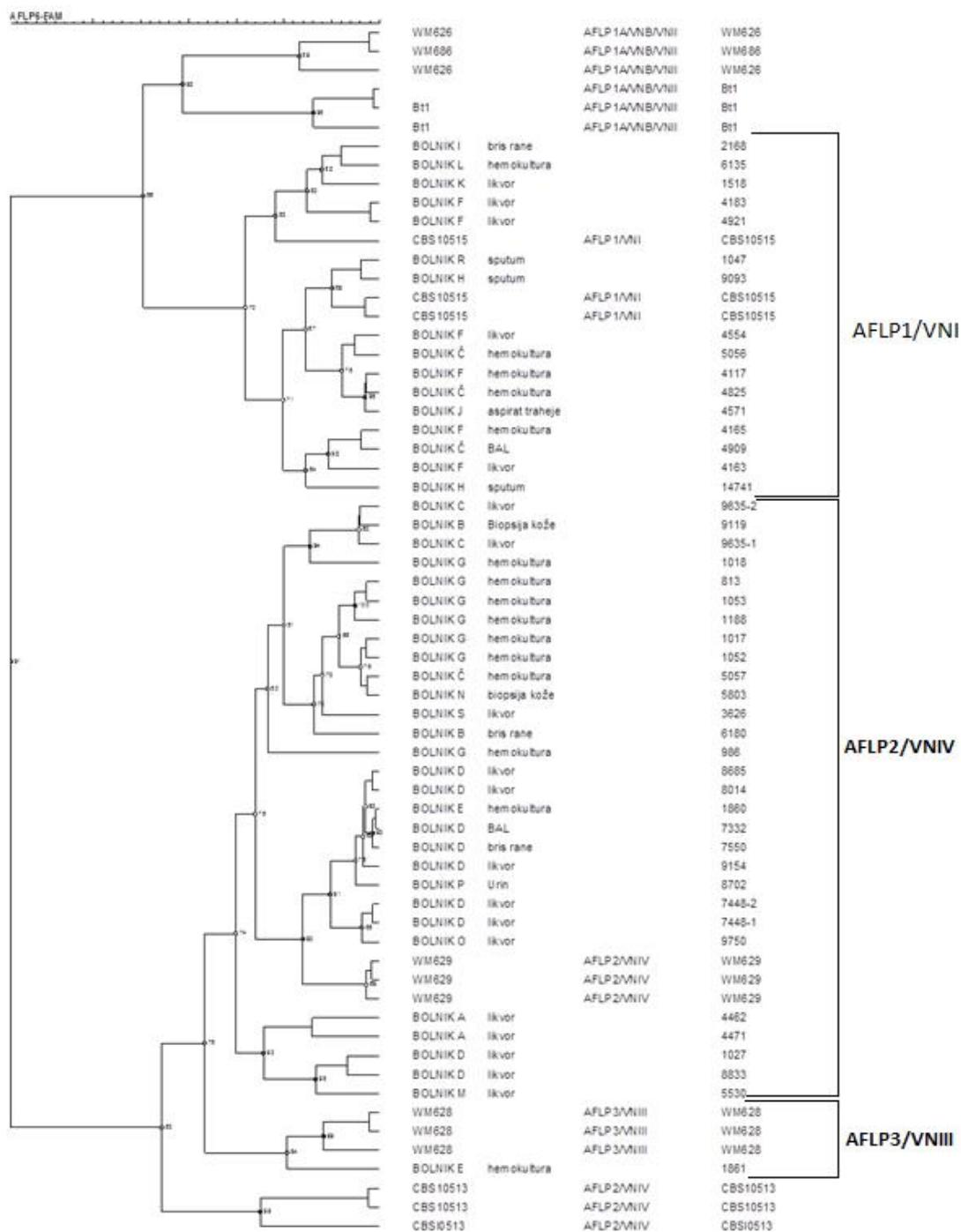
Bolnik	Kužnina	Datum izolacije	Protokolna številka	Vrsta	Paritveni tip/serotip	Genotip (genotip opredeljen po metodi AFLP/molekularni genotip)
O	Likvor	11.12.2005	9750	<i>C. deneoformans</i>	α/D	AFLP2/VNIV
P	Urin	28.7.2014	8702	<i>C. deneoformans</i>	α/D	AFLP2/VNIV
R	Izkašljaj	25.1.2016	1047	<i>C. neoformans</i>	α/A	AFLP1/VNI
S	Likvor	22.3.2016	3626	<i>C. deneoformans</i>	α/D	AFLP2/VNIV

4.8 DENDROGRAMI

S pomočjo računalniškega programa BioNumerics ver. 7.6 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgija), smo izrisali skupni dendrogram vseh 46 izolatov glive *C. neoformans*, na podlagi katerega so razvidne tri skupine genotipov. Poleg skupnega dendrograma, smo pri bolnikih, pri katerih sta bila osamljena dva ali več izolatov, izrisali posamezni dendrogram glede na bolnika, za primerjavo sorodnosti med izolati glede na genotip, pri posameznem bolniku.

4.8.1 Skupni dendrogram

Na podlagi dendrograma, v katerega je vključenih vseh 46 izolatov, lahko le te uvrstimo v tri skupine na podlagi genotipov (slika 10). V genotip AFLP1/VNI uvrstimo 16 izolatov, v genotip AFLP2/VNIV uvrstimo 29 izolatov, v genotip AFLP3/VNIII pa zgolj en izolat. Vsi izolati genotipa AFLP1/VNI so uvrščeni v vrsto *C. neoformans*, v serotip A in paritveni tip α. Izolate genotipa AFLP2/VNIV uvrščamo v vrsto *C. deneoformans* in v serotip D, 27 jih pripada paritvenemu tipu α, le dva pa pripadata paritvenemu tipu a. Izolat genotipa AFLP3/VNIII je hibrid med vrstama *C. neoformans* in *C. deneoformans*. Uvrščamo ga v paritveni tip aa in v serotip AD. Sorodnost izolatov znotraj genotipa AFLP1/VNI je najmanj 75 %, sorodnost izolatov znotraj genotipa AFLP2/VNIV pa najmanj 82 %.

Slika 10: Skupni dendrogram izoliranih sevov glive *Cryptococcus neoformans*.

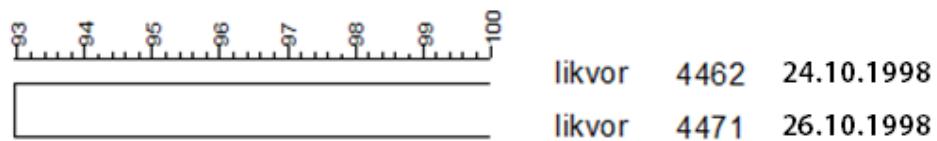
Na dendrogramu so označeni bolniki in njihovi pripadajoči izolati. Označke WM688, WM179, WM161, WM178, CBS10515, CBS10511, CBS10513, CBS10101, CBS10496, IHEM10488 predstavljajo referenčne seve.

