

8. LIKARJEV SIMPOZIJ: Mikologija – od mikrobiologije do klinike

- 3 Kandidemija: nacionalna epidemiološka raziskava, 2013–2017 – *Andrej Golle, Mateja Pirš, Rok Tomazin, Zmago Novak, Urša Košir, Andrej Rojnik, Irena Grmek Košnik, Iztok Štrumbelj, Tatjana Harlander, Anamarija Jurjašević Dodič, Irena Piltaver Vajdec, Jerneja Fišer, Tadeja Matos*
- 17 Kriptokokne okužbe v Sloveniji: značilnosti povzročiteljev – *Rok Tomazin, Tadeja Matos*
- 27 Odpornost plesni *Aspergillus fumigatus* proti azolom – *Tadeja Matos, Rok Tomazin*
- 37 *Pneumocystis jirovecii*: možni bolnišnični prenos – *Miha Skvarč*
- 43 Pomen opredeljevanja glivnih antigenov pri onkoloških bolnikih – *Milena Kerin Povšič, Saša Simčič*
- 53 Glivne okužbe pri cistični fibrozi – *Marina Praprotnik, Ana Kotnik Pirš, Aleksandra Zver, Malena Aldeco, Dušanka Lepej, Uroš Krivec*
- 59 Endemske mikoze včeraj, danes, jutri – *Tadeja Kotar, Jasna Černoša*
- 65 Dermatofitije: diagnostika, epidemiologija in zdravljenje – *Andrej Golle, Tadeja Matos, Rok Tomazin, Pij Bogomir Marko, Urša Košir, Marica Lugovski, Urška Dermota, Anamarija Jurjašević Dodič, Zdenka Horvat Šardi, Tatjana Harlander, Ingrid Berce*
- 75 Strategije zdravljenja invazivnih glivnih bolezni in poraba protiglivnih zdravil pri nas in v Evropi – *Bojana Beović*
- 81 Smiselnost in problem standardizacije mikološkega nadzora zraka bolnišničnega okolja – *Rok Tomazin*
- 87 Analiza glivne združbe s pristopi sekvenciranja naslednje generacije – *Aleksander Mahnič, Aleksander Kocuvan, Maja Rupnik*
- 95 Intestinalna mukormikoza – prikaz dveh primerov – *Vladan Rajič, Janez Jazbec, Simona Lucija Avčin, Lidija Kitanovski*
- 103 *Scedosporium apiospermum* kot vzrok glivnega endoftalmitisa – *Matej Kokalj, Tadeja Matos*
- 111 Kriptokokni celulitis: prikaz primera – *Ivana Velimirovič, Rok Tomazin, Tadeja Matos, Janez Tomažič*

MEDICINSKI RAZGLEDI

Letnik 57; Supplement 3; Julij 2018

8. LIKARJEV SIMPOZIJ: **Mikologija – od mikrobiologije** **do klinike**

Zbornik predavanj

ORGANIZATORJI

Sekcija za klinično mikrobiologijo
in bolnišnične okužbe Slovenskega
zdravniškega društva in

Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo
Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani

GLAVNI UREDNIK ZBORNIKA

Doc. dr. Tadeja Matos, dr. med.

ORGANIZACIJSKI ODBOR

Izr. prof. dr. Miroslav Petrovec, dr. med.
Prof. dr. Mario Poljak, dr. med.
Helena Ribič, dr. med.
Mag. Andrej Golle, dr. med.
Doc. dr. Mateja Pirš, dr. med.
Doc. dr. Tadeja Matos, dr. med.

RECENZENTI

Prof. dr. Eva Ružič Sabljic, dr. med.
Doc. dr. Mateja Pirš, dr. med.
Asist. dr. Julija Germ, dr. med.
Doc. dr. Tadeja Matos, dr. med.

UREDNIŠKA EKIPA

Nina Anžič, Anžej Hladnik, Katja Kores,
Gašper Tonin, Nika Vrabič

UREDNIŠTVO

Društvo Medicinski razgledi
Korytkova ulica 2
1000 Ljubljana
Slovenija

T (01) 524 23 56 **F** (01) 543 70 11

E info@medrazgl.si

S www.medrazgl.si

POR: 02014-0050652588

GLAVNA UREDNICA

Tjaša Gortnar

ODGOVORNI UREDNIK

Nik Krajnc

TEHNIČNA UREDNIKA

Maša Majcen, Samo Roškar, Anžej
Hladnik

UREDNIŠKI ODBOR

Nina Anžič, Matej Goričar, Kristina Jevnikar,
Vanessa Koračin, Katja Kores, Ana Karin Kozjek,
Irena Krapež, Rok Kučan, Anita Meglič, Andraž
Nendl, Jure Puc, Gašper Tonin, Lana Vodnik,
Nika Vrabič, Hana Zavrtnik, Sandra Žunič

LEKTORJA

Kristijan Armeni, Mateja Hočevar
Gregorič

PRELOM

SYNCOMP d. o. o.

TISK

Nonparel d. o. o.

FOTOGRAFIJA NA NASLOVNICI

Doc. dr. Tadeja Matos, dr. med.

ZBORNIK ABSTRAHIRAJO **IN/ALI INDEKSIRAJO**

Biological Abstracts, Biomedicina
Slovenica, Bowker International,
Chemical Abstracts, Nutritional
Abstracts

COPYRIGHT © MEDICINSKI RAZGLEDI 2018

Vse pravice pridržane. Razmnoževanje ali razširjanje posameznih delov ali celotne publikacije s katerim koli sredstvom brez pisnega privoljenja založbe je prepovedano.

8. LIKARJEV SIMPOZIJ: Mikologija – od mikrobiologije do klinike

- 3 Kandidemija: nacionalna epidemiološka raziskava, 2013–2017 – *Andrej Golle, Mateja Pirš, Rok Tomazin, Zmago Novak, Urša Košir, Andrej Rojnik, Irena Grmek Košnik, Iztok Štrumbelj, Tatjana Harlander, Anamarija Jurjašević Dodič, Irena Piltaver Vajdec, Jerneja Fišer, Tadeja Matos*
- 17 Kriptokokne okužbe v Sloveniji: značilnosti povzročiteljev – *Rok Tomazin, Tadeja Matos*
- 27 Odpornost plesni *Aspergillus fumigatus* proti azolom – *Tadeja Matos, Rok Tomazin*
- 37 *Pneumocystis jirovecii*: možni bolnišnični prenos – *Miha Skvarč*
- 43 Pomen opredeljevanja glivnih antigenov pri onkoloških bolnikih – *Milena Kerin Povšič, Saša Simčič*
- 53 Glivne okužbe pri cistični fibrozi – *Marina Praprotnik, Ana Kotnik Pirš, Aleksandra Zver, Malena Aldeco, Dušanka Lepej, Uroš Krivec*
- 59 Endemske mikoze včeraj, danes, jutri – *Tadeja Kotar, Jasna Černoša*
- 65 Dermatofitije: diagnostika, epidemiologija in zdravljenje – *Andrej Golle, Tadeja Matos, Rok Tomazin, Pij Bogomir Marko, Urša Košir, Marica Lugovski, Urška Dermota, Anamarija Jurjašević Dodič, Zdenka Horvat Šardi, Tatjana Harlander, Ingrid Berce*
- 75 Strategije zdravljenja invazivnih glivnih bolezni in poraba protiglivnih zdravil pri nas in v Evropi – *Bojana Beovič*
- 81 Smiselnost in problem standardizacije mikološkega nadzora zraka bolnišničnega okolja – *Rok Tomazin*
- 87 Analiza glivne združbe s pristopi sekvenciranja naslednje generacije – *Aleksander Mahnič, Aleksander Kocuvan, Maja Rupnik*

- 95 Intestinalna mukormikoza – prikaz dveh primerov – *Vladan Rajič, Janez Jazbec, Simona Lucija Avčin, Lidija Kitanovski*
- 103 *Scedosporium apiospermum* kot vzrok glivnega endoftalmitisa – *Matej Kokalj, Tadeja Matos*
- 111 Kriptokokni celulitis: prikaz primera – *Ivana Velimirović, Rok Tomazin, Tadeja Matos, Janez Tomažič*

Andrej Golle¹, Mateja Pirš², Rok Tomazin³, Zmago Novak⁴, Urša Košir⁵, Andrej Rojnik⁶, Irena Grmek Košnik⁷, Iztok Štrumbelj⁸, Tatjana Harlander⁹, Anamarija Jurjašević Dodič¹⁰, Irena Piltaver Vajdec¹¹, Jerneja Fišer¹², Tadeja Matos¹³

Kandidemija: nacionalna epidemiološka raziskava, 2013–2017

Candidaemia: the National Epidemiologic Study, 2013–2017

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: kandidemija, kvasovke, *Candida*, protiglivna zdravila, epidemiologija

Vrste iz rodu *Candida* so del normalne mikrobiote sluznice prebavil, zunanjih spolovil in kože. Vedno pogosteje se pojavljajo kot pomemben povzročitelj okužb krvi pri populaciji z dejavniki tveganja za oportunistične okužbe. Število invazivnih okužb s *Candida* spp. se viša, hkrati pa se, predvsem zaradi uporabe flukonazola v preventivne namene in ehinokandinov za zdravljenje, spreminja porazdelitev povzročiteljev kandidemij. V prispevku predstavljamo epidemiologijo kandidemij v obdobju 2013–2017 na osnovi podatkov, ki smo jih pridobili iz devetih slovenskih kliničnih mikrobioloških laboratorijev. Zabeležili smo 586 epizod kandidemij pri 557 bolnikih, pri katerih smo osamili 575 izolatov. Incidenčne stopnje so bile najvišje v starostnih skupinah nad 60 let (383 bolniki) in višje pri moških (63,0 %) kot pri ženskah. Najpogosteje osamljena vrsta je bila *Candida albicans* (51,7 %), sledile so ji *Candida glabrata* (27,7 %), *Candida parapsilosis* (6,6 %), *Issatchenkia orientalis* (*Candida krusei*) (3,7 %) in *Candida tropicalis* (3,1 %). Delež ostalih vrst je skupaj

¹ Mag. Andrej Golle, dr. med., Oddelek za medicinsko mikrobiologijo Maribor, Center za medicinsko mikrobiologijo, Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Prvomajska ulica 1, 2000 Maribor; andrej.golle@nizoh.si

² Doc. dr. Mateja Pirš, dr. med., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana

³ Asist. Rok Tomazin, univ. dipl. mikrobiol., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana

⁴ Zmago Novak, dr. med., Oddelek za infektivne bolezni in vročinska stanja, Univerzitetni klinični center Maribor, Ljubljanska ulica 5, 2000 Maribor

⁵ Mag. Urša Košir, mag. mikrobiol., Oddelek za medicinsko mikrobiologijo Maribor, Center za medicinsko mikrobiologijo, Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Prvomajska ulica 1, 2000 Maribor

⁶ Andrej Rojnik, dr. med., Oddelek za medicinsko mikrobiologijo Celje, Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Gregorčičeva ulica 5, 3000 Celje

⁷ Dr. Irena Grmek Košnik, dr. med., Oddelek za medicinsko mikrobiologijo Kranj, Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Gosposvetska ulica 12, 4000 Kranj

⁸ Iztok Štrumbelj, dr. med., Oddelek za medicinsko mikrobiologijo Murska Sobota, Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Ulica arhitekta Novaka 2b, 9000 Murska Sobota

⁹ Tatjana Harlander, dr. med., Oddelek za medicinsko mikrobiologijo Novo mesto, Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Mej vrti 5, 8000 Novo mesto

¹⁰ Anamarija Jurjašević Dodič, univ. dipl. mikrobiol., Oddelek za medicinsko mikrobiologijo Koper, Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Verdijeva ulica 11, 6000 Koper

¹¹ Irena Piltaver Vajdec, dr. med., Oddelek za mikrobiologijo, Splošna bolnišnica Slovenj Gradec, Gosposvetska cesta 1, 2380 Slovenj Gradec

¹² Jerneja Fišer, dr. med., Mikrobiološki laboratorij, Splošna bolnišnica Dr. Franca Derganca Nova Gorica, Ulica padlih borcev 13A, 5290 Šempeter pri Gorici

¹³ Doc. dr. Tadeja Matos, dr. med., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana

znašal 7,2 %. Pri podatkih o občutljivosti za protiglivna zdravila smo uporabili rezultate, ki so bili izraženi kot minimalne inhibitorne koncentracije. Interpretirali smo jih v skladu z zadnjimi smernicami Inštituta za klinične in laboratorijske standarde (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI). Ugotavljali smo občutljivost petih najpogosteje osamljenih vrst na amfotericin B, kaspofungin, flukonazol, vorikonazol, anidulafungin in mikafungin. Pri *C. albicans* ugotavljamo visoko občutljivost za vsa testirana protiglivna zdravila (≥ 95 %). *C. glabrata* je sorazmerno visoko občutljiva za ehinokandine, nižja je občutljivost za flukonazol (73,9 % pri uporabi visokih odmerkov), občutljivost na amfotericin B je 92,4 %. *C. parapsilosis* je visoko občutljiva za vorikonazol (100 %), nižja je občutljivost za amfotericin B in flukonazol (93,9 %), občutljivost za mikafungin je visoka (93,7 %). *I. orientalis* (*C. krusei*) je visoko občutljiva za anidulafungin (100 %), občutljivost za ostala protiglivna zdravila je nižja (amfotericin B 84,2 %, vorikonazol 78,9 %, kaspofungin 18,2 %). *C. tropicalis* je visoko občutljiva za kaspofungin (100 %), nižje za amfotericin B (92,8 %) in nizko za flukonazol ter vorikonazol (86,7 oz. 84,6 %). Incidenca kandidemij (število bolnikov/100.000) se je v opazovanem obdobju zvišala s 4,4 na 7,1. Hkrati ugotavljamo tudi visok delež vrst iz rodu *Candida*, ki so pogosto odporne proti uporabljenim protiglivnim zdravilom (48 %).

ABSTRACT

KEY WORDS: candidaemia, yeast, *Candida*, antifungal agents, epidemiology

Candida spp. are part of the normal gastrointestinal, external genital, and skin microbiota. However, they are increasingly occurring as an important cause of bloodstream infections, especially in the population with increased risk factors for opportunistic infections. The number of invasive infections with *Candida* spp. is increasing and the spectrum of pathogens causing candidaemia is changing due to the use of fluconazole for preventive purposes and echinocandins for treatment. In this paper, we present the epidemiology of candidaemia in Slovenia in the period 2013–2017 based on data obtained from nine Slovenian medical microbiological laboratories. During this period, 568 episodes of candidaemia were recorded in 557 patients, altogether 575 isolates were isolated. Incidence rates were highest in age groups above 60 years (383 patients) and were also higher in male (63.0%) than in female patients. The isolated species were *Candida albicans* (51.7%), *Candida glabrata* (27.7%), *Candida parapsilosis* (6.6%), *Issatchenkia orientalis* (*Candida krusei*) (3.7%), *Candida tropicalis* (3.1%), and others (7.2%). The results of antifungal susceptibility testing were expressed as minimal inhibitory concentrations and interpreted in accordance with the latest Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines. The five most frequently isolated species were subjected to susceptibility testing to amphotericin B, caspofungin, fluconazole, voriconazole, anidulafungin, and micafungin. *C. albicans* isolates were susceptible to all tested antifungal agents (≥ 95 %). *C. glabrata* was relatively susceptible to echinocandins, susceptibility to fluconazole was low (73.9% susceptible, but dose-dependent). Susceptibility to amphotericin B was 92.4%. *C. parapsilosis* was susceptible to voriconazole (100%), amphotericin B, and fluconazole (both 93.9%). Susceptibility to micafungin was high (93.7%). *I. orientalis* (*C. krusei*) was completely susceptible to anidulafungin (100%) and had lower susceptibility for other antifungal agents (amphotericin B 84.2%, voriconazole 78.9%, caspofungin 18.2%). *C. tropicalis* was highly sensitive to caspofungin (100%), a little less to amphotericin B (92.8%), and poorly to

triazoles (lower than 87.0%). The incidence of candidaemia increased from 4.23/100,000 inhabitants to 7.02/100,000 inhabitants in the observed period. At the same time, we also observed a high proportion of *Candida* spp. that were often resistant or prone to develop resistance to antifungal drugs.

UVOD

Glive rodu *Candida* so del normalne mikrobiote, ki kolonizira sluznice prebavil, zunanjih spolovil in kožo (1). Število invazivnih okužb in kandidemij, ki jih povzročajo glive rodu *Candida*, se v razvitih državah povečuje. Naraščanje incidence okužb krvi z vrstami rodu *Candida* je povezano z napredkom v sodobni medicini, zlasti zaradi povečevanja populacije z dejavniki tveganja (zdravljenje v enoti intenzivne terapije, starost, nedonošenost, osrednji venski in drugi žilni katetri, oslabiljen imunski odziv, nevtropenija, protimikrobno zdravljenje, imunosupresivno zdravljenje, večji kirurški posegi, zlasti v trebušni votlini, popolna parenteralna prehrana, sočasna hujša obolenja) za oportunistične okužbe (1–3). Med povzročitelji okužb krvi se v ZDA *Candida* spp. uvrščajo na četrto, v Evropi pa na sedmo mesto (4). Incidenčna stopnja kandidemije se v svetovnem merilu ocenjuje na 2–14/100.000 prebivalcev (5). *Candida* spp. sodijo med pogostejše povzročitelje okužb, povezane z zdravljenjem, in so pomemben vzrok obolevnosti in smrtnosti (4, 5). Poznamo vsaj 15 vrst kandid, ki povzročajo okužbe pri človeku, v več kot 95 % pa invazivne glivne okužbe povzročajo: *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* in *Issatchenkia orientalis* (*Candida krusei*). Med njimi še vedno prevladuje *C. albicans*, delež vrst, ki niso *C. albicans*, se razlikuje glede na zemljepisno lokacijo in čas (1, 6). Izražene so razlike v incidenci *C. glabrata*, ki prevladuje na severni polobli, in *C. parapsilosis*, ki jo pogosteje srečamo kot povzročitelja kandidemije na južni polobli in v Aziji (6, 7). Zaradi vse večje rabe flukonazola v preventivne namene pri bol-

nikih s povišanimi dejavniki tveganja in uporabe ehinokandinov za zdravljenje pri bolnikih z dokazano kandidemijo se spekter povzročiteljev spreminja (6, 8, 9). Z našim prispevkom želimo predstaviti porazdelitev najpomembnejših povzročiteljev kandidemij v Sloveniji za obdobje 2013–2017 glede na posamične vrste, porazdelitev okužb krvi, povzročenih z rodovi vrste *Candida* v populaciji glede na starost in spol bolnikov, in prikazati občutljivost iz krvi najpogosteje osamljenih vrst za protiglivična zdravila.

MATERIALI IN METODE

Podatke za raziskavo je prispevalo devet slovenskih mikrobioloških laboratorijev:

- Laboratorij za diagnostiko glivičnih okužb Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani,
- Oddelki Nacionalnega laboratorija za zdravje, okolje in hrano (NLZOH) v Mariboru:
 - Oddelek za medicinsko mikrobiologijo Maribor,
 - Oddelek za medicinsko mikrobiologijo Celje,
 - Oddelek za medicinsko mikrobiologijo Kranj,
 - Oddelek za medicinsko mikrobiologijo Novo mesto,
 - Oddelek za medicinsko mikrobiologijo Murska Sobota,
 - Oddelek za medicinsko mikrobiologijo Koper,
 - Oddelek za mikrobiologijo Splošne bolnišnice Slovenj Gradec in
- Mikrobiološki laboratorij Splošne bolnišnice Dr. Franca Derganca Nova Gorica.

Kri za hemokulture je bila odvzeta in poslana na preiskavo iz vseh slovenskih regij

(Oddelki Univerzitetnih kliničnih centrov v Ljubljani in Mariboru, Onkološki inštitut v Ljubljani, Splošna bolnišnica Celje, Splošna bolnišnica dr. Jožeta Potrča Ptuj, Splošna bolnišnica Dr. Franca Derganca Nova Gorica, Splošna bolnišnica Jesenice, Splošna bolnišnica Murska Sobota, Splošna bolnišnica Novo mesto, Splošna bolnišnica Trbovlje, Splošna bolnišnica Slovenj Gradec in Splošna bolnišnica Izola). Sistemi za hemokulture, ki so jih v tem času uporabljali sodelujoči laboratoriji, so bili BacT/Alert3D (bioMérieux, Marcy l'Étoile, Francija), BacT/Alert Virtuo (bioMérieux, Durham, Severna Karolina, ZDA) in Bactec 9120 (Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, ZDA). Hemokulturne stekleničke smo inkubirali v skladu s standardnimi navodili za delo (pet do deset dni). Kri iz pozitivnih hemokulturnih stekleničk, v katerih smo z razmazom po Gramu videli blastokonidije, smo precepili na kromogeno gojišče (CHROMagar Co., Pariz, Francija). Identifikacijo poraslih kolonij smo izvajali preliminarno glede na morfologijo rasti na kromogenem gojišču in jo potrdili z uporabo avtomatiziranih identifikacijskih sistemov (API Candida, ID32C ali VITEK® 2 YST ID, bioMérieux, Marcy l'Étoile, Francija) oz. z masno spektrometrijo z metodo ionizacije v matriksu z desorpcijo z laserjem in masnim analizatorjem na čas preleta ionov (angl. *matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry*, MALDI TOF MS) – sistem Bruker Biotyper MALDI-TOF MS (Bruker Daltonik GmbH, Leipzig, Nemčija) po proizvajalčevih navodilih.

Retrospektivno smo analizirali podatke o osamitvi in občutljivosti gliv iz rodu *Candida* v obdobju 1. 1. 2013–31. 12. 2017. Incidenčno stopnjo glede na število bolnikov na koledarsko leto smo izračunali na 100.000 prebivalcev. Ker so pridobljeni laboratorijski podatki zajemali skoraj celotno Slovenijo, smo v imenovalcu upoštevali število prebivalcev Slovenije, ki smo jih pridobili s spletne strani Statističnega urada

Republike Slovenije (SURS), na dan 1. 1. za tekoča leta (2013–2017) (10).

Testiranje občutljivosti za protiglivično zdravilo smo izvedli z gradientno difuzijsko metodo v skladu z navodili proizvajalca (bioMérieux, Marcy l'Étoile, Francija). Pri interpretaciji vrednosti minimalnih inhibičnih koncentracij (MIK) smo upoštevali mejne vrednosti, kot jih opredeljuje najnovejši dokument ameriškega Inštituta za klinične in laboratorijske standarde (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) – CLSI M27-S4 (11). Ker v slednjem niso opredeljene mejne vrednosti za amfotericin B, smo kot občutljive za amfotericin B upoštevali vse *Candida* spp. z MIK $\leq 1 \mu\text{g/ml}$ v skladu s priporočili iz članka, ki so ga objavili Pfaller in sodelavci (12).

REZULTATI

V petletnem obdobju 1. 1. 2013–31. 12. 2017 smo pri 557 bolnikih zabeležili 568 epizod kandidemij in osamili 575 izolatov. Število bolnikov na leto in porazdelitev glede na spol prikazuje tabela 1. Kot novo epizodo kandidemije smo upoštevali ponovno osamitev *Candida* spp. iz krvi, če se je ta pojavila po več kot treh tednih od prve osamitve. Pri 14 bolnikih smo ugotavljali mešane okužbe, pri katerih sta bili prisotni dve ali več vrst *Candida* spp. ob istem odvzemu, pri 103 bolnikih pa smo ugotavljali sočasne bakteriemije (upoštevali smo osamitev bakterije iz krvi istočasno ali v roku treh dni pred osamitvijo *Candida* spp. oz. po njej). Pri mešanih, večglivnih okužbah smo največkrat sočasno osamili *C. albicans* in *C. glabrata* (osemkrat), *C. glabrata* in *I. orientalis* (*C. krusei*) (dvakrat) in po enkrat *I. orientalis* (*C. krusei*) in *C. lusitanae*, *C. glabrata* in *C. dubliniensis*, *C. glabrata* in *C. parapsilosis*, ter *C. albicans* in *I. orientalis* (*C. krusei*). Bakterije, ki smo jih osamili sočasno s *Candida* spp., prikazuje tabela 2.

Delež bolnikov moškega spola je bil 59–66 %. V celotnem obdobju je znašal 63 %.

Pri 103 bolnikih smo iz kultur krvi sočasno ob kandidah osamili še bakterije –

Tabela 1. Prikaz skupnega števila bolnikov, pri katerih smo iz krvi osamili glive rodu *Candida* v petletnem obdobju (2013–2017), ter porazdelitev števila in spola bolnikov po letih.

Leto	Skupno število bolnikov na leto	Število in delež moških (%)	Število in delež žensk (%)
2013	87	57 (65,5)	30 (34,5)
2014	85	56 (65,9)	29 (34,1)
2015	121	74 (61,2)	47 (38,8)
2016	119	70 (58,8)	49 (41,2)
2017	145	94 (64,8)	51 (35,2)
Skupaj	557	351 (63,0)	206 (37,0)

Tabela 2. Vrste bakterij, ki smo jih osamili sočasno z glivami *Candida* spp.

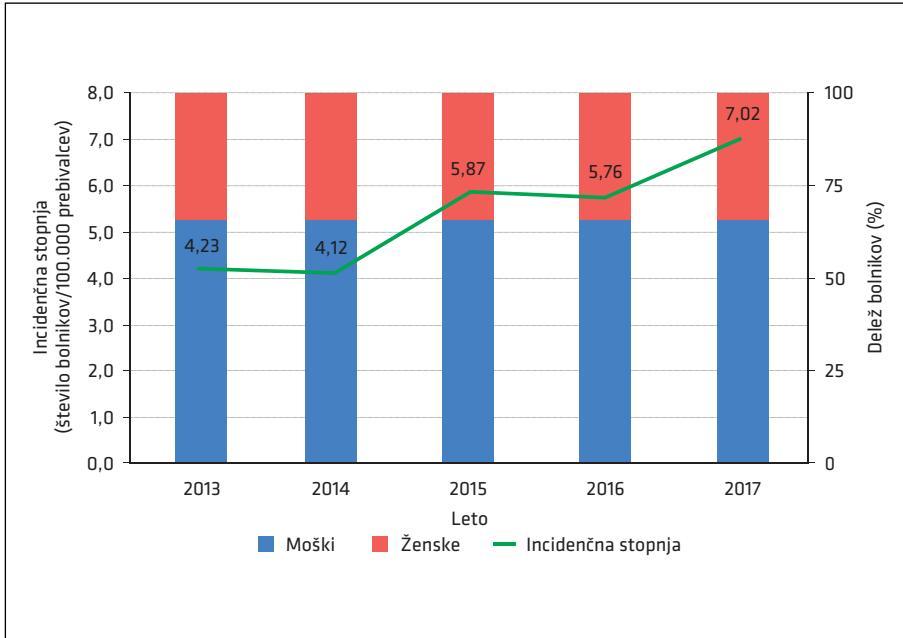
Vrsta bakterije	Število bolnikov z izolati
Koagulazno negativni stafilokoki	49
Enterobakterije	26
<i>Enterococcus</i> spp.	20
<i>Lactobacillus</i> spp	8
<i>Streptococcus</i> spp.	8
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6
<i>Acinetobacter</i> spp.	4
<i>Corynebacterium</i> spp.	4
<i>Staphylococcus aureus</i>	3
Anaerobne bakterije	3
<i>Bacillus</i> spp.	1
<i>Chryseobacterium indologenes</i>	1
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1
Skupno število iz krvi sočasno osamljenih bakterij	103 bolnikov
	143 izolatov

22 bolnikov je imelo sočasno dve vrsti bakterij, sedem bolnikov pa je imelo sočasno tri vrste bakterij.