4.8.2 Dendrogrami po bolnikih

Pri devetih bolnikih, pri katerih sta bila osamljena dva ali več izolatov glice, smo izrisali posamezni dendrogram glede na bolnika, za primerjavo sorodnosti izolatov glede na genotip.

4.8.2.1 Bolnik A

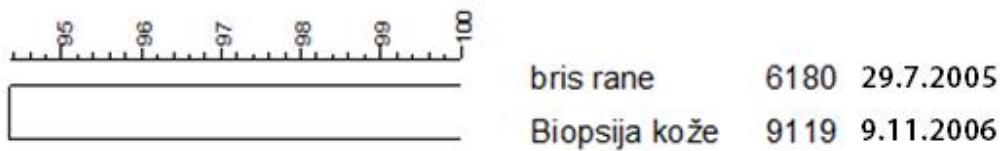
Pri bolniku A sta bila iz likvorja osamljena dva različna izolata glice, v roku dveh dni, oktobra 1998. Izolata sta si genetsko podobna v 93,0 % (slika 11). Oba izolata uvrščamo v vrsto *C. deneoformans* in genotip AFLP2/VNIV. Oba pripadata paritvenemu tipu a in serotipu D.



Slika 11: Dendrogram izoliranih sevov glice *Cryptococcus neoformans* pri bolniku A.
Na dendrogramu so prikazani odstotki sorodnosti med izolati glede na genotip.

4.8.2.2 Bolnik B

Pri bolniku B sta bila osamljena dva izolata glice, eden iz brisa rane in eden iz biopsije kože. Izolat s protokolno številko 6180, je bil osamljen julija, leta 2005 in izolat s protokolno številko 9119 novembra, 2006. Izolata sta si sorodna v 94,4 % (slika 12). Oba pripadata vrsti *C. deneoformans*, genotipu AFLP2/VNIV, paritvenemu tipu a in serotipu D.

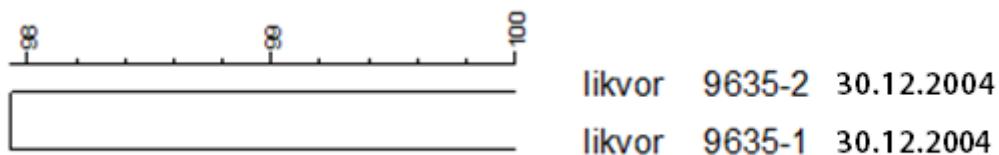


Slika 12: Dendrogram izoliranih sevov glive *Cryptococcus neoformans* pri bolniku B.

Na dendrogramu so prikazani odstotki sorodnosti med izolati glede na genotip.

4.8.2.3 Bolnik C

Pri bolniku C sta bila osamljena dva izolata glive. Oba izolata sta bila osamljena iz istega likvorja, isti dan, decembra, 2014 in sta si sorodna v skoraj 98,0 %, (slika 13). Oba izolata pripadata vrsti *C. deneoformans*, genotipu AFLP2/VNIV, paritvenemu tipu α in serotipu D.



Slika 13: Dendrogram izoliranih sevov glive *Cryptococcus neoformans* pri bolniku C.

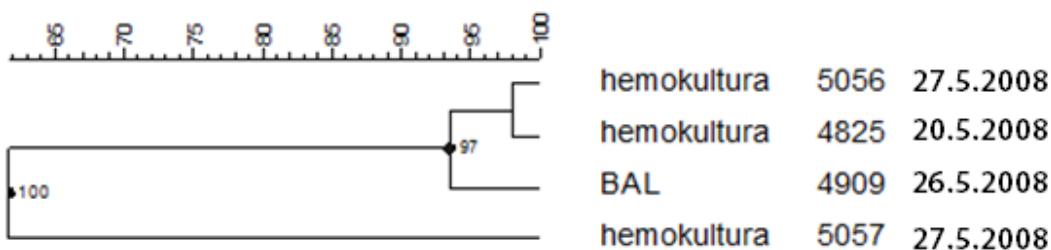
Na dendrogramu so prikazani odstotki sorodnosti med izolati glede na genotip.

4.8.2.4 Bolnik Č

Pri bolniku Č so bili osamljeni štirje izolati glive. Vsi izolati so bili osamljeni maja, leta 2008, z nekajdnevnim razmikom. Trije izolati so bili osamljeni iz hemokultur in eden iz BAL. Najbolj sorodna sta si izolata s protokolnima številkama 5056 in 4825, osamljena iz hemokultur v razmiku sedmih dni, in sicer sta sorodna v 98,0 %. S 97,0 % gotovostjo lahko trdimo, da sta ta dva izolata v 94,0 % sorodna z izolatom s protokolno številko 4909, osamljenim iz BAL, en dan pred sevom 5056 in šest dni kasneje kot sev 4825. Izolat s protokolno številko 5057, osamljen isti dan kot izolat 5056, prav tako iz hemokulture, si je

z ostalimi tremi izolati soroden le v 63,0 %, kar lahko trdimo s 100 % gotovostjo (slika 14).

Izolati s protokolnimi številkami 5056, 4825 in 4909 pripadajo vrsti *C. neoformans*, genotipu AFLP1/VNI paritvenemu tipu α in serotipu A, Izolat s protokolno številko 5057 pa pripada vrsti *C. deneoformans*, genotipu AFLP2/VNIV, paritvenemu tipu α in serotipu D.



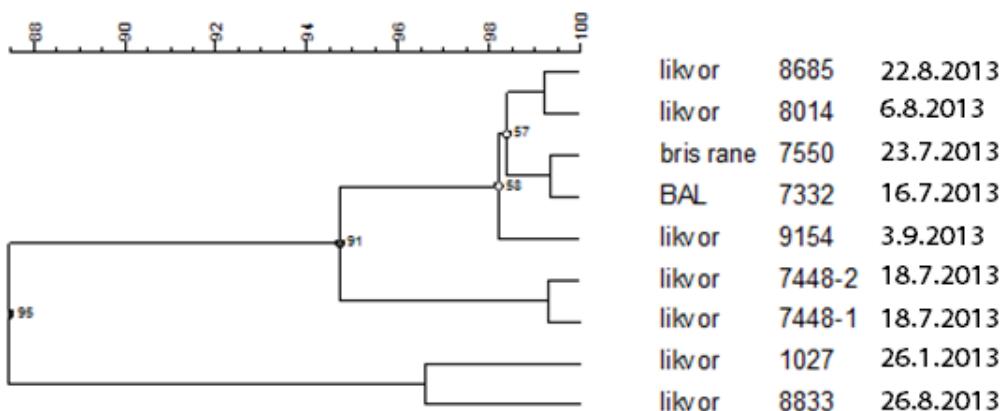
Slika 14: Dendrogram izoliranih sevov glive *Cryptococcus neoformans* pri bolniku Č.
Na dendrogramu so prikazani odstotki sorodnosti med izolati glede na genotip.

4.8.2.5 Bolnik D

Pri bolniku D je bilo osamljenih devet izolatov glive. Sedem izolatov glive je bilo osamljenih iz likvorja, eden iz brisa rane in eden iz BAL. Izolata s protokolnima številkama 7550 in 7332, eden osamljena iz brisa rane in drugi iz BAL, sta med seboj sorodna v 99,4 %. Prav tako sta v 99,4 % med seboj sorodna izolata s protokolnima številkama 7448-1 in 7448-2, oba osamljena iz istega vzorca likvorja. Vsi štirje izolati so bili osamljeni julija, leta 2013. Izolata s protokolnima številkama 8685 in 8014, osamljena avgusta 2013 iz likvorja, sta med seboj sorodna v 99,25 %, z izolatom 7550 in 7332 pa sta sorodna v 98,4 %, kar lahko trdimo s 57,0 % gotovostjo. Izolati 8685, 8014, 7550 in 7332 so z izolatom s protokolno številko 9145, ki je bil osamljen septembra 2013 iz likvorja, sorodni v 98,25 %, kar lahko trdimo z 58,0 % gotovostjo. Izolata 7448-2 in 7448-1 sta si z izolati 8685, 8014, 7550, 7332 in 9154 sorodna v 94,75 %, kar lahko trdimo z 91,0 % gotovostjo. Od omenjenih vzorcev po sorodnosti najbolj odstopata vzorci s protokolnima številkama 1027 in 8833. Prvi je bil osamljen januarja 2016 iz likvorja, slednji pa avgusta

2013, prav tako iz likvorja. Med seboj sta omenjena izolata sorodna v 96,5 %, z ostalimi sedmimi vzorci pa je sorodnost 87,5 %, kar lahko trdimo s 95,0 % gotovostjo (slika 15).

Vseh devet izolatov spada v vrsto *C. deneoformans*, v genotip AFLP2/VNIV, v paritveni tip α in serotip D.



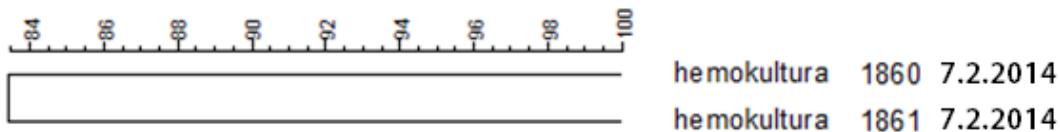
Slika 15: Dendrogram izoliranih sevov glive *Cryptococcus neoformans* pri bolniku D.

Na dendrogramu so prikazani odstotki sorodnosti med izolati glede na genotip.

4.8.2.6 Bolnik E

Pri bolniku E sta bila osamljena dva izolata glive. Oba izolata sta bila osamljena iz iste hemokulture, isti dan, februarja 2014. Med seboj sta si sorodna v 83,5 % (slika 16).

Izolat s protokolno številko 1861 je identificiran kot hibrid med vrstama *C. neoformans* in *C. deneoformans*, ki ga uvrščamo v genotip AFLP3/VNIII, v paritveni tip $\alpha\alpha$ in v serotip AD. Izolat s protokolno številko 1860 pa spada v vrsto *C. deneoformans*, v genotip AFLP2/VNIV, v paritveni tip α in serotip D.

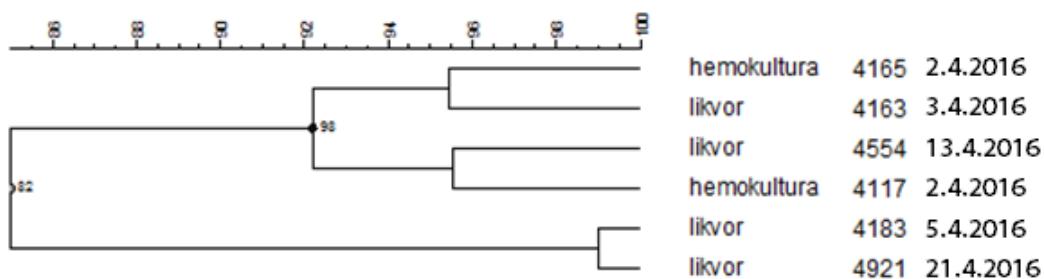
Slika 16: Dendrogram izoliranih sevov glive *Cryptococcus neoformans* pri bolniku E.

Na dendrogramu so prikazani odstotki sorodnosti med izolati glede na genotip.

4.8.2.7 Bolnik F

Pri bolniku F je bilo osamljenih šest izolatov glive. Štirje izolati so bili osamljeni iz likvorja in dva iz hemokulture, aprila, 2016. Najbolj sorodna med njimi sta izolata s protokolnima številkama 4183 in 4921, osamljena iz likvorja. Njuna sorodnost je 99,0 %. Z ostalimi štirimi izolati sta izolata 4183 in 4912 sorodna v 85,0 %, kar lahko trdimo z 82,0 % gotovostjo. Sorodnost med izolatom s protokolnima številkama 4165 in 4163 je 95,5 %. Prav tako je 95,5 % sorodnost tudi med izolatom s protokolnima številkama 4554 in 4117. Izolata 4165 in 4163 sta z izolatom 4554 in 4117 sorodna v 92,25 %, kar lahko trdimo z 98,0 % gotovostjo (slika 17).

Vseh šest izolatov uvršamo v vrsto *C. neoformans*, v genotip AFLP1/VNI, v paritveni tip α in v serotip A.

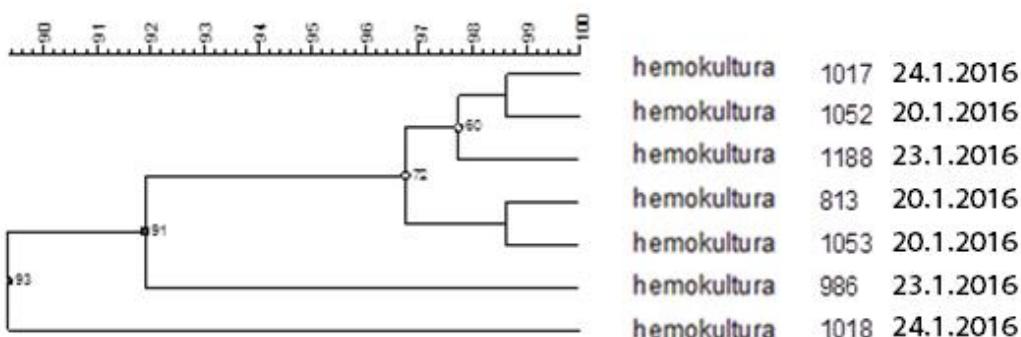
Slika 17: Dendrogram izoliranih sevov glive *Cryptococcus neoformans* pri bolniku F.