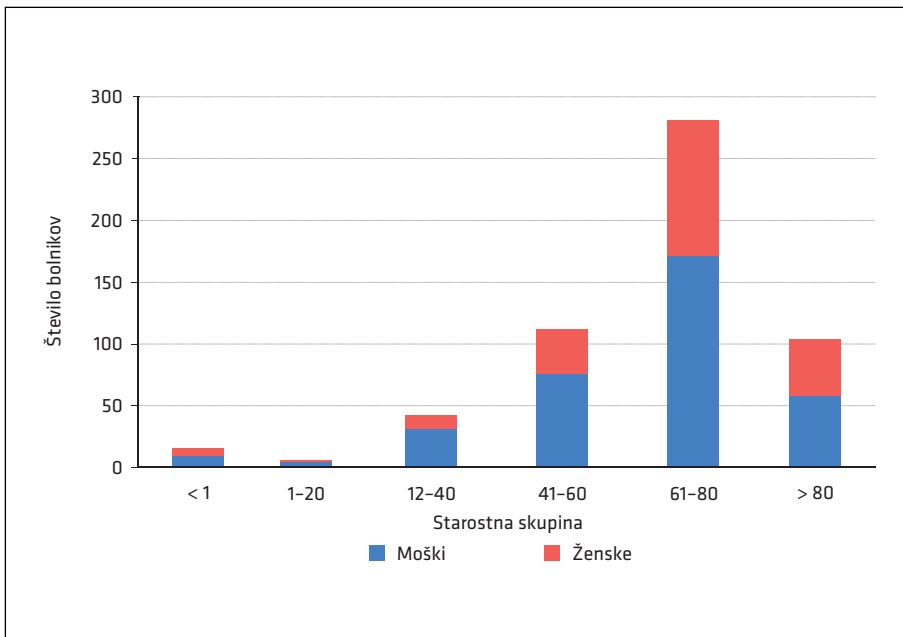
Na podlagi števila bolnikov v koledarskem letu smo izračunali incidenčne stopnje na 100.000 prebivalcev, uporabili smo podatke o prebivalstvu v Sloveniji, dosegljive na spletni strani SURS (10). Incidenčna stopnja je znašala 4,22/100.000 prebivalcev v letu 2013 in se je povišala na 7,02/100.000 prebivalcev v letu 2017 (slika 1).

Bolnike smo razdelili v starostne skupine: < 1 leto, 1–20 let, 21–30 let, 31–40 let, 41–60 let, 61–80 in > 80 let. Okužbe krvi z vrstami rodu *Candida* glede na starostno strukturo bolnikov prikazujeta slika 2 in tabela 3. Kot je razvidno iz omenjene slike in tabele, smo največ okužb krvi zabeležili v starostni skupini 61–80 let, in sicer pri 280 bolnikih (50,3 %).

V obdobju 1. 1. 2013–31. 12. 2017 smo pri 557 bolnikih osamili 575 izolatov (v številu smo upoštevali primoizolate: en izolat



Slika 1. Incidenčna stopnja okužb krvi z vrstami iz rodu *Candida* (število bolnikov/100.000 prebivalcev) in delež bolnikov po spolu.



Slika 2. Število bolnikov glede na starostno skupino in delež bolnikov glede na spol v posamezni starostni skupini.

Tabela 3. Število in delež bolnikov glede na starost.

Starostna skupina (leta)	Število bolnikov	Delež bolnikov v starostni skupini (%)
< 1	15	2,7
1–20	6	1,1
21–40	42	7,5
41–60	111	19,9
61–80	280	50,3
> 81	103	18,5
Skupaj	557	100

Tabela 4. Število in delež (%) posamičnih vrst gliv kvasovk, ki smo jih v obdobju 1. 1. 2013–31. 12. 2017 osamili iz krvi bolnikov (primoizolati).

Vrsta	Število	Delež (%)
<i>Candida albicans</i>	297	51,7
<i>Candida glabrata</i>	159	27,7
<i>Candida parapsilosis</i>	38	6,6
<i>Issatchenkia orientalis</i> (<i>Candida krusei</i>)	21	3,7
<i>Candida tropicalis</i>	18	3,1
<i>Candida lusitanae</i>	12	2,1
<i>Candida dubliniensis</i>	9	1,6
<i>Candida fabianii</i>	4	0,7
<i>Candida kefyr</i>	4	0,7
<i>Candida guilliermondii</i>	3	0,5
<i>Candida orthopsilosis</i>	2	0,4
<i>Candida blankii</i>	1	0,2
<i>Candida inconspicua</i>	1	0,2
<i>Candida sake</i>	1	0,2
<i>Candida</i> spp.	5	0,9
Skupaj	575	100

ene vrste kandidate pri bolniku v koledarskem letu), kot je prikazano na tabeli 4 in sliki 3. Med izolati je prevladovala *C. albicans* (51,7%), sledila ji je *C. glabrata* (27,7%), nato *C. parapsilosis* (6,6%), *I. orientalis* (*C. krusei*) (3,7%) in *C. tropicalis* (3,1%). Delež najpogosteje osamljenih vrst skozi opazovano obdobje prikazuje tabela 5.

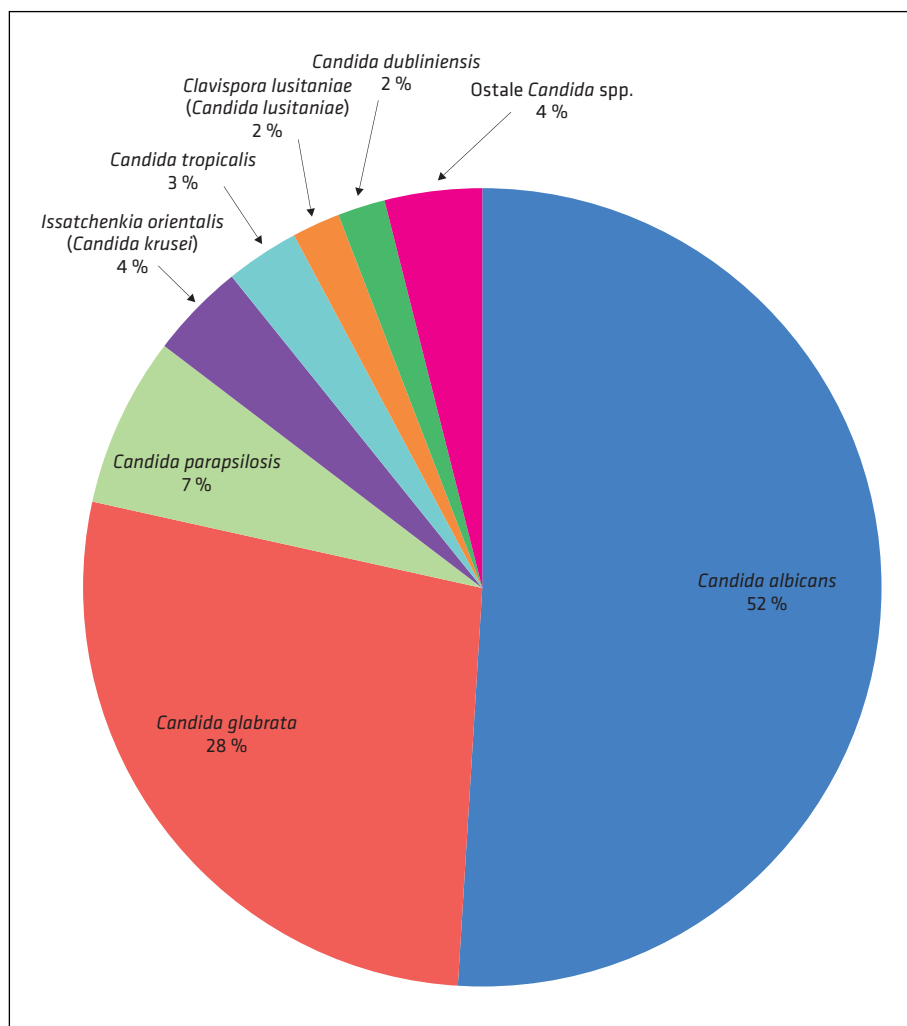
Občutljivost izolatov iz hemokultur smo z gradientno difuzijsko metodo testirali za

šest protiglivnih zdravil: amfotericin B, kas-pofungin, flukonazol, vorikonazol, anidula-fungin in mikafungin.

Rezultate testiranja občutljivosti in vrednosti MIK_{50} (koncentracija protiglivnega zdravila, pri kateri pride do inhibicije rasti pri polovici testiranih izolatov) in MIK_{90} (koncentracija protiglivnega zdravila, pri kateri pride do inhibicije rasti pri 90 % testiranih izolatov) za osamljene seve petih

Tabela 5. Delež petih najpogosteje osamljenih vrst *Candida* spp. glede na leto osamitve (% od vseh primozolatov).

Leto osamitve	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida glabrata</i>	<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Issatchenkia orientalis</i> (<i>Candida krusei</i>)	<i>Candida tropicalis</i>
2013	56,0	31,9	2,2	2,2	1,1
2014	49,4	26,4	6,9	1,2	5,8
2015	54,8	23,8	6,4	4,0	4,8
2016	50,4	24,8	8,0	4,8	2,4
2017	48,6	31,5	8,2	4,8	2,1



Slika 3. Delež (%) posamičnih vrst rodu *Candida* spp., ki smo jih osamili iz krvi bolnikov v obdobju 1. 1. 2013–31. 12. 2017.

najpogosteje osamljenih vrst *Candida* (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *I. orientalis* (*C. krusei*) in *C. tropicalis*), ki smo jih osamili iz kultur krvi, prikazuje tabela 6.

RAZPRAVA

Incidenčna stopnja okužb krvi z glivami iz rodu *Candida* je bila izračunana za vsako leto opazovanega obdobja in je prikazana na sliki 1. Leta 2013 je znašala 4,23/100.000 prebivalcev in je znotraj opazovanega obdobja počasi naraščala do leta 2017, ko je znašala 7,02/100.000 prebivalcev. V analiziranem obdobju se je število bolnikov s kandidemijo v Sloveniji povečalo za 1,6-krat. Naraščanje števila bolnikov s kandidemijo je splošno poznan pojav tudi drugod po Evropi in svetu (4, 6, 13). Dostopne podatke o incidenci je težko primerjati, saj ni jasno postavljenih meril za imenovalce. V te namene pogosto uporabljajo število ležalnih dni, odpustov, sprejemov, redko pa prebivalcev. Dokaj pogoste so raziskave, ki prikazujejo incidence za posamezne bolnišnice ali oddelke v bolnišnicah, kjer so zbrani bolniki z različnimi skupinami dejavnikov tveganja za razvoj kandidemije. Take raziskave so medsebojno težko primerljive. Raziskav, ki bi ugotovljale incidenco na nivoju držav, ni veliko, znani so podatki zlasti za ZDA in nekatere evropske države (14). V ZDA tako navajajo incidenčno stopnjo v območju 3,65–26,2/100.000 prebivalcev, medtem ko je v Evropi incidenca običajno nižja, vendar ne povsod (14–16). Zlasti nizko incidenco opisujejo v severnih državah Evrope, npr. na Norveškem 1,4–3,9/100.000 prebivalcev, na Švedskem 4,2/100.000 prebivalcev, v Franciji 2,5/100.000 prebivalcev (4, 7, 17–19). Med evropskimi državami je izjema Danska z visoko incidenco 8,6–9,4/100.000 prebivalcev (6, 7, 20, 21). Visoko incidenco kandidemij navajajo tudi v Španiji, ta je bila leta 2011 8,1/100.000 (7). Če upoštevamo časovno umeščenost podatkov, ugotovljamo, da je incidenca okužb krvi z glivami iz

rodu *Candida* v Sloveniji podobna kot drugod v Evropi (leta 2013 oz. 2014 je znašala 4,23 oz. 4,12/100.000 prebivalcev). V splošnem menijo, da je incidenca kandidemije podcenjena, ker so gojitvene metode za dokazovanje okužb krvi dokaj slabo občutljive. Kandidemija naj bi bila potrjena le v približno 50 % primerov invazivnih okužb, povzročenih s kandidami (7, 18). Menijo, da se nižje incidenčne stopnje kandidemije pojavljajo tam, kjer imajo strog režim preventivnega predpisovanja protiglivičnih zdravil in kjer se tudi ostala protimikrobna zdravila predpisujejo strogo po indikacijah (18).

Med osamljenimi kandidami prevladuje *C. albicans* z 51,7 % (tabela 4). Kot prevladujočo vrsto med osamljenimi vrstami *Candida* spp. jo opisujejo tudi drugod po svetu, navajajo delež 38–70 %. V zadnjem desetletju opažajo, da se delež *C. albicans* zmanjšuje, medtem ko deleži drugih vrst naraščajo. V Evropi, ZDA in Kanadi je na drugem mestu *C. glabrata*, na tretjem pa *C. parapsilosis*. Slednja se kot drugi najpogostejši povzročitelj pojavlja v Južni Ameriki, Afriki in ponekod v Aziji, vendar je v Aziji v posameznih državah druga najpogostejša vrsta *C. tropicalis* (7, 22).

Delež *C. glabrata* med našimi izolati je skozi celotno opazovano obdobje znašal v povprečju 27,6 % (tabela 5) in ostajal sorazmerno stabilen (31,9 % leta 2013 in 31,5 % leta 2017). Tudi v ZDA in Evropi je *C. glabrata* druga najpogostejša med povzročitelji kandidemij, pripisujejo ji 13–29 % med kandidami, ki povzročajo okužbe krvi (7, 23, 24). Pogosteje jo opisujejo v povezavi s kandidemijo pri starejših bolnikih in bolnikih s karcinomi (25, 26).