Na dendrogramu so prikazani odstotki sorodnosti med izolati glede na genotip.

4.8.2.8 Bolnik G

Pri bolniku G je bilo osamljenih sedem izolatov. Vsi so bili osamljeni iz hemokultur, januarja, 2016. Izolata s protokolnima številkama 1017 in 1052 sta sorodna v 98,6 %. Prav tako sta v 98,6 % sorodna izolata s protokolnima številkama 813 in 1053. Izolata 1017 in 1052, sta z izolatom s protokolno številko 1188 sorodna v 97,8 %, kar lahko trdimo s 60,0 % gotovostjo. Z izolatom 813 in 1053, so izolati 1017, 1052 in 1188 sorodni v 96,6 %, kar lahko trdimo z 72,0 % gotovostjo, vseh naštetih pet izolatov pa je z izolatom 986 sorodnih v 91,8 %, kar lahko trdimo z 91,0 % gotovostjo. Izolat številka 1018 se od vseh preostalih šestih najbolj razlikuje, saj je njegova sorodnost z ostalimi šestimi v 89,4 %, kar lahko trdimo s 93 % gotovostjo (slika 18).

Vseh sedem izolatov uvršamo v vrsto *C. deneoformans*, v genotip AFLP2/VNIV, v paritveni tip α in v serotip D.



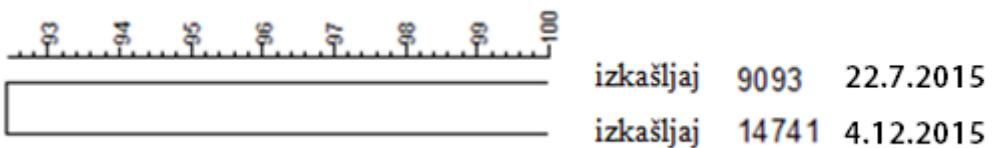
Slika 18: Dendrogram izoliranih sevov glive *Cryptococcus neoformans* pri bolniku G.

Na dendrogramu so prikazani odstotki sorodnosti med izolati glede na genotip.

4.8.2.9 Bolnik H

Pri bolniku H sta bila osamljena dva izolata. Oba sta bila osamljena iz izkašljaja. Izolat s protokolno številko 9093, osamljen julija, 2015 in izolat 14741, osamljen decembra, 2015, sta sorodna v 92,4 % (slika 19).

Oba izolata spadata v vrsto *C. neoformans*, v genotip AFLP1/VNI, v paritveni tip α in v serotip A.



Slika 19: Dendrogram izoliranih sevov glive *Cryptococcus neoformans* pri bolniku H.

Na dendrogramu so prikazani odstotki sorodnosti med izolati glede na genotip.

5 RAZPRAVA

Gliva *C. neoformans* je bazidiomicetna kvasovka, ki povzroča bolezen kriptokokozo. Je oportunistični patogen, kar pomeni, da povzroča bolezen predvsem pri imunsko oslabljenih posameznikih. Kriptokokoza ima visoko incidenco predvsem pri bolnikih okuženih z virusom HIV (Hagen in sod., 2012).

Za človeka patogena vrstna kompleksa *C. neoformans* in *C. gattii* iz rodu *Cryptococcus*, delimo na devet genotipov in serotipov (Bovers in sod., 2008b). Glede na spolno fazo rasti, glivo opredelimo kot paritveni tip α ali paritveni tip a (Cogliati, 2013). Ker v Sloveniji populacija *C. neoformans* še ni bila molekularno – biološko raziskana, je bil cilj te študije molekularno opredeliti seve glive *C. neoformans* v Sloveniji.

V študijo smo vključili vse izolate glive iz kompleksa *C. neoformans*, ki so bili osamljeni v Sloveniji, v obdobju od oktobra 1998 do aprila 2016. Skupno število vseh izolatov je bilo 46 in je vključevalo 19 bolnikov. Večina bolnikov s kriptokokozo je bila predhodno imunsko oslabljena. V večini primerov (št.= 8; 42,1 %), so bili bolniki iz katerih je bila gliva osamljena predhodno okuženi z virusom HIV. Osnovno bolezensko stanje pri ostalih bolnikih je vključevalo presaditev ledvice (št.= 3; 15,8 %), srčni infarkt brez povišanega ST-segmenta (št.= 2; 10,5 %), limfom (št.= 1; 10,5 %), raka dojke (št.= 1; 5,3 %), revmatično polimialgijo (št.= 1; 5,3 %), sladkorno bolezen tipa 2 (št.= 1; 5,3 %), sepso (št.= 1; 5,3 %), pljučnico (št.= 1; 5,3 %), srčni infarkt s povišanim ST-segmentom (št.= 1; 5,3 %) in cistično fibrozo (št.= 1; 5,3 %) (preglednica 2). Tudi v svetovnem merilu, predhodna okužba z virusom HIV predstavlja glavni dejavnik tveganja za razvoj kriptokokoze, tako v državah v razvoju, kot v državah z višjim standardom. Posamezniki na imunosupresivni terapiji (npr. po presaditvi čvrstih organov in krvotvornih matičnih celic), predstavljajo večino preostalih primerov okužb (Sloan in Parris, 2014).

Glede na dobljene rezultate ne moremo trditi, da se pri posameznem osnovnem bolezenskem stanju pojavlja le določena vrsta glive iz kompleksa *C. neoformans*. Od osmih bolnikov okuženih z virusom HIV, je bila v petih primerih osamljena vsta *C. deneoformans*, v dveh primerih *C. neoformans*, v enem primeru sta bili osamljeni obe omenjeni vrsti. Od treh bolnikov po presaditvi ledvice, je bila v dveh primerih osamljena

vrsta *C. deneoformans*, v enem primeru vrsta *C. neoformans*. Pri enem od dveh bolnikov z infarktom brez povišanega ST-segmenta smo osamili vrsto *C. neoformans*, pri drugi bolnici vrsto *C. deneoformans* in hibrid med vrstama *C. neoformans* in *C. deneoformans*. Ostala osnovna bolezenska stanja so se pojavljala le pri po enim bolniku, zaradi česar ne moremo trditi, da je katero od teh bolezenskih stanj povezano z okužbo le ene vrste glive iz kompleksa *C. neoformans*. Tudi v ostalih epidemioloških študijah posamezne vrste niso povezali z določenim bolezenskim stanjem. Znano je le, da vrsti *C. neoformans* in *C. deneoformans* ter njun hibrid povzročajo bolezni pri imunsko oslabljenih osebah, vrsta *C. gattii* in pripadajoči serotipi, pa povzročajo bolezni tudi pri osebah z normalnim delovanjem imunskega sistema (Antinori, 2013).