Ostale vrste kandid so zastopane v nižjem deležu. Med tistimi, ki smo jih osamili pogosteje, je na tretjem mestu *C. parapsilosis*, ki je udeležena z 38 izolati (6,6 %), sledita ji *I. orientalis* (*C. krusei*) z 21 (3,7 %) in *C. tropicalis* z 18 izolati (3,1 %). Nizke deleže teh vrst opisujejo tudi v drugih evropskih

Tabela 6. Rezultati testiranja občutljivosti osamljenih sevov petih najpogostejše osamljenih vrst *Candida* spp. za protiglivna zdravila. S – občutljiv (angl. *susceptible*), MIK – minimalna inhibitorna koncentracija (MIK), MIK_{50} – koncentracija protiglivnega zdravila, pri kateri pride do inhibicije rasti pri polovici testiranih izolatov, MIK_{90} – koncentracija protiglivnega zdravila, pri kateri pride do inhibicije rasti pri 90 % testiranih izolatov, S-DD – občutljiv z višjimi odmerki protiglivnega zdravila, I – srednje odporen (angl. *intermediate*), R – odporen (angl. *resistant*).

Osmajlena vrsta <i>Candida</i> spp.	Protiglavno zdravilo	Število testiranih	% S	MIK_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	MIK_{90} ($\mu\text{g/ml}$)	Območje MIK ($\mu\text{g/ml}$)	S	S-DD	I	R
<i>Candida albicans</i>	amfotericin B	250	100	0,25	0,5	0,004–1,0	250	0	0	0
	kaspofungin	186	96,2	0,125	0,25	0,004–0,5	179	0	7	0
	flukonazol	260	98,9	0,25	0,5	0,008–64	257	0	0	3
	vorikonazol	244	98,4	0,008	0,016	0,002–1	240	3	0	1
	anidulafungin	111	100	0,002	0,008	0,002–0,032	111	0	0	0
	mikafungin	63	100	0,008	0,016	0,004–0,064	63	0	0	0
<i>Candida glabrata</i>	amfotericin B	131	92,4	0,5	1	0,064–4	121	0	0	10
	kaspofungin	90	81,1	0,25	0,5	0,002–0,5	12	61	0	17
	flukonazol	142	73,9	S-DD	32	0,32–256	-	105	0	37
	vorikonazol	103	/	1	4	0,002–32	ni interpretativnih meril			
	anidulafungin	63	96,8	0,008	0,016	0,002–0,25	61	2	0	0
	mikafungin	36	97,2	0,016	0,016	0,008–0,125	35	1	0	0
<i>Issatchenkia orientalis</i> (<i>Candida krusei</i>)	amfotericin B	19	84,2	0,5	2	0,125–4	16	0	0	0
	kaspofungin	11	18,2	0,5	1	0,125–1	2	4	0	5
	vorikonazol	19	79,0	0,25	1	0,032–2	15	3	0	1
	anidulafungin	10	100	0,032	0,064	0,008–0,064	10	0	0	0
<i>Candida parapsilosis</i>	amfotericin B	33	93,9	0,5	1	0,016–2	31	0	0	2
	kaspofungin	18	77,8	2	4	0,25–32	14	0	2	2
	flukonazol	33	93,9	0,5	2	0,125–6	31	0	1	1
	vorikonazol	33	100	0,016	0,064	0,002–0,125	33	0	0	0
	anidulafungin	17	70,6	2	4	0,5–8	12	0	4	1
mikafungin	16	93,8	1	2	0,5–4	15	0	1	0	
<i>Candida tropicalis</i>	amfotericin B	14	92,9	0,5	1	0,032–2	13	0	0	0
	kaspofungin	10	100	0,25	0,25	0,064–0,25	10	0	0	0
	flukonazol	15	86,7	1	2	0,25–64	13	1	0	1
	vorikonazol	13	84,6	0,064	0,25	0,016–2	11	1	0	1

državah (6). Pri vseh treh vrstah sicer opazamo naraščanje skozi celotno opazovano obdobje, vendar gre le za majhno število izolatov (tabela 5).

Iz naših podatkov je razvidno, da na incidenco kandidemij vplivajo tako starost kot tudi spol bolnikov. Največje število bolnikov se je uvrstilo v starostno skupino 61–80 let, takih je 280 bolnikov (50,3 %). Hkrati ugotavljamo, da sta kar več kot dve tretjini (68,8 %) bolnikov uvrščeni v starostni skupini > 60 let (slika 2 in tabela 3). V vseh starostnih skupinah prevladujejo moški (63,0 %) (slika 2). Podobna razmerja opisujejo tudi drugod. Avtorji ugotavljajo, da je incidenca kandidemij povezana s skrajnimi obdobji življenja in je najvišja pri zelo mladi in starejši populaciji. V teh skupinah so tudi v večjem številu prisotni dejavniki tveganja za kandidemijo (1, 3, 6, 7).

Pri 14 bolnikih (2,5 %) smo zaznali mešane glivne okužbe. Največkrat je bila v kombinacijah prisotna *C. glabrata*, dvakrat tudi v paru s *I. orientalis* (*C. krusei*). Podoben delež mešanih okužb opisujejo tudi pri danski raziskavi iz leta 2010/2011, kjer so večglivne okužbe krvi našli pri 2,9 % bolnikov (6). Sočasno s kandidemijo smo pri 103 bolnikih (18,5 %) zaznali sočasno bakteriemijo, ki se je pojavila pri 18,1 % epizod kandidemije (tabela 2). Podobne deleže (11–23 %) epizod sočasnih bakterijskih okužb s kandidemijo opisujejo tudi drugod (27, 28). Tako kot pri nas se kot najpogostejše sočasno osamljene bakterije pojavljajo koagulazno negativni stafilokoki (28). Med dejavniki, ki povečajo tveganje za sočasne bakterijske okužbe, navajajo intravenske kateetre, zdravljenje na oddelkih intenzivne terapije, kirurške posege v trebušni votlini, hujše osnovne bolezni in prisotnost hematoloških ali onkoloških obolenj (27, 29).

Različne sevi rodu *Candida* se razlikujejo v občutljivosti za protiglivična zdravila, zato je pomembno, da vse izolate identificiramo do nivoja vrste in poznamo spekter ter občutljivost najpogostejših povzročite-

ljev. Rezultate testiranja občutljivosti naših izolatov prikazuje tabela 6.

Ugotavljamo, da je iz hemokultur najpogostejše osamljena vrsta *C. albicans*, ki je visoko občutljiva za vsa testirana protiglivična zdravila in ima tudi najnižje MIK. To je v skladu s pričakovanji, saj so poročila o *C. albicans*, odporni proti protiglivičnim zdravilom, izredno redka (1, 30).

Pri *C. glabrata* ugotavljamo v primerjavi s *C. albicans* povišane MIK za vsa protiglivična zdravila. Za amfotericin B ugotavljamo, da ima 92,4 % izolatov MIK $\leq 1 \mu\text{g/ml}$, kar interpretiramo kot občutljivo za amfotericin B in predstavlja epidemiološko mejno vrednost za divji tip populacije. Izračunani MIK₉₀ je bil prav tako $1 \mu\text{g/ml}$. V desetih primerih je bil MIK $> 1 \mu\text{g/ml}$, in sicer deset sevov je imelo MIK $2 \mu\text{g/ml}$, en sev pa $4 \mu\text{g/ml}$. O sevih, odpornih na amfotericin B, poročajo običajno v povezavi s sevi, ki so večkratno odporni proti drugim protiglivičnim zdravilom (31). Tudi pri naših desetih sevih so bile povišane še MIK za kaspofungin in flukonazol. Vsi sevi *C. glabrata* so imeli v primerjavi s *C. albicans*, *C. parapsilosis* in *C. tropicalis* visoke MIK za flukonazol. MIK₉₀ je bil $128 \mu\text{g/ml}$, kar je nad mejno vrednostjo za odporne izolate, medtem ko je bil MIK₅₀ $32 \mu\text{g/ml}$, kar je mejna vrednost za seve, ki so občutljivi, vendar le ob višjih odmerkih protiglivičnega zdravila. Rezultati naših testiranj občutljivosti *C. glabrata* za flukonazol so skladni s podatki, da je ta vrsta že po naravi zmanjšano občutljiva za flukonazol, lahko pa proti njemu razvije tudi odpornost (32).

Pri testiranju občutljivosti *C. glabrata* za anidulafungin in mikafungin ugotavljamo, da so sevi visoko občutljivi za ehinokandine (96,8 in 97,2 %). Ob tem nekoliko odstopajo rezultati testiranja občutljivosti za kaspofungin, ki kažejo nižjo stopnjo občutljivosti in višje MIK. Praviloma je *C. glabrata* dobro občutljiva za ehinokandine, vendar ugotavljajo, da se pri testiranju občutljivosti za kaspofungin pojavlja variabilnost, ki

je najbolj izražena, kadar testiramo občutljivost *C. glabrata* in *I. orientalis* (*C. krusei*) in zaradi katere lahko občutljive izolate napčno uvrstimo med odporne (33). Zato je priporočljivo pri testiranju občutljivosti za ehinokandine testirati mikafungin in/ali anidulafungin (34).

Pri *C. parapsilosis* smo občutljivost testirali na 33 izolatih. Ugotavljamo visoko občutljivost in nizke MIK za amfotericin B, flukonazol in vorikonazol, medtem ko je občutljivost nižja pri testiranju ehinokandinov. V zvezi s tem poročajo, da ima *C. parapsilosis* že prirojeno višje MIK za ehinokandine, vendar klinični pomen tega ni jasen (1).

I. orientalis (*C. krusei*) in *C. tropicalis* sta med testiranimi sevi zastopani v zelo majhnem številu (19 oz. 14 sevov). Pri *I. orientalis* (*C. krusei*) najdemo tri seve ($n = 3/19$; 15,8%), ki so odporni proti amfotericinu B, je pa večina sevov visoko občutljiva za ehinokandine. MIK zanje so višje kot pri drugih testiranih sevih *Candida* spp., razen *C. parapsilosis*. Za *C. tropicalis* smo testirali občutljivost 10–15 sevov za amfotericin B, kaspofungin, flukonazol in vorikonazol. Večina sevov je bila za testirana protiglivna zdravila občutljiva.

Kadar poznamo vrsto kandidate, je njena odpornost relativno dobro predvidljiva. Večina sevov *Candida* spp. je občutljiva za amfotericin B in za ehinokandine. Pri *C. glabrata* se pojavlja odpornost zlasti proti flukonazolu in drugim triazolnim protiglivnim zdravilom (35). Opisana je tudi odpornost *Candida* spp. proti ehinokandinom, ki je najpogostejša pri vrsti *C. glabrata* in se običajno pojavi ob zdravljenju z ehinokandini. V nekaterih ustanovah beležijo že okoli 10% odpornosti proti ehinokandinom (36). Tudi v naši raziskavi smo pri posameznih izolatih ugotovili povišane vrednosti MIK, ki bi jih bilo treba še natančneje molekularno opredeliti. Občasno odpornost proti triazolom in drugim protiglivnim zdravilom beležimo tudi pri drugih vrstah rodu *Candida*, zato se v splošnem priporoča te-

stiranje na protiglivna zdravila (37, 38). Najnovejše evropske smernice Evropske konference za infekcije in levkemijo (European Conference on Infections in Leukaemia, ECIL) za zdravljenje invazivne kandidemije priporočajo kot zdravilo izbora enega izmed ehinokandinov, ki ga po petih dneh lahko zamenja flukonazol ali vorikonazol, če je izolat *in vitro* občutljiv za azole in bolnik ni več življenjsko ogrožen. Omenjena azola se lahko pri splošni populaciji uporabljata tudi kot zdravilo izbora, vendar le v primeru, če bolnik ni močno prizadet in če predhodno ni bil izpostavljen azolom. Velja tudi, da je izjemno pomemben terapevtski ukrep menjava oz. odstranitev osrednjega žilnega katetra, če pa to ni mogoče, kot zdravilo izbora priporočajo ehinokandine ali liposomalni amfotericin B, ki so v biofilmih učinkovitejši od azolov (39).

ZAKLJUČEK

Pričujoča raziskava zajema kandidemije v Sloveniji skozi petletno časovno obdobje (2013–2017) in podaja incidenco kandidemij kot število bolnikov na 100.000 prebivalcev. Podatki o incidenci so pričakovano skladni z znanimi podatki iz večine drugih evropskih držav. Prav tako ne izstopamo glede starostne porazdelitve in spektra povzročiteljev kandidemij. Tudi povečanje števila kandidemij nas ne preseneča, saj se vzporedno z izboljšanim zdravljenjem in nego viša tudi število bolnikov s poznanimi dejavniki tveganja.

Glede občutljivosti ugotavljamo, da je ta skoraj popolnoma predvidljiva že iz opredelitve vrste samo pri *C. albicans*, ki je tudi visoko občutljiva za vsa testirana protiglivna zdravila. Podobno kot drugod ugotavljamo dokaj visok delež *Candida* spp., ki imajo že po naravi višje MIK za protiglivna zdravila, so proti njim odporne oz. imajo sposobnost razvoja odpornosti. Zato in zaradi smotrne rabe protiglivnih zdravil je testiranje občutljivosti potrebno. Za zanesljivost testiranja in primerljivost podat-

kov na državni ravni je pomembno, da se postopki testiranja izvajajo v skladu z dogovorjenimi standardi. Tudi na tem mestu ni odveč poudariti pomena sodelovanja kliničnih mikrobiologov z drugimi medicin-

skimi strokami, saj je testiranje odpornosti vodilo za zdravljenje, kumulativni podatki o odpornosti pa osnova za profilaktične smernice.

LITERATURA

1. McCarty TP, Pappas PG. Invasive Candidiasis. *Infect Dis Clin North Am* 2016; 30 (1): 103–24.
2. Blumberg HM, Jarvis WR, Soucie JM, et al. Risk factors for candidal bloodstream infections in surgical intensive care unit patients: the NEMIS prospective multicenter study. *The National Epidemiology of Mycosis Survey. Clin Infect Dis.* 2001; 33 (2): 177–86.
3. Lortholary O, Renaudat C, Sitbon K, et al. Worrysome trends in incidence and mortality of candidemia in intensive care units (Paris area, 2002–2010). *Intensive Care Med.* 2014; 40 (9): 1303–12.
4. Bitar D, Lortholary O, Le Strat Y, et al. Population-based analysis of invasive fungal infections, France, 2001–2010. *Emerg Infect Dis.* 2014; 20 (7): 1149–55.
5. Arendrup MC, Patterson TF. Multidrug-Resistant *Candida*: Epidemiology, Molecular Mechanisms, and Treatment. *J Infect Dis.* 2017; 216 (3): S445–S51.
6. Arendrup MC, Dzajic E, Jensen RH, et al. Epidemiological changes with potential implication for antifungal prescription recommendations for fungaemia: data from a nationwide fungaemia surveillance programme. *Clin Microbiol Infect.* 2013; 19 (8): E343–53.
7. Lamoth F, Lockhart SR, Berkow EL, et al. Changes in the epidemiological landscape of invasive candidiasis. *J Antimicrob Chemother.* 2018; 73 (1): i4–i13.
8. Lortholary O, Desnos-Ollivier M, Sitbon K, et al. Recent exposure to caspofungin or fluconazole influences the epidemiology of candidemia: a prospective multicenter study involving 2,441 patients. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011; 55(2): 532–8.
9. Forrest GN, Weekes E, Johnson JK. Increasing incidence of *Candida parapsilosis* candidemia with caspofungin usage. *J Infect.* 2008; 56 (2): 126–9.
10. Podatkovni portal SI-STAT [internet]. Ljubljana: Statistični urad Republike Slovenije [citirano 2018 May 1]. Dosegljivo na: http://pxweb.stat.si/pxweb/Dialog/varval.asp?ma=05A10025&ti=&path=../Database/Dem_soc/05_prebivalstvo/05_osnovni_podatki_preb/05_05A10_prebivalstvo_cetr/&lang=2
11. CLSI. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. 4th ed. CLSI standard. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2017.
12. Pfaller MA, Espinel-Ingroff A, Canton E, et al. Wild-type MIC distributions and epidemiological cutoff values for amphotericin B, flucytosine, and itraconazole and *Candida* spp. as determined by CLSI broth microdilution. *J Clin Microbiol.* 2012; 50 (6): 2040–6.
13. Puig-Asensio M, Padilla B, Garnacho-Montero J, et al. Epidemiology and predictive factors for early and late mortality in *Candida* bloodstream infections: a population-based surveillance in Spain. *Clin Microbiol Infect.* 2014; 20 (4): 0245–54.
14. Yapar N. Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis. *Ther Clin Risk Manag.* 2014; 10: 95–105.
15. Zilberberg MD, Shorr AF, Kollef MH. Secular trends in candidemia-related hospitalization in the United States, 2000–2005. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2008; 29 (10): 978–80.
16. Cleveland AA, Farley MM, Harrison LH, et al. Changes in incidence and antifungal drug resistance in candidemia: Results from population-based laboratory surveillance in Atlanta and Baltimore, 2008–2011. *Clin Infect Dis.* 2012; 55 (10): 1352–61.

17. Hesstvedt L, Gaustad P, Andersen CT, et al. Twenty-two years of candidaemia surveillance: results from a Norwegian national study. *Clin Microbiol Infect.* 2015; 21 (10): 938–945.
18. Nordoy I, Hesstvedt L, Torp Andersen C, et al. An estimate of the burden of fungal disease in Norway. *J Fungi (Basel)* 2018; 4 (1).
19. Ericsson J, Chryssanthou E, Klingspor L, et al. Candidaemia in Sweden: a nationwide prospective observational survey. *Clin Microbiol Infect Dis.* 2013; 19 (4): E218–E221.
20. Berdal JE, Haagensen R, Ranheim T, et al. Nosocomial candidemia; risk factors and prognosis revisited; 11 years experience from a Norwegian secondary hospital. *PLoS One* 2014; 9 (7): e103916.
21. Arendrup MC, Bruun B, Christensen JJ, et al. National surveillance of fungemia in Denmark (2004 to 2009) *J Clin Microbiol.* 2011; 49 (1): 325–34.
22. Guinea J. Global trends in the distribution of *Candida* species causing candidemia. *Clin Microbiol Infect.* 2014; 20 (6): 5–10.
23. Antinori S, Milazzo L, Sollima S, et al. Candidemia and invasive candidiasis in adults: A narrative review. *European Journal of Internal Medicine.* 2016; 34: 21–8.
24. Puig-Asensio M, Fernandez-Ruiz M, Aguado JM, et al. Propensity score analysis of the role of initial antifungal therapy in the outcome of candida glabrata bloodstream infections. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016; 60 (6): 3291–300.
25. Milazzo L, Peri AM, Mazzali C, et al. Candidaemia observed at a University hospital in Milan (northern Italy) and review of published studies from 2010 to 2014. *Mycopathologia.* 2014; 178 (3–4): 227–41.
26. Farmakiotis D, Tarrand JJ, Kontoyiannis DP. Drug-Resistant *Candida glabrata* Infection in Cancer Patients. *Emerg Infect Dis.* 2014; 20 (11): 1833–40.
27. Bouza E, Burillo A, Munoz P, et al. Mixed bloodstream infections involving bacteria and *Candida* spp. *J Antimicrob Chemother.* 2013; 68 (8): 1881–8.
28. Kim SH, Yoon YK, Kim MJ, et al. Risk factors for and clinical implications of mixed *Candida*/bacterial bloodstream infections. *Clin Microbiol Infect.* 2013; 19 (1): 62–68.
29. Bassetti M, Righi E, Ansaldo F, et al. A multicenter multinational study of abdominal candidiasis: epidemiology, outcomes and predictors of mortality. *Intensive Care Med.* 2015; 41 (9): 1601–10.
30. Pfaller MA, Diekema DJ, Sheehan DJ. Interpretive breakpoints for fluconazole and *Candida* revisited: a blueprint for the future of antifungal susceptibility testing. *Clin Microbiol Rev.* 2006; 19 (2): 435–47.
31. Nagayoshi Y, Miyazaki T, Shimamura S, et al. Unexpected effects of azole transporter inhibitors on antifungal susceptibility in *Candida glabrata* and other pathogenic *Candida* species. *PLoS ONE.* 2017; 12 (7): e0180990.
32. Ruan SY, Chu CC, Hsueh PR. In vitro susceptibilities of invasive isolates of *Candida* species: rapid increase in rates of fluconazole susceptible-dose dependent *Candida glabrata* isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008; 52 (8): 2919–22.
33. Albataineh MT, Sutton DA, Fothergill AW, et al. Update from the laboratory: clinical identification and susceptibility testing of fungi and trends in antifungal resistance. *Infect Dis Clin North Am.* 2016; 30 (1): 13–35.
33. Arendrup MC, Cuenca-Estrella M, Lass-Flörl C, et al. EUCAST technical note on the EUCAST definitive document EDef 7.2: method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts EDef 7.2 (EUCAST-AFST). *Clin Microbiol Infect.* 2012; 18 (7): E246–7.
34. Pfaller MA, Castanheira M, Lockhart SR, et al. Frequency of decreased susceptibility and resistance to echinocandins among fluconazole-resistant bloodstream isolates of *Candida glabrata*. *J Clin Microbiol.* 2012; 50 (4): 1199–203.
35. Arendrup MC, Perlin DS. Echinocandin resistance: an emerging clinical problem? *Curr Opin Infect Dis.* 2014; 27 (6): 484–92.
36. Ben-Ami R, Olshtain-Pops K, Krieger M, et al. Antibiotic exposure as a risk factor for fluconazole-resistant *Candida* bloodstream infection. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012; 56 (5): 2518–23.
37. Oxman DA, Chow JK, Frenkel G, et al. Candidaemia associated with decreased in vitro fluconazole susceptibility: is *Candida* speciation predictive of the susceptibility pattern? *J Antimicrob Chemother.* 2010; 65 (7): 1460–5.
38. Tissot F, Agrawal S, Pagano L, et al. ECIL-6 guidelines for the treatment of invasive candidiasis, aspergillosis and mucormycosis in leukemia and hematopoietic stem cell transplant patients. *Haematologica.* 2017; 102 (3): 433–44.

Rok Tomazin¹, Tadeja Matos²

Kriptokokne okužbe v Sloveniji: značilnosti povzročiteljev

Cryptococcal Infections in Slovenia: Characteristics of Isolates

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: kriptokokoza, *Cryptococcus neoformans* sensu lato, genotipizacija, testiranje občutljivosti

Kriptokokoze spadajo med najpogostejše in najpomembnejše glivne okužbe, ki prizadejejo večinoma imunsko oslabele bolnike. V Sloveniji nosijo največje tveganje za okužbo predvsem bolniki, okuženi s HIV, in bolniki po presaditvi ledvic. Kriptokoza pri nas velja za redko okužbo, saj na leto v povprečju obravnavamo 1,25 bolnika. Med povzročitelji prevladuje *Cryptococcus deneoformans*, ki je odgovoren za slabe tri četrtine kriptokokoz. Okužb povzročenih s *Cryptococcus gattii* sensu lato, v Sloveniji za zdaj še nismo zabeležili. Skoraj vsi (93,5 %) testirani kriptokoki pripadajo paritvenemu tipu α , ki je povezan z bolj izrazitim nevrotropizmom in večjo virulenco.

ABSTRACT

KEY WORDS: cryptococcosis, *Cryptococcus neoformans* sensu lato, molecular typing, antifungal susceptibility testing

Cryptococcoses are classified as one of the most important and frequent fungal infections that affect mostly immunocompromised patients. In Slovenia, patients at the highest risk for infection are those with HIV/aids and kidney transplants. Cryptococcosis is considered to be a rare infection in Slovenia as only 1.25 patients are treated per year. About three quarters of infections are caused by *Cryptococcus deneoformans*, and none by the *Cryptococcus gattii* species complex. Almost all (93.5%) isolates belong to mating type α , which is associated with neural invasion and higher virulence.

¹ Asist. Rok Tomazin, univ. dipl. mikrobiol., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana; rok.tomazin@mf.uni-lj.si

² Doc. dr. Tadeja Matos, dr. med., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana

UVOD

Kriptokokoza sta prvič opisala zdravnik Otto Busse in Abraham Buschke leta 1894 pri bolnici s kroničnimi granulomi golenice, vendar bolezen ni bila deležna večje pozornosti vse do pojava pandemije HIV v 80. letih prejšnjega stoletja. V zadnjih štirih desetletjih je kriptokokoza tako postala prepoznana kot ena najpomembnejših oportunističnih okužb, ki se pojavljajo pri bolnikih z okvarjeno oz. oslabiljeno celično posredovano imunostjo (1).

Vsako leto za kriptokokoza zbolijo približno 1.000.000 ljudi, podleže pa ji več kot 600.000 okuženih (2, 3). Večanje pojavnosti kriptokokoze je povezano z višjim številom bolnikov, okuženih s HIV, bolnikov po presaditvi čvrstih organov ali krvotvornih matičnih celic ter z večanjem pojavnosti hematookoloških bolezni in različnih stanj imunske pomanjkljivosti (4). Najbolj ogrožena skupina bolnikov so bili okuženi s HIV, vendar je incidenca v tej populaciji padla po uvedbi visoko učinkovitega protiretrovirusnega zdravljenja. Še vedno pa kriptokokoza ostaja agresivno potekajoča okužba, povezana z visoko smrtnostjo pri drugih imunsko oslabljenih bolnikih, še posebej v primeru vnetnega sindroma imunske rekonstitucije, ki zahteva kompleksno individualizirano obravnavo (3, 4).

Kriptokokoza povzročajo vrste iz rodu *Cryptococcus*, ki lahko okužijo različne organe, običajno osrednje živčevje, spodnja dihalna ali oboje (4). Večino okužb povzročajo vrste iz kompleksov *Cryptococcus neoformans* (*C. neoformans* sensu lato) in *Cryptococcus gattii* (*C. gattii* sensu lato); v prvem primeru so prizadeti predvsem imunsko oslabljeni bolniki, v drugem pa tudi osebe z normalno delujočim imunskim sistemom (4, 5). S kriptokoki se najverjetneje okužimo preko vdihavanja bazidiospor in izsušenih kvasovk, ki so dovolj majhne (1,5–3,5 µm), da vstopijo v alveolarni prostor (6). Pri imunsko kompetentnih osebah alveolarni makrofagi kriptokoke uspešno odstranijo, pri

imunsko oslabilih pa okužba napreduje. Kriptokoki se v pljučih namnožijo, razširijo preko krvi in prehajajo preko krvno-možganske pregrade. V možganih se prilagodijo na suboptimalne koncentracije kisika in hranil ter z razmnoževanjem povzročijo vnetje možganskih ovojnic in možganovine (6). Gledano splošno, povzročča *C. neoformans* sensu lato približno 80 % okužb, *C. gattii* sensu lato pa manj kot 20 %. Najpogostejša klinična izraženost je meningoencefalitis, v primeru okužbe s *C. gattii* sensu lato so pogosteje prizadeta še pljuča (4, 6).