V našo študijo so bili vključeni bolniki stari med 13 in 85 let. Njihova povprečna starost je bila 46,3 let. Od skupno 19 obolelih je bila več kot polovica moških (št.= 12; 63,2 %) (preglednica 2). Osem moških je bilo okuženih z vrsto *C. deneoformans* in širje z vrsto *C. neoformans*. Pri ženskah so bile štiri okužene s *C. deneoformans*, prav tako štiri s *C. neoformans* in ena s hibridom med vrstama *C. neoformans* in *C. deneoformans*. Tudi drugod po svetu okužbe z določeno vrsto niso pogojene s spolom in starostjo posameznika, ampak jih pogojuje predvsem geografska lega, ekološki izvor in predhodna obolenja posameznika (Boekhout in sod., 2001; Bovers in sod., 2008a).

Od celotne populacije bolnikov, sta bili le dve ženski predstavnici okuženi z gensko različnimi sevi *C. neoformans*. Ena je bila hkrati okužena z vrsto *C. neoformans* in *C. deneoformans*, ena pa z vrsto *C. deneoformans* in hibridom med vrstama *C. neoformans* in *C. deneoformans*. Drugod po svetu se sočasne okužbe z različnimi genotipi pojavljajo, vendar tako kot v Sloveniji niso pogoste in ne prevladujejo (Hagen in sod., 2012). Smrtnost bolnikov vključenih v raziskavo, je bila 21,1 %. To nas uvršča v države razvitega sveta, saj je smrtnost v državah v razvoju okoli 70,0 % (Bamba in sod., 2012; Park in sod., 2009).

Kriptokokne izolate smo osamili iz osmih različnih tipov kužnin (preglednica 3). V večini primerov smo glivo osamili iz likvorja (št.= 19: 41,3 %), ki je splošno najpogosteje obravnavana kužnina ob sumu na okužbo s *C. neoformans* v mikrobioloških laboratorijih po vsem svetu. To povezujemo z dejstvom, da se pri imunsko oslabljenih bolnikih

kvasovke hitro namnožijo v pljučih in hematogeno širijo prednostno v centralni živčni sistem, kjer povzročajo kriptokokni meningitis ali meningoencefalitis. Redkeje se razširijo tudi na druge organe (Viviani in Tortorano, 2009). Ostali izolati so bili v naši študiji osamljeni tudi iz hemokultur, izkašljajev, brisov ran, iz biopsij kože, bronhoalveolarnih izpirkov, iz seča in aspirata traheje.

Iz likvorja smo v 14 primerih vzorcev osamili vrsto *C. deneoformans* in v 5 primerih vrsto *C. neoformans*. Od 15 izolatov glive iz hemokultur, je 9 izolatov pripadalo vrsti *C. deneoformans*, 5 izolatov vrsti *C. neoformans*, en izmed izolatov pa je bil hibrid med vrstama *C. neoformans* in *C. deneoformans*. Iz brisov rane smo v dveh primerih osamili vrsto *C. deneoformans*, v enem primeru vrsto *C. neoformans*. Iz vseh treh izolatov iz izkašljajev smo osamili vrsto *C. neoformans* in prav tako iz obeh biopsij kože vrsto *C. deneoformans*. Iz aspirata traheje smo v edinem vzorcu, vključenemu v raziskavo osamili vrsto *C. neoformans*, iz edinega vzorca seča pa vrsto *C. deneoformans*. Tudi drugod po svetu se v določenem tipu kužnine prednostno ne pojavlja določena vrsta glive, pač pa je pojavnost določenega genotipa odvisna predvsem od geografske lege (Bovers in sod., 2008a).

V študiji smo za raziskavo genetske strukture in epidemioloških odnosov med izolati kriptokokov uporabili tipizacijsko metodo AFLP. Metodo AFLP smo izbrali zaradi številnih prednosti pred ostalimi tipizacijskimi metodami. Glavna prednost je zahtevana majhna količina DNA, poleg tega pa metoda AFLP zaradi uporabe le dveh vrst oligonkleotidnih začetnikov, omogoča dobro primerljivost in ponovljivost rezultatov (Vos in sod., 1995). Na podlagi skupnega dendrograma (slika 10), ki je vključeval vseh 46 izolatov in referenčne seve, kot kontrole, smo izolate bolnikov, vključene v raziskavo uvrstili v tri genotipe vrst kompleksa *C. neoformans*. V vrsto *C. neoformans* in genotip AFLP1/VNI smo uvrstili 16 izolatov, v vrsto *C. deneoformans* in genotip AFLP2/VNIV smo uvrstili 29 izolatov, hibrid med vrstama *C. neoformans* in *C. deneoformans* pa je bil med vsega 46 izolati le eden, uvrščen v genotip AFLP3/VNIII. Pri AFLP tipizacijski metodi smo uporabili tudi referenčne seve za vrste *C. gattii*, *C. bacillisporus*, *C. deuterogattii*, *C. tetragattii*, hibrid med vrstama *C. gattii* in *C. deneoformans* in za hibrid med vrstama *C. gattii* in *C. neoformans*, vendar nobeden izmed 46 izolatov vključenih v raziskavo, ni pripadal kateri izmed omenjenih vrst kompleksa *C. gattii*. To smo tudi

pričakovali, saj je vrstni kompleks *C. gattii* bolj omejen na tropska, subtropska in mediteranska geografska območja (Sloan in Parris, 2014).

Če povzamemo v odstotkih, 34,8 % izolatov vključenih v raziskavo, pripada vrsti *Cryptococcus neoformans*, genotipu AFLP1/VNI in serotipu A, 63,0 % izolatov pripada vrsti *Cryptococcus deneoformans*, genotipu AFLP2/VNIV in serotipu D in le 2,2 % je hibridov med vrstama *Cryptococcus neoformans* in *Cryptococcus deneoformans*, ki pripadajo genotipu AFLP3/VNIII in serotipu AD. Kar 95,7 % vseh izolatov pripada paritvenemu tipu α in le 4,3% vseh izolatov paritvenemu tipu a. Podatki o pripadajočem genotipu, serotipu in paritvenem tipu posameznega izolata so vključeni v preglednico 6.