Diagnostika in zdravljenje kriptokokoze sta zahtevna procesa, ki zahtevata sodelovanje klinikov in mikrobiologov. Najenostavnejša mikrobiološka diagnostika se opira na native preparate, kjer se vzorce možgansko-hrbtenjačne tekočine obarva z indijskim črnilom. Omenjena preiskava je enostavna, cenovno ugodna, z zadovoljivo občutljivostjo (do 86 %), vendar samo v primeru akutne, zgodnje faze meningoencefalitisa, pred uvedbo protiglivičnega zdravljenja (5). Diagnostični zlati standard predstavljajo gojitvene metode in histopatološki pregledi prizadetih tkiv. Največja pomanjkljivost gojitve na mikoloških gojiščih je dolgotrajnost metode (3–14 dni) in velika verjetnost lažno negativnih rezultatov v primerih nizkega kriptokoknega bremena ali majhne količine poslane kužnine. Glavne prednosti klasične medicinske mikologije so visoka specifičnost in zmožnost opredelitve značilnosti glivnih izolatov ter možnost spremljanja učinkovitosti zdravljenja (4, 5). V zadnjih letih si diagnostike kriptokoknega meningoencefalitisa in razsejane okužbe ne moremo predstavljati brez odkrivanja kriptokoknega antigena v možgansko-hrbtenjačni tekočini in krvi. Ta test odlikujeta visoka specifičnost in občutljivost, ki se gibljeta okrog 99 % (4, 5).

Protiglivično zdravljenje kriptokokoze je zapleteno in prilagojeno posamezniku glede na njegove značilnosti in osnovne bolezni. Skup-

ne točke vsem oblikam protiglavnega zdravljenja so začetno zdravljenje s fungicidnimi zdravili, kot sta amfotericin B in 5-fluorocitozin, ki mu sledi supresivno zdravljenje s flukonazolom in običajno traja več mesecev. Za uspešno zdravljenje je pomembno še zgodnje odkrivanje in zdravljenje povišanega znotrajlobanjskega tlaka in vnetnega sindroma imunske rekonstitucije (3).

ROD *CRYPTOCOCCUS*

Rod *Cryptococcus* je medicinsko eden najzanimivejših in najpomembnejših rodov znotraj debla *Basidiomycota*. Medicinsko najpomembnejšega predstavnika – *C. neoformans* – so prvič osamili iz breskovega soka leta 1894 in ga poimenovali *Saccharomyces neoformans*, istega leta so tudi opisali prvi primer kriptokokoze (1, 6). Omenjeni sev je bil nefermentativen in ni tvoril za saharomicete značilnih askospor, zato so ga sedem let kasneje razvrstili v nov rod *Cryptococcus* (6). Od takrat so med kriptokoke uvrstili več kot 35 vrst, med njimi tudi nekaj oportunistično patogenih. Poleg *C. neoformans*, sicer zelo redko, povzročajo okužbe še druge vrste, kot npr. *Cryptococcus laurentii*, *Cryptococcus curvatus*, *Cryptococcus albidus*, *Cryptococcus flavescens* in *Cryptococcus uniguttulatus* (7).

Z začetkom 21. stoletja je prišlo do prve korenite spremembe v taksonomiji kriptokokov – poleg vrste *C. neoformans* so priznali še vrsto *C. gattii*. Tako smo kot najpomembnejše patogene kriptokoke priznavali *C. neoformans* var. *neoformans* in *C. neoformans* var. *grubii* ter *C. gattii* (2, 6). Nadaljnja delitev je temeljila na serotipizaciji, ki je medicinsko pomembne kriptokoke razdelila v pet serotipov: *C. neoformans* v serotipe A, D in AD ter *C. gattii* v B in C (1, 6, 8). Taksonomija in sistematika nista nespremenljivi, ampak se prilagajata spremembam in potrebam, ki jih prinaša napredek bioloških znanosti. Sprva sta temeljili na fenotipskih lastnostih organizmov, ki pa žal ne odražajo evlucijske povezanosti. Sodob-

na sistematika posledično daje prednost filogenetskemu konceptu vrste, vendar ne zanemarja niti biološkega niti morfološkega koncepta (9). V zadnjih nekaj letih so filogenetske raziskave povzročile obsežno preazporeditev rodu *Cryptococcus*, tako da danes v njem najdemo devet vrst, večina prej omenjenih kriptokokov, ki jih redko srečamo kot patogene, je bila tako razporejena v nove rodove, npr. *Cryptococcus curvatus* je danes uradno *Cutaneotrichosporon curvatum* (10).

Največje pozornosti je bila deležna razdelitev *C. neoformans* v dve novi vrsti in *C. gattii* v pet novih vrst (11).

C. neoformans se je razdelil na (11):

- *C. neoformans* (prej *C. neoformans* var. *grubii*, serotip A) in
- *C. deneoformans* (prej *C. neoformans* var. *neoformans*, serotip D).

C. gattii se je razdelil na (11):

- *C. gattii*,
- *C. bacillisporus*,
- *C. deuterogattii*,
- *C. teragattii* in
- *C. decagattii*.

Med naštetimi vrstami poznamo tudi štiri hibride, ki ne ustrezajo biološkemu konceptu vrste (spolno razmnoževanje ni mogoče) (11):

- *C. neoformans* *C. deneoformans* (serotip AD),
- *C. deneoformans* *C. gattii*,
- *C. neoformans* *C. gattii* in
- *C. neoformans* *C. deuterogattii*.

Vrste *C. neoformans* sensu lato in *C. gattii* sensu lato naj bi se ločile pred približno 37 milijoni let, *C. neoformans* in *C. deneoformans* pa pred 18,5 milijona let (12). Poleg genetskih razlik so med novo opisanimi vrstami tudi ekološke, geografske in fenotipske razlike, kot npr. profili odpornosti, ki bodo v prihodnosti lahko vplivali na diagnozo, zdravljenje in napoved izida zdravljenja kriptokokoze (10).

KRIPTOKOKOZA V SLOVENIJI

Del podatkov smo povzeli po predhodnji raziskavi, ki je obravnavala vse primere osamitev glive *C. neoformans* sensu lato v razponu oktober 1998–april 2016 v Sloveniji (13). Podatke smo dopolnili z informacijami, ki smo jih zbrali do februarja 2018 in jih v celoti na novo analizirali.

V obdobju oktober 1998–februar 2018 smo v Sloveniji zabeležili 26 primerov kriptokokoze pri 25 bolnikih in skupno osamili 66 izolatov *C. neoformans* sensu lato, kar pomeni, da je v Sloveniji kriptokokozna redka bolezen, saj v povprečju obravnavamo zgolj 1,25 bolnika letno. Za zdaj še ni popolnoma razjasnjeno, ali je šlo pri vseh primerih osamitve kriptokoka za pravo okužbo ali zgolj za kolonizacijo. Incidenca se spreminja iz leta v leto, saj smo npr. v letu 1999 obravnavali le enega bolnika, v letu 2016 pa kar sedem. V dvajsetletnem obdobju smo imeli tri obdobja s povečanim številom bolnikov, ki so bila ločena s štiri-letnimi prekinitvami, v katerih ni bilo bolnikov s kriptokokozo (slika 1). Trend, ki bi

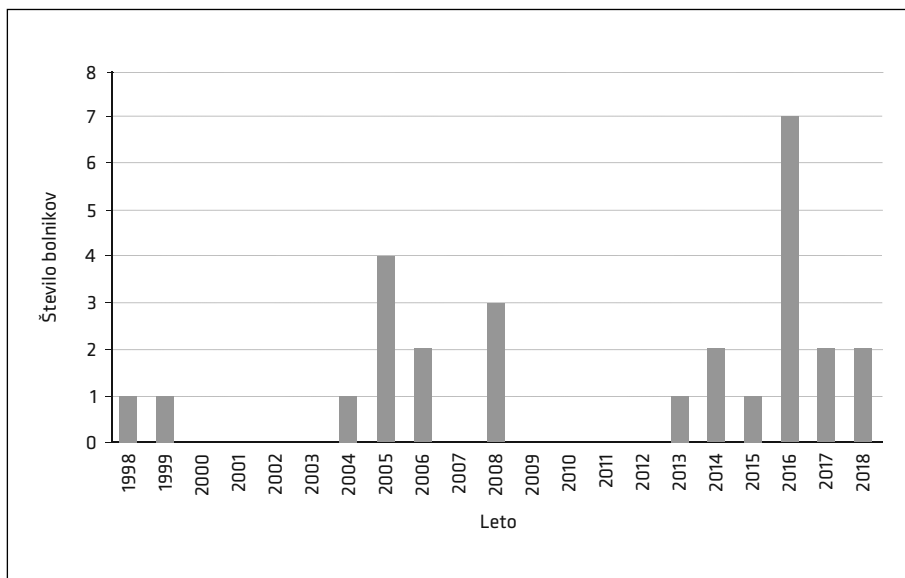
nakazoval na večanje pogostosti, kot so ga zabeležili v sosednji Italiji, pri nas ni tako izrazit (14). V zadnjih petih letih se je pogostost zvečala z 0,8 bolnika letno na 2,5 bolnika letno.

Starost bolnikov je bila 14–86 let s povprečno starostjo 44 let. Večino (68 %) bolnikov so predstavljali moški.

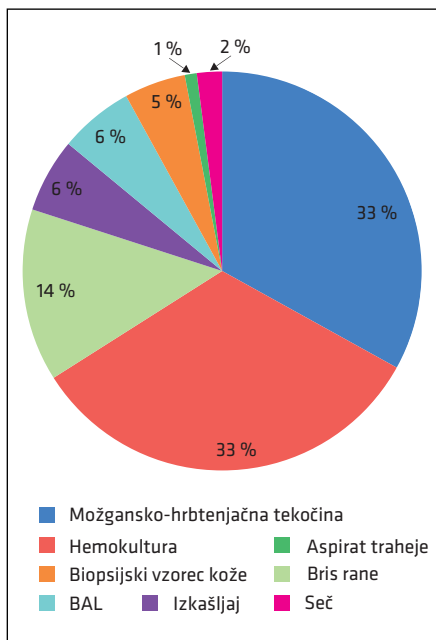
Kriptokoke smo večinoma osamili iz možgansko-hrbtnjenjačne tekočine ($n = 22$; 33,3 %) in hemokultur ($n = 22$; 33,3 %), sledili so brisi ran kože ($n = 9$; 16,6 %), izkašljaji ($n = 4$; 6,1 %) in bronhoalveolarni izpirki ($n = 4$; 6,1 %), biopsijski vzorci kože ($n = 3$; 4,5 %), aspirat traheje ($n = 1$; 1,5 %) in seč ($n = 1$; 1,5 %) (slika 2).

VRSTE RODU *CRYPTOCOCCUS* V SLOVENIJI

V časovnem razponu oktober 1998–februar 2018 smo v Sloveniji pri 25 bolnikih osamili 66 izolatov *C. neoformans* sensu lato. Vse izolate smo identificirali z metodo masne spektrometrije z ionizacijo v matriksu z desorpcijo z laserjem in masnim analiza-



Slika 1. Število bolnikov z osamljenimi kvasovkami *Cryptococcus neoformans* sensu lato v razponu oktober 1998–februar 2018.



Slika 2. Klinični vzorci, iz katerih smo osamili kvasovke *Cryptococcus neoformans* sensu lato v obdobju oktober 1998–februar 2018. BAL – bronhoalveolarni izpirek oz. lavaža.

torjem na čas preleta ionov (angl. *matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry*, MALDI-TOF MS) s predhodno etanol-formiatno ekstrakcijo po navodilu proizvajalca (Bruker Daltonik, Nemčija). Identifikacijo izolatov, osamljenih do aprila 2016, smo še molekularno potrdili (13). Izkazalo se je, da:

- 71,2 % (n = 47) vseh izolatov pripada vrsti *C. deneoformans*,
- 27,3 % (n = 18) pripada vrsti *C. neoformans* in
- 1,5 % (n = 1) hibridu vrst *C. neoformans* *C. deneoformans*.

Vrst iz kompleksa *C. gattii* v Sloveniji za zdaj še nismo osamili.

Iz različnih epidemioloških raziskav je znano, da je delež osamljenih vrst *C. deneoformans* in hibrida *C. neoformans* *C. deneoformans* višji v Sredozemlju kot v drugih delih Evrope (8, 15). V primerjavi s sosednjima

državama, Italijo in Hrvaško, ki nedvomno spadata v sredozemski prostor, imamo pri nas bistveno višji delež *C. deneoformans*. Ta predstavlja skoraj tri četrtine vseh izolatov, medtem ko sta v Italiji in na Hrvaškem vrsti *C. deneoformans* in *C. neoformans* zastopani enakovredno v razmerju 1 : 1 (15, 16).

Vrste iz kompleksa *C. neoformans* povezujemo z urbanim okoljem v povezavi s ptičjimi iztrebki. Raziskave so pokazale, da *C. neoformans* sensu lato najdemo tudi izven urbanih središč v povezavi s sredozemskim rastlinstvom, podobno kot *C. gattii* sensu lato. Našli so jih na rožičevcih (*Ceratonia* spp.), oljkah (*Olea* spp.) in borih (*Pinus* spp.) (8). V prihodnje bi bilo smiselno tudi na Slovenskem raziskati ekološko nišo *C. neoformans* sensu lato, ki je lahko povezana s submediteransko fitogeografsko regijo in potovanji ljudi drugod po Sredozemlju.

MOLEKULARNA KARAKTERIZACIJA IZOLATOV *CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS* SENSU LATO

Izolate *C. neoformans* sensu lato, osamljene v obdobju oktober 1998–april 2016, smo molekularno opredelili. Analizirali smo izolate *C. deneoformans* (n = 29, 63%), *C. neoformans* (n = 16; 34,8%) in *C. neoformans* *C. deneoformans* (n = 1; 2,2%).

Genotipe smo opredelili z metodo dolžinskega polimorfizma pomnoženih fragmentov (angl. *amplified fragment length polymorphism*, AFLP) z restriktijskima encimoma EcoR1 in MseI ter selektivnimi začetnimi oligonukleotidi EcoR1-AC (označen s fluoresceinom na 5'-koncu) in MseI-G ter s tipizacijo z mikrosateliti, ki vključuje analizo sedmih genetskih lokusov za *C. deneoformans* in devetih za *C. neoformans* (13). Rezultati genotipizacije so prikazani na sliki 3.

Genotipe *C. neoformans* sensu lato označujemo s kratico AFLP in arabsko številko (1–3) glede na profil AFLP in s kratico VN (angl. *variant neoformans*, VN) ter rimsko

številko (I–IV) ali črko B glede na tipizacijo z mikrosateliti.

Glede na profile AFLP delimo *C. neoformans* sensu lato v pet skupin, kot sta jih definirala Boekhout in Hagen (17, 18):

- *C. neoformans* vključuje tri skupine:
 - AFLP1,
 - AFLP1A/VNB in
 - AFLP1B.
- *C. deneoformans* vključuje eno skupino:
 - AFLP2.
- Hibrid *C. neoformans* *C. deneoformans* vključuje eno skupino:
 - AFLP3.

Poleg tipizacije AFLP se za ugotavljanje sorodnosti izolatov s podobnimi profili AFLP uporablja še tipizacija z mikrosateliti. Slednja razdeli *C. neoformans* sensu lato na štiri skupine, ki jih je definiral Meyer (19):

- *C. neoformans* vključuje dve skupini:
 - VNI in
 - VNII.
- *C. deneoformans* vključuje eno skupino:
 - VNIV.
- Hibrid *C. neoformans* x *C. deneoformans* vključuje eno skupino:
 - VNIII.

Upoštevač tipizacijo AFLP in tipizacijo z mikrosateliti danes *C. neoformans* sensu lato delimo v pet genotipov:

- *C. neoformans* vključuje tri genotipe:
 - AFLP1/VNI,
 - AFLP1A/VNB/VNII in
 - AFLP1B/VNII.
- *C. deneoformans* vključuje en genotip:
 - AFLP2/VNIV.
- Hibrid *C. neoformans* *C. deneoformans* vključuje en genotip:
 - AFLP3/VNIII.

Podobna shema velja tudi za *C. gattii* sensu lato, ki vključuje osem genotipov (11).

Na podlagi rezultatov genotipizacije smo ugotovili, da vsi testirani slovenski izolati *C. deneoformans* pripadajo genotipu

AFLP2/VNIV, vsi testirani izolati *C. neoformans* pa genotipu AFLP1/VNI (slika 3) (13).

Poleg genotipov smo izolatom *C. neoformans* sensu lato določili še serotip in paritveni tip, ki je domnevno povezan z virulenco seva (13, 20). Določitev je potekala preko mnogokratne verižne reakcije s polimerazo (angl. *polymerase chain reaction*, PCR), ki tarči del gena *RUM1*. Prvi PCR je namenjen ugotavljanju prisotnosti alela paritvenega tipa α in drugi PCR za ugotavljanje prisotnosti alela paritvenega tipa α ter dve hidrolizacijski sondi, specifični za *C. deneoformans* (serotip D) in *C. neoformans* (serotip A) (13).

Skoraj vsi ($n = 43$; 93,5%) slovenski izolati pripadajo paritvenemu tipu α , dva izolata *C. deneoformans*, osamljena iz ene bolnice, pripadata paritvenemu tipu α in izolat *C. neoformans* *C. deneoformans* pripada hibridnemu tipu α A-aD (13). Tako visok delež paritvenega tipa α kaže na izrazitejši nevro-tropizem in višji virulentni potencial izolatov (20, 21).

TESTIRANJE OBČUTLJIVOSTI IZOLATOV *CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS* SENSU LATO ZA PROTIGLIVNA ZDRAVILA

Vseh 66 izolatov *C. neoformans* sensu lato smo testirali na občutljivost za protiglivna zdravila s testom Micronaut-AM Antifungal Agents MIC (Merlin Diagnostika, Nemčija), ki temelji na mikrodilucijski metodi (13). Testirali smo amfotericin B (0,03–16 mg/l), 5-fluorocitozin (0,06–32 mg/l), flukonazol (0,002–128 mg/l), vorikonazol (0,008–8 mg/l), posakonazol (0,008–8 mg/l) in itraconazol (0,03–4 mg/l) (tabela 1). Test vključuje tudi testiranje občutljivosti za kaspofungin, anidulafungin in mikafungin v razponu 0,002–8 mg/l, vendar rezultatov v raziskavo nismo vključili, ker so kriptokoki naravno odporni proti ehinokandinom.

Za najaktivnejša protiglivna zdravila so se izkazali vorikonazol, itraconazol in posakonazol z minimalno inhibitorno koncentracijo

Tabela 1. Občutljivost izolatov *Cryptococcus deneoformans*, *Cryptococcus neoformans* in *C. neoformans C. deneoformans* (hibrid) za protiglivna zdravila. MIK – minimalna inhibitorna koncentracija, MIK₅₀ – koncentracija protiglivnega zdravila, pri kateri pride do inhibicije rasti pri polovici testiranih izolatov, MIK₉₀ – koncentracija protiglivnega zdravila, pri kateri pride do inhibicije rasti pri 90 % testiranih izolatov, FL – flukonazol, AB – amfotericin B, VO – vorikonazol, IT – itrakonazol, POS – posakonazol, 5FC – 5-fluorocitozin.

Vrsta izolata	Parameter občutljivosti	FL	AB	VO	IT	POS	5FC
<i>Cryptococcus deneoformans</i> (n = 47)	razpon MIK (mg/l)	0,25–16	0,031–0,25	0,008–0,125	0,031–0,125	0,008–0,063	0,063–4
	MIK ₅₀ (mg/l)	2,0	0,125	0,008	0,031	0,008	0,125
	MIK ₉₀ (mg/l)	4,0	0,25	0,016	0,063	0,016	0,25
	aritmetična sredina	1,8	0,13	0,014	0,04	0,012	0,19
<i>Cryptococcus neoformans</i> (n = 18)	razpon MIK (mg/l)	0,5–64	0,063–0,5	0,008–0,25	0,031–0,25	0,008–0,063	0,063–1
	MIK ₅₀ (mg/l)	8,0	0,25	0,063	0,031	0,031	0,5
	MIK ₉₀ (mg/l)	16,0	0,25	0,125	0,063	0,063	1,0
	aritmetična sredina	7,3	0,22	0,05	0,05	0,03	0,52
<i>Cryptococcus</i> hibrid (n = 1)	/	1,0	0,125	0,008	0,031	0,008	0,25

tracijo (MIK) < 0,25 mg/l. Ti trije azoli imajo najnižje MIK₅₀ (koncentracija protiglivnega zdravila, pri kateri pride do inhibicije rasti pri polovici testiranih izolatov) pri vseh osamljenih vrstah kriptokokov in so celo za eno do dve redčitveni stopnji nižji od MIK₅₀, zabeleženih v drugih evropskih raziskavah (16, 22, 23). Navkljub velikemu pomenu *C. neoformans* sensu lato v medicini klinične mejne vrednosti še niso postavljene, kar oteži razlago dobljenih MIK. Z raziskavami so vseeno prišli do epidemioloških mejnih vrednosti (angl. *epidemiological cutoff value*, ECOFF), ki so postavljene tako za vrsti *C. deneoformans* in *C. neoformans* kot tudi za kompleks *C. neoformans* sensu lato (24, 25). Če pri zgoraj omenjenih azolih upoštevamo ECOFF, ugotovimo, da spadajo naši izolati med divje tipe. Podobno velja v primeru amfotericina B, kjer je MIK₅₀ < 0,5 mg/l, in posledično vsi izolati spadajo med divje tipe. Enako kot Nizozemci smo tudi mi zaznali za eno redčitveno stopnjo višji MIK₅₀ za amfotericin B pri *C. neoformans* kot pri *C. deneoformans* (23). Po pričakovanih smo pri

flukonazolu pri vseh osamljenih vrstah zabeležili višje MIK kot pri ostalih azolih. MIK₅₀ za flukonazol je v primeru *C. deneoformans* (2 mg/l) za dve redčitveni stopnji nižji kot v primeru *C. neoformans* (8 mg/l), kar je v skladu z drugimi raziskavami (16, 22, 23). Če uporabimo ECOFF (MIK ≥ 16 mg/l), ugotovimo, da 7,6 % (n = 5) izolatov ne spada med divje tipe in po vsej verjetnosti poseduje sekundarno pridobljene odpornostne mehanizme. Večina (n = 4,8 %) teh domnevno odpornih izolatov izhaja iz treh bolnikov. Najzanimivejši je primer bolnika, okuženega s HIV, pri katerem se je razvil meningoencefalitis na račun okužbe s *C. neoformans* (AFLP1/VNI); MIK za flukonazol se je v roku treh tednov povišal s 4 mg/l na 64 mg/l (13).

ZAKLJUČEK

Vrste iz rodu *Cryptococcus* so medicinsko najpomembnejše bazidiomicetne kvasovke, ki prizadenejo tako imunsko oslABLJENE kot imunsko kompetentne bolnike. Najpogostejša klinična izraženost je meningoencefalitis, ki v Sloveniji prizadene predvsem

bolnike, okužene s HIV, in bolnike po presaditvi leveice. Kriptokokoza je v Sloveniji redka okužba, saj na leto obravnavamo v povprečju le 1,25 bolnika. Pri nas med povzročitelji kriptokokoze prevladuje vrsta *C. deneoformans* serotip D, ki predstavlja več kot 70 % vseh izolatov in je načeloma pogostejša v sredozemskem prostoru. Več kot 90 % vseh izolatov uvrščamo med paritveni tip α , ki je povezan z bolj izrazitim nevrotropizmom in invazivnimi okužbami. Vrst iz kompleksa *C. gattii* v Sloveniji še ni-

smo osamili niti iz kliničnih niti iz okoljskih vzorcev. Vse, kar je povezano z rodом *Cryptococcus*, je deležno velike pozornosti, ker je v raziskovanje teh mikroorganizmov vključenih veliko področij naravoslovnih znanosti. Izsledki raziskav s področij molekularne filogenije, mikrobne ekologije, klinične medicine in medicinske mikologije bodo razjasnili odgovore na vprašanja, od smiselnosti prerazporeditve rodu do vrstno specifičnih oblik protiglivnega zdravljenja.

LITERATURA

1. May RC, Stone NR, Wiesner DL, et al. *Cryptococcus*: from environmental saprophyte to global pathogen. *Nat Rev Microbiol*. 2016; 14: 106–17.
2. Kwon-Chung KJ, Bennett JE, Wickes BL, et al. The case for adopting the “species complex” nomenclature for the etiologic agents of cryptococcosis. *MSphere*. 2017; 2 (1): e00357–16.
3. Perfect JR, Dismukes WE, Dromer F, et al. Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease: 2010 update by the Infectious diseases society of America. *Clin Infect Dis*. 2010; 50 (3): 291–322.
4. Maziarz EK, Perfect JR. Cryptococcosis. *Infect Dis Clin North Am*. 2016; 30 (1):179–206.
5. Abassi M, Boulware DR, Rhein J. Cryptococcal meningitis: diagnosis and management update. *Curr Trop Med Rep*. 2015; 2 (2): 90–9.
6. Kwon-Chung KJ, Fraser JA, Doering TL, et al. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*, the etiologic agents of cryptococcosis. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2014; 4 (7): a019760.
7. Arendrup M, Boekhout T, Akova M, et al. ESCMID and ECMM joint clinical guidelines for the diagnosis and management of rare invasive yeast infections. *Clin Microbiol Infect*. 2014; 20 Suppl 3: 76–98.
8. Cogliati M, D'amicis R, Zani A, et al. Environmental distribution of *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii* around the Mediterranean basin. *FEMS yeast research*. 2016; 16 (7): fow045.
9. Katoch A, Kapoor P. Recent concepts in fungal taxonomy: A review. *Research and reviews: Journal of Agriculture and Allied Sciences* [internet]. 2014 [citirano 2018 Apr 10]; ISSN: E 2347-226X, P 2319-9857. Dosegljivo na: <http://www.roij.com/open-access/recent-concepts-in-fungal-taxonomy-a-review.php?aid=33856>
10. Hagen F, Lumbsch HT, Arsenijevic VA, et al. Importance of resolving fungal nomenclature: the case of multiple pathogenic species in the *Cryptococcus* genus. *mSphere*. 2017; 2 (4): e00238–17.
11. Hagen F, Khayhan K, Theelen B, et al. Recognition of seven species in the *Cryptococcus gattii/Cryptococcus neoformans* species complex. *Fungal Genet Biol*. 2015; 78: 16–48.
12. Xu J, Vilgalys R, Mitchell TG. Multiple gene genealogies reveal recent dispersion and hybridization in the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Mol Ecol*. 2000; 9 (10): 1471–81.
13. Tomazin R, Matos T, Meis JF, et al. Molecular characterization and antifungal susceptibility testing of sequentially obtained clinical *Cryptococcus deneoformans* and *Cryptococcus neoformans* isolates from Ljubljana, Slovenia. *Mycopathologia*. 2018; 183 (2): 371–80.
14. Cogliati M, Prigitano A, Esposito MC, et al. Epidemiological trends of cryptococcosis in Italy: Molecular typing and susceptibility pattern of *Cryptococcus neoformans* isolates collected during a 20-year period. *Med mycol*. 2018; 0, 1–9.