Glede na dosedanje študije smo pričakovali, da bodo izolati vključeni v raziskavo pripadali vrstama *C. neoformans* in *C. deneoformans*. Presenetljiv je delež izolatov genotipa AFLP2/VNIV, oziroma vrste *C. deneoformans*, ki znaša kar 63,0 %, saj naj bi bil genotip AFLP1/VNI, oziroma vrsta *C. neoformans* glavni povzročitelj kriptokokoze po vsem svetu in na večinskem delu Evrope, razen na področju Sredozemske Evrope. Na podlagi teh epidemioloških rezultatov, bi pričakovali, da bo tudi v Sloveniji prevladujoči genotip AFLP1/VNI (Viviani in Tortorano, 2009; Barchiesi in sod., 2005; Cogliati, 2013) Za primerjavo smo vzeli nekaj evropskih držav, v katerih so že bile izvedene epidemiološke študije kriptokokoze. Le na Hrvaškem prav tako kot v Sloveniji prevladuje genotip AFLP2/VNIV, oziroma vrsta *C. deneoformans* (Mlinaric - Missoni in sod, 2011). V Nemčiji, Avstriji, Švici, Franciji, Veliki Britaniji, Italiji, Srbiji in tudi Španiji prevladuje genotip AFLP1/VNI, okoli 20,0 % izolatov pripada genotipoma AFLP2/VNIV in AFLP3/VNIII, okoli 20,0 % izolatov pa pripada genotipom vrstnega kompleksa *C. gattii* (Tintelnot in sod., 2004; Guinea in sod., 2010; Cogliati, 2013; Arsic - Arsenijevic in sod., 2014). V Ameriki kar 70,0 % kriptokoknih okužb povzroča genotip AFLP1/VNI. Tudi v Aziji in Afriki prevladuje genotip AFLP1/VNI, v Oceaniji pa so prevladujoči vsi genotipi vrstnega kompleksa *C. gattii*, od vrstnega kompleksa *C. neoformans* pa je prevladujoč genotip AFLP1/VNI (Cogliati, 2013).

Večina izolatov glive v naši študiji pripada paritvenemu tipu α , in sicer kar 95,7 %. Tudi v ostalih državah se v precej večjem številu pojavljajo izolati s paritvenim tipom α , kot izolati s paritvenim tipom a (Tintelnot in sod., 2004; Guinea in sod., 2010; Mlinaric -

Missoni in sod., 2011; Arsic - Arsenijevic in sod., 2014), kar pripisujemo višji virulenci paritvenega tipa α , v nasprotju s paritvenim tipom a (Barchiesi in sod., 2005).

Pri devetih od 19 bolnikov smo v določenem časovnem obdobju osamili več izolatov glive (preglednica 2). Pri sedmih od devetih bolnikov, okuženimi z dvema ali več izolati, so osamljeni izolati pripadali enakemu genotipu, vendar si genetsko niso bili stodstotno enaki. Dva bolnika sta bila okužena z dvema različinama genotipoma glive (slike 11 - 19). Pri vseh sedmih bolnikih, okuženih z genotipsko unikatnimi izolati, je bila sorodnost slednjih najmanj 85,0 %. Pri bolniku Č (slika 14) smo osamili dva različna genotipa iz kompleksa glive *C. neoformans*. Trije izolati so pri bolniku Č pripadali vrsti *C. neoformans*, serotipu A in genotipu AFLP1/VNI, en izolat pa smo uvrstili v vrsto *C. deneoformans*, serotip D in v genotip AFLP2/VNIV. Sorodnost med izolati različnih genotipov, je bila 63,0 %. Vsi štirje izolati so bili osamljeni maja, leta 2008. Tudi pri bolniku E (slika 16) smo osamili dva različna genotipa glive. Oba izolata smo osamili istega dne, februarja 2014. En izolat je pripadal vrsti *C. deneoformans*, serotipu D in genotipu AFLP2/VNIV. Drugi izolat je pripadal hibridu med vrstama *C. neoformans* in *C. deneoformans*, serotipu AD ter genotipu AFLP3/VNIII. Njuna sorodnost je bila 83,5 %.

Glede na zastavljene hipoteze smo predvidevali, da bodo pri posameznikih, okuženih z več različnimi izolati, ti izolati genotipsko enaki in da bodo genotipsko različni sevi prisotni pri bolnikih z dolgotrajno okužbo. Na podlagi dobljenih rezultatov, hipoteze ne moremo popolnoma potrditi. Sedem od devetih bolnikov, pri katerih smo osamili več različnih izolatov v določenem časovnem obdobju, je bilo res okuženih z genotipsko unikatnim sevom, vendar je bil eden izmed teh bolnik z dolgotrajno okužbo, pri katerem smo pričakovali več genotipsko različnih sevov. Pri dveh od devetih bolnikov smo osamili genotipsko različna seva na isti dan, kar se ne sklada z našo hipotezo.

6 SKLEPI

- Glivo *C. neoformans* smo večinoma osamili pri imunsko oslabljenih bolnikih.
- V obdobju od oktobra 1998 do aprila 2016 je bilo v Sloveniji osamljenih 46 sevov glive iz kompleksa *C. neoformans*.
- V Sloveniji okužbo pri človeku povzročata vrsti *C. neoformans* in *C. deneoformans* ter hibrid med omenjenima vrstama *C. neoformans* x *C. deneoformans*.
- V Sloveniji so prisotni genotipi AFLP1/VNI, AFLP2/VNIV in AFLP3/VNIII.
- Prevladujoči genotip v Sloveniji je genotip AFLP2/VNIV (63,0 %).
- V Sloveniji so bolniki okuženi tudi z dvema genotipsko različnima sevoma.
- V naši raziskavi ni bilo bolnika z dolgotrajno okužbo, ki bi bil okužen z genotipsko različnimi sevi.

7 POVZETEK

Kriptokokozo povzročajo predstavniki bazidiomicetnih kvasovk iz rodu *Cryptococcus*, predvsem vrste, ki pripadajo vrstnemu kompleksu *C. gattii* in *C. neoformans* (La Hoz in Pappas, 2013). Kriptokokna okužba je postala ena izmed glavnih glivnih bolezni z nastopom pandemije virusa HIV. Kljub upadu okužb s pojavom protiretrovirusnega zdravljenja, je število okuženih še vedno visoko, predvsem v manj razvitih državah (La Hoz in Pappas, 2013). Globalno breme s HIV povezanim kriptokoknim meningitisom, je bilo ocenjeno na skoraj en milijon novih okužb vsako leto, približno 625.000 posameznikov vsako leto zaradi te okužbe umre, v večini primerov v Podnaharski Afriki (Park in sod., 2009).

Na podlagi epidemioloških raziskav izvedenih v Evropi je bilo ugotovljeno, da je *C. neoformans* (serotip A) glavni vzrok kriptokokne bolezni v večinskem delu Evrope, *C. deneoformans* in križanci med *C. neoformans* in *C. deneoformans* pa se bolj pogosto pojavljajo na področju Sredozemske Evrope (Cogliati, 2013; Viviani in sod., 2009). Kljub velikemu številu epidemioloških študij je znanega malo o razlikah v gostiteljskemu nagnjenju in kliničnih razlikah med *C. neoformans* in *C. deneoformans* ter njunih križancih (Dromer in sod., 1996).

Cilj naloge je bil raziskati pojav določenih molekularnih tipov iz rodu *Cryptococcus* v Sloveniji. V raziskavo je bilo vključenih 46 izolatov glive *C. neoformans*, ki so bili osamljeni v obdobju od oktobra 1998 do aprila 2016. Izolati so bili pridobljeni od skupno 19 bolnikov. Od desetih bolnikov smo osamili po en izolat glive, pri devetih pa smo osamili dva ali več različnih izolatov glive *C. neoformans*. Le pri dveh bolnikih smo dokazali soobstoj dveh različnih genotipov naenkrat. Ostalih 17 bolnikov, je bilo okuženih z genotipsko unikatnim sevom.

Na podlagi molekularne tipizacije smo ugotovili, da so v Sloveniji prisotni genotipi AFLP1/VNI, AFLP2/VNIV in AFLP3/VNIII. V genotip AFLP1/VNI in s tem v serotip A in vrsto *Cryptococcus neoformans* smo uvrstili 34,8 % izolatov, v genotip AFLP2/VNIV, serotip D in vrsto *C. deneoformans* 63,0 % izolatov, v hibridni serotip AD med vrstama *C. neoformans* in *C. deneoformans* oziroma v genotip AFLP3/VNIII pa smo uvrstili le 2,2 %

vseh izolatov. Večina izolatov, kar 95,7 % pripada paritvenemu tipu α, ostalih 4,3 % pa v paritvenemu tipu a.

8 VIRI

Andreoni S., Farina C., Lombardi G. 2004. Medical mycology atlas. Paderno Dugnano, Systems: 46-48

Antinori S. 2013. New insights into HIV/AIDS-associated cryptococcosis. International Scholary Research Notices AIDS, 471363, doi: 10.1155/2013/471363: 22 str.

Applied Biosystems. 2010. AFLP microbial fingerprinting: protocol. Foster City, Applied Biosystems: 47 str.

Arsic - Arsenijevic V., Pekmezovic M. G., Meis J. F., Hagen F. 2014. Molecular epidemiology and antifungal susceptibility of Serbian *Cryptococcus neoformans* isolates. Mycoses, 57: 380-387

Bamba S., Lortholary O., Sawadogo A., Millogo A., Guiguemde R. T., Bretagne S. 2012. Decreasing incidence of cryptococcal meningitis in West Africa in the era of highly active antiretroviral therapy. AIDS (London, England), 26: 1039-1041

Baddley J. W., Dismukes W. E. 2011. Cryptococcosis. V: Essentials of clinical mycology. 2nd ed. Kauffman C. A., Pappas P. G., Sobel J. D., Dismukes W. E. (eds.). New York, Springer: 207-226

Barchiesi F., Cogliati M., Esposto M. C., Spreghini E., Schimizzi A. M., Wickes B. L., Scalise G., Viviani M. A. 2005. Comparative analysis of pathogenicity of *Cryptococcus neoformans* serotypes A, D and AD in murine cryptococcosis. The Journal of Infection, 51: 10-16

Bartlett K. H., Cheng P. Y., Duncan C., Galanis E., Hoang L., Kidd S., Lee M. K., Lester S., MacDougall L., Mak S., Morshed M., Taylor M., Kronstad J. 2012. A decade of experience: *Cryptococcus gattii* in British Columbia. Mycopathologia, 173: 311-319

Boekhout T., Theelen B., Diaz M., Fell J. W., Hop W. C., Abeln E. C., Dromer F., Meyer W. 2001. Hybrid genotypes in the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. Microbiology (Reading, England), 147: 891-907

Bogovič P. 2015. Kriptokokoza. V: Infekcijske bolezni. Tomažič J., Strle F. (ur.). Ljubljana, Združenje za infektologijo, Slovensko zdravniško društvo: 548-550

Bovers M., Hagen F., Boekhout T. 2008a. Diversity of the *Cryptococcus neoformans* - *Cryptococcus gattii* species complex. Revista Iberoamericana de Micología, 25: 4-12

Bovers M., Hagen F., Kuramae E. E., Boekhot T. 2008b. Six monophyletic lineages identified within *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* by multi-locus sequence typing. Fungal Genetics and Biology, 45: 400-421

Buchanan K. L., Murphy J. W. 1998. What makes *Cryptococcus neoformans* a pathogen? Emerging Infectious Diseases, 4: 71 - 83

Campbell C. K., Johnson E. M., Philpot C. M., Warnock D. W. 1996. Identification of pathogenic fungi. London, Public Health Laboratory Service: 242-249

Chaturvedi V., Flynn T., Niehaus W. G., Wong B. 1996. Stress tolerance and pathogenic potential of a mannitol mutant of *Cryptococcus neoformans*. Microbiology, 142: 937-943

Cherniak R., Reiss E., Slodki M. E., Plattner R. D., Blumer S. O. 1980. Structure and antigenic activity of the capsular polysaccharide of *Cryptococcus neoformans*. Molecular Immunology, 17: 1025-1032

Cogliati M. 2013. Global molecular epidemiology of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*: an atlas of molecular types. Scientifica (Ciaro), ID 675213, doi: 10.1155/2013/675213: 23 str.

Dromer F., Mathoulin S., Dupont B., Letenneur L., Ronin O. 1996. Individual and environmental factors associated with infection due to *Cryptococcus neoformans* serotype D. Clinical Infectious Diseases: An Official Publication Of The Infectious Diseases Society of America, 23: 91-96

Dromer F., Mathoulin – Pelissier S., Fontanet A., Ronin O., Dupont B., Lortholary O.

2004. Epidemiology of HIV-associated cryptococcosis in France (1985-2001): comparison of the pre- and post-HAART eras. AIDS (London, England), 18: 555-562

Guinea J., Hagen F., Pelaez T., Boekhout T., Tahoune H., Torres – Narbona M., Bouza E. 2010. Antifungal susceptibility, serotyping, and genotyping of clinical *Cryptococcus neoformans* isolates collected during 18 years in single institution in Madrid, Spain. Medical Mycology, 48: 942-948

Hagen F., Illnait – Zaragozi M. T., Meis J. F. Chew W. H., Curfs – Breuker I., Mouton J.

W., Hoepelman A. I., Spanjaard L., Verweij P. E., Kampinga G. A., Kuijper E. J., Boekhout T., Klaassen C. H. 2012. Extensive genetic diversity within the Dutch clinical *Cryptococcus neoformans* population. Journal of Clinical Microbiology, 50: 1918-1926

Hu G., Liu I., Sham A., Stajich J. E., Dietrich F. S., Kronstad J. W. 2008. Comparative hybridization reveals extensive genome variation in the AIDS-associated pathogen *Cryptococcus neoformans*. Genome Biology, R41, doi: 10.1186/gb-2008-9-2-r41: 17 str.

Hull C. M., Heitman J. 2002. Genetics of *Cryptococcus neoformans*. Annual Reviews of Genetics, 36: 557-615

Institut Pasteur. 2016. Epidemiological studies on invasive fungal infections. Paris, Institut Pasteur: 1 str.

<https://research.pasteur.fr/en/project/epidemiological-studies-on-invasive-fungal-infections/> (maj, 2016)

Jarvis J. N., Harrison T. S. 2007. HIV-associated cryptococcal meningitis. AIDS (London, England), 21: 2119-2129

Karkowska - Kuleta J., Repala-Kozik M., Kozik A. 2009. Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*. Acta Biochimica Polonica, 56: 211-224

Kozubowski L., Heitman J. 2012. Profiling a killer, the development of *Cryptococcus neoformans*. FEMS Microbiology Reviews, 36: 78-94

Kwon - Chung K. J. 1975. A new genus, *Filobasidiella*, the perfect state of *Cryptococcus neoformans*. Mycologia, 67: 1197 - 1200

Kwon - Chung K. J., Edman J.C., Wickes B.L. 1992. Genetic association of mating types and virulence in *Cryptococcus neoformans*. Infection and Immunity, 60: 602-605

La Hoz R. M., Pappas P.G. 2013. Cryptococcal infections: changing epidemiology and implications for therapy. Drugs, 73, 6: 495 - 504

Lengeler K. B., Cox G. M., Heitman J. 2001. Serotype AD strains of *Cryptococcus neoformans* are diploid or aneuploid and are heterozygous at the mating-type locus. Infection and Immunity, 69: 115-122

Lui G., Lee N., Ip M., Choi K. W., Tso Y. K., Lam E., Chau S., Lai R., Cockram C. S. 2006. Cryptococcosis in apparently immunocompetent patients. QJM: Monthly Journal of the Association of Physicians, 99: 143-151

Mitchell T. G. 2013. Mycology. V: Jawetz, Melnick & Adelberg's Medical microbiology 26th ed. Brooks G. F., Carroll K. C., Butel J. S., Morse S. A., Mietzner T. A. (eds.). San Francisco, A Lange medical book: 697-699

Mlinaric - Missoni E., Hagen F, Chew W. H., Vazic-Babic V., Boekhout T., Begovic J. 2011. *In vitro* antifungal susceptibilities and molecular typing of sequentially isolated clinical *Cryptococcus neoformans* strains from Croatia. Journal of Medical Microbiology, 60: 1487-1495

NCBI. 2015. Taxonomy browser: *Cryptococcus neoformans*. Bethesda, NCBI – National Center for Biotechnology Information: 1 str.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi> (december, 2015)

Odom A., Muir S., Lim E., Toffaletti D. L., Perfect J., Heitman J. 1997. Calcineurin is required for virulence of *Cryptococcus neoformans*. The EMBO Journal, 16: 2576-2589

- Park B. J., Wannemuehler K. A., Marston B. J., Govender N., Pappas P. G., Chiller T. M. 2009. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. AIDS (London, England), 23: 525-230
- Paschoal R. C., Hirata M. H., Hirata R. C., Melhem M. S., Dias A. L., Paula C. R. 2004. Necryptococcosis: diagnosis by PCR method. Revista do Instituto de Medicina Tropical Sao Paulo, 46: 203-207
- Rhodes J. C., Polacheck I., Kwon - Chung K. J. 1982. Phenoloxidase activity and virulence in isogenic strains of *Cryptococcus neoformans*. Infecton and Immunity, 36: 11751184
- Sloan D. J., Parris V. 2014. Cryptococcal meningitis: epidemiology and therapeutic options. Clinical Epidemiology, 6: 169-182
- Speed B., Dunt D. 1995. Clinical and host differences between infections with the two varieties od *Cryptococcus neoformans*. Clinical Infectious Diseases, 21: 28-34
- Subramanian S., Mathai D. 2005. Clinical manifestations and of cryptococcal infection. Journal of Postgraduate Medicine, 5: 21-26
- Tintelnot K., Lemmer K., Losert H., Schär G., Polak A. 2004. Follow-up of epidemiological data of cryptococcosis in Austria, Germany and Switzerland with special focus on the characterization of clinical isolates. Mycoses, 47: 455-464
- Van Elden L. J., Walenkamp A. M., Lipovsky M. M., Reiss P., de Marie S., Dankert J., Hoepelman A. I. 2000. Declining number of patients with cryptococcosis in the Netherlands in the era of highly active antiretroviral therapy. AIDS (London, England), 14: 2787-2788
- Viviani M. A., Tortorano A. M. 2009. Cryptococcus. V: Clinical mycology. 2nd ed. Anaissie E. J., McGinnis M. R., Pfaffer M. A. (eds.). Churchill Livingstone, Elsevier: 231-249

Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., Lee T., Hornes M., Frijters A., Pot F., Peleman J., Kuiper M., Zabeau M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Research, 21: 4407-4414

Wickes B. L., Mayorga M. E., Edman U., Edman J. C. 1996. Dimorphism and haploid fruiting in *Cryptococcus neoformans*: association with the alpha-mating type. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America, 93: 7327-7331

WHO. 2011. Rapid advice: diagnosis, prevention and management of cryptococcus infection in adults and children. WHO Document Production Services. Geneva, World Health Organization: 3-31

ZAHVALA

Zahvaljujem se svoji mentorici doc. dr. Tadeji Matos za sprejetje mentorstva, usmerjanje in vso pomoč pri izdelavi naloge.

Iskreno se zahvaljujem Roku Tomazinu univ. dipl. mikr. za vodenje in usmerjanje mojega dela v laboratoriju. Zahvaljujem se za vse spodbudne besede, koristne nasvete in dobre razlage.

Zahvaliti bi se želela tudi Janji Svoljšak in Tatjani Marinko iz Laboratorija za diagnostiko glivičnih infekcij, za vso prijaznost in spodbudne besede.

Zahvaljujem se tudi dr. Ferry-ju Hagen-u in sodelavcem za opravljen praktični del naloge na Oddelku za klinično mikrobiologijo in infekcijske bolezni, v Bolnišnici Canisius - Wilhelmina, v Nizozemskem.

Za objektiven pregled magistrskega dela in vse koristne nasvete se zahvaljujem recenzentki prof. dr. Evi Ružić Sabljić.

Največja zahvala gre moji družini; mami Dalji, očetu Matjažu, bratu Maticu in Timoteju, ki so me skozi vsa leta študija spodbujali, me podpirali in mi stali ob strani.