15. Viviani MA, Cogliati M, Esposto MC, et al. Molecular analysis of 311 *Cryptococcus neoformans* isolates from a 30-month ECMM survey of cryptococcosis in Europe. *FEMS yeast res.* 2006; 6 (4): 614–9.
16. Mlinarić-Missoni E, Hagen F, Chew WH, et al. In vitro antifungal susceptibilities and molecular typing of sequentially isolated clinical *Cryptococcus neoformans* strains from Croatia. *J Med Microbiol.* 2011; 60 (Pt 10): 1487–95.
17. Boekhout T, Theelen B, Diaz M, et al. Hybrid genotypes in the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. *Microbiology.* 2001; 147 (Pt 4): 891–907.
18. Hagen F, Illnait-Zaragozi M-T, Bartlett KH, et al. In vitro antifungal susceptibilities and amplified fragment length polymorphism genotyping of a worldwide collection of 350 clinical, veterinary, and environmental *Cryptococcus gattii* isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010; 54 (12): 5139–45.
19. Meyer W, Castañeda A, Jackson S, et al. Molecular typing of IberoAmerican *Cryptococcus neoformans* isolates. *Emerg Infect Dis.* 2003; 9 (2): 189–95.
20. Kwon-Chung KJ, Edman JC, Wickes BL. Genetic association of mating types and virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun.* 1992; 60 (2): 602–5.
21. Nielsen K, Cox GM, Litvintseva AP, et al. *Cryptococcus neoformans* α strains preferentially disseminate to the central nervous system during coinfection. *Infect Immun.* 2005; 73 (8): 4922–33.
22. Arsic Arsenijevic V, Pekmezovic MG, Meis JF, et al. Molecular epidemiology and antifungal susceptibility of Serbian *Cryptococcus neoformans* isolates. *Mycoses.* 2014; 57 (6): 380–7.
23. Hagen F, Illnait-Zaragozi M-T, Meis JF, et al. Extensive genetic diversity within the Dutch clinical *Cryptococcus neoformans* population. *J Clin Microbiol.* 2012; 50 (6): 1918–26.
24. Espinel-Ingroff A, Aller AI, Canton E, et al. *Cryptococcus neoformans*-*Cryptococcus gattii* species complex: an international study of wild-type susceptibility endpoint distributions and epidemiological cutoff values for fluconazole, itraconazole, posaconazole and voriconazole. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012; 56 (11): 5898–906.
25. Pfaller MA, Castanheira M, Diekema DJ, et al. Wild-type MIC distributions and epidemiologic cutoff values for fluconazole, posaconazole, and voriconazole when testing *Cryptococcus neoformans* as determined by the CLSI broth microdilution method. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2011; 71 (3): 252–9.

Prispelo 17. 4. 2018

Tadeja Matos¹, Rok Tomazin²

Odpornost plesni *Aspergillus fumigatus* proti azolom

Azole Resistance in *Aspergillus fumigatus*

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: *Aspergillus fumigatus*, mehanizmi odpornosti, azoli, mutacije gena *cyp51A*

Za plesen *Aspergillus fumigatus* je značilen širok spekter kliničnega izražanja, predvsem pri imunsko oslabeledih bolnikih. Pri tem je pomembno izpostaviti invazivne, agresivno potekajoče okužbe, ki so povezane z visoko smrtnostjo (npr. invazivna pljučna in razsejana aspergiloza). Zdravljenje aspergiloz temelji na azolih, predvsem posakonazolu, itraconazolu in vorikonazolu. Slednji je običajno prva izbira v primeru invazivnih oblik okužbe. V zadnjem času se pojavljajo sevi *A. fumigatus*, ki so odporni proti omenjenim protiglivnim zdravilom in dosegajo v določenih regijah dovolj visoko prevalenco, da je za izkustveno zdravljenje lokalno priporočen alternativni izbor protiglivnih zdravil. Odpornost se pojavlja ne le v povezavi s protiglivnim zdravljenjem bolnikov, temveč tudi v povezavi z uporabo azolnih fungicidov v kmetijstvu in florikulturi. Pri več kot 80 % primerov je odpornost sevov *A. fumigatus* povezana z mutacijami gena *cyp51A*. Tip mutacije se glede na izvor izolata razlikuje; za odporne izolate *A. fumigatus*, osamljene iz agrarnega okolja, je značilna kombinacija točkovne mutacije L98H in tandemske ponovitve TR₃₄ v promotorski regiji gena *cyp51A*.

ABSTRACT

KEY WORDS: *Aspergillus fumigatus*, resistance mechanisms, azoles, *cyp51A* mutations

Aspergillus fumigatus causes a wide range of clinical manifestations, especially in immunocompromised patients. Invasive, aggressive infections, such as invasive pulmonary and disseminated aspergillosis, are associated with high mortality. Antifungal treatment of aspergillosis is based on azoles, especially posaconazole, itraconazole and voriconazole, the latter being usually the first choice in cases of invasive forms of infection. Lately, the prevalence of azole-resistant *A. fumigatus* strains has in some regions reached a point at which treatment strategies had to be changed. Azole-resistance occurs in conjunction with antifungal treatment of patients and also in connection with the use of azole fungicides in agriculture and floriculture. In more than 80% of cases, resistance is associated with mutations in the *cyp51A* gene. The type of mutation differs depending on the source of the isolate. Resistant isolates of *A. fumigatus*, isolated from the agrarian environment, are characterized by a combination of the L98H point mutation and the TR₃₄ tandem repeat in the promoter region of the *cyp51A* gene.

¹ Doc. dr. Tadeja Matos, dr. med., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana; tadeja.matos@mf.uni-lj.si

² Asist. Rok Tomazin, univ. dipl. mikrobiol., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana

UVOD

Med plesnimi, ki najpogosteje povzročajo oportunistične invazivne bolezni pri ljudeh, so najpomembnejše plesni iz rodu *Aspergillus*. Med njimi največkrat identificiramo vrsto *Aspergillus fumigatus*, ki jo po novejši razvrstitvi uvrščamo v sekcijo *Fumigati*. Plesni iz rodu *Aspergillus* se razmnožujejo na razpadajočem rastlinju in drugem organskem materialu (npr. v silosih, kompostih). Ob tem nastajajo številni konidiji, ki so navzoči v prahu, prsti ter na površinah rastlin, živali in ljudi. Najdemo jih tudi v zunanem zraku in v zraku notranjih prostorov.

Vdihovanje konidijev *Aspergillus* spp. vodi do številnih bolezni, oblika bolezni, ki se bo razvila, pa je v največji meri odvisna od imunske sposobnosti posameznika. Med posamezniki z dobro imunsko sposobnostjo konidiji povzročajo razne oblike preobčutljivostnih reakcij, npr. alergijsko bronhopulmonalno aspergilozo, ki se pogosto razvije pri atopikih z bronhialno astmo in pri bolnikih s cistično fibrozo.

Za invazivno aspergilozo (IA) večinoma zbolijo bolniki s hematookološkimi boleznimi, predvsem z akutno mieloično levkemijo, in bolniki po avtologni presaditvi krvotvornih matičnih celic. Med nenevropeničnimi bolniki z največjim tveganjem za IA pa so bolniki na dolgotrajnem zdravljenju s kortikosteroidi. Običajno so pri IA prizadeta pljuča, od koder se bolezen lahko po krvi razširi tudi v druge organe in tkiva, pogosto v osrednje živčevje in kožo.

V zadnjih desetletjih se je preživetje bolnikov z IA izboljšalo, na kar je gotovo vplival tudi razvoj azolov. Azoli se uporabljajo za zdravljenje akutne IA, kronične pljučne aspergiloze, kot preventivno zdravilo za IA in za zdravljenje zapletenih okužb (npr. okužb osrednjega živčevja) (1, 2). Vsak izmed njih ima posebno vlogo. Poleg tega so azoli edina skupina protiglivičnih zdravil z delovanjem na plesni iz rodu *Aspergillus*, ki jih bolniki lahko prejemajo oralno, zato igrajo pomembno vlogo zlasti pri ambulant-

no vodenih bolnikih (npr. pri bolnikih s kronično pljučno aspergilozo) (3).

Zdravilo izbora za zdravljenje IA je bilo dolga leta amfotericin B, ki je v liposomalni obliki še vedno pomembno zdravilo in se ga uporablja v primerih rešitvenega zdravljenja IA. Kljub temu je danes na prvem mestu vorikonazol, saj so raziskave pokazale, da povzroča manj stranskih učinkov, stopnja preživetja pa je višja. Vorikonazol (v klinični uporabi od leta 2002) in posakonazol (v klinični uporabi od leta 2006) se uporabljata tudi za zdravljenje težko potekajoče astme, saj z njuno uporabo izboljšamo delovanje pljuč in posledično kakovost življenja (4, 5). Poleg njiju sta v klinični uporabi še itrakonazol (od leta 1997) ter najnovejši izavukonazol, ki je na tržišču komaj nekaj let (4).

O odpornosti sevov *A. fumigatus* proti azolom so poročali že leta 1980, ko sta bila dva bolnika iz ZDA zdravljeni z itrakonazolom (6). Kasneje je največ poročil o odpornosti proti azolom prihajalo iz Evrope. Na Nizozemskem so leta 1997 poročali o odpornem izolatu pri bolniku, ki je bil po presaditvi pljuč dolgo časa na preventivnem zdravljenju z itrakonazolom (7). Leta 2007 objavljena raziskava pa je obravnavala devet bolnikov, izmed katerih štirje nikoli niso prejeli azolov, a so bili kljub temu pri vseh devetih bolnikih prisotni proti azolom odporni sevi *A. fumigatus*. Takrat je bila zaradi genetske podobnosti izolatov in epidemiološke nepovezanosti bolnikov prvič postavljena hipoteza, da mutacija morda izvira iz zunanjega okolja. Do mutacij gena *cyp51A*, ki povzročajo odpornost sevov *A. fumigatus* proti azolom, naj bi prišlo zaradi široke uporabe fungicidov v kmetijstvu. Fungicidi so strukturno namreč podobni azolom in zaradi selekcijskega pritiska na plesni iz rodu *Aspergillus* vodijo v odpornost sevov *A. fumigatus* proti azolom (8). Ta druga pot nastanka odpornosti, pri kateri mutacije izvirajo iz zunanjega okolja, je bila v zadnjem desetletju tudi jasno opredeljena (9, 10).

Namen prispevka je opisati epidemiologijo in najpogostejše mehanizme odpornosti plesni *A. fumigatus* ter širjenje odpornosti, klinične posledice in načine odkrivanja odpornih sevov *A. fumigatus* v vsakodnevni mikrobiološki praksi.

MEHANIZMI ODPORNOSTI PROTI AZOLOM ODPORNIH SEVOV *ASPERGILLUS FUMIGATUS*

Vsi azoli zavirajo od citokroma P450 odvisno lanosterol 14 α -demetilazo in s tem onemogočajo biosintezo ergosterola, ki uravnava fluidnost celične membrane. Zaviranje nastajanja ergosterola ima za posledico kopičenje 14 α -metil sterolov, kar vodi do sprememb v prepustnosti in stabilnosti celične membrane in posledično do zavrite rasti glive. Odpornost proti azolom je v 80–90% povezana z mutacijo gena *cyp51A*, ki kodira tarčni encim lanosterol 14 α -demetilazo (11).

Mutacije v genu *cyp51A* so zadostne za nastanek odpornosti proti nekaterim ali vsem triazolom in vodijo do zmanjšane vezave ali zmanjšanega vnosa zdravila, kar vodi do nastanka odpornega fenotipa. V splošnem lahko rečemo, da poznamo dve poti nastanka odpornosti, ki sta povezani z genom *cyp51A*. Prva in najpogostejša oblika mutacij nastaja v zunanjem okolju (verjetno zaradi uporabe azolov v kmetijstvu in nekaterih drugih sorodnih panogah) in je kombinacija sprememb v promotorskem delu gena ter točkovnih mutacij v genu samem (12–14). Druga oblika mutacij nastane ob dolgotrajnem zdravljenju z azoli (najpogosteje v prizadetih pljučih) in se kaže samo v obliki točkovnih mutacij gena *cyp51A*. V nadaljevanju so našete spremembe gena *cyp51A*, ki so povezane z odpornostjo.

Kombinacija tandemskih ponovitev in točkovnih mutacij v genu *cyp51A*

Set sprememb v genu *cyp51A* vodi do panazolne odpornosti izolatov *A. fumigatus*.

Spremembe v genu *cyp51A* se kažejo v obliki tandemske ponovitve baznih parov v promotorski regiji tega gena in z mutacijami v genu samem ter imajo za posledico prekomerno izražanje gena (8, 15). Ugotovili so, da sta za izražanje odpornosti potrebni obe spremembi v genomu glive.

Najpogosteje opisana kombinacija, ki vodi v odpornost proti itrakonazolu, vorikonazolu in posakonazolu, je 34-tandemska ponovitev baznih parov (TR₃₄) v promotorski regiji gena *cyp51A* in mutacija v samem genu *cyp51A*, ki vodi do zamenjave levcina v histidin na mestu 98 (L98H). Ta mehanizem je najpogostje prepoznana oblika odpornosti tako pri okoljskih kot pri kliničnih izolatih *A. fumigatus* (16). O pojavu odpornih sevov *A. fumigatus*, ki so povzročili prebojne okužbe, so najprej poročali iz medicinskih centrov na Nizozemskem (8, 17). Zanimivo spoznanje, da so mutacijo TR₃₄/L98H odkrili pri bolnikih, ki epidemiološko med seboj niso bili povezani, je kazalo na verjetnost nastanka te mutacije v okolju (17).

Druga najpogostejša oblika mutacij s tandemskimi ponovitvami v promotorski regiji je bila opisana leta 2012. Gre za 46-tandemsko ponovitev baznih parov v promotorski regiji in kombinacijo dveh mutacij v genu *cyp51A*, TR₄₆/Y121F/T289A (18, 19). Ob teh mutacijah tudi najnovejši azol (izavukonazol) kaže zmanjšano aktivnost *in vitro* ter slabšo učinkovitost *in vivo* (19, 20).

Oba odpornostna mehanizma, TR₃₄/L98H in TR₄₆/Y121F/T289A, sta sestavljena iz kombinacije genomskih sprememb, ki vključujejo tako tandemske ponovitve kakor tudi mutacije v genu samem. Te oblike mutacij bolnike prizadenejo z vsemi oblikami bolezni, ki jih povzročajo plesni iz rodu *Aspergillus*, pri bolnikih z IA pa povzročajo visoko smrtnost. Raznolikost mutacij izolatov je majhna (9, 10).

Da bi vse kombinacije genomskih sprememb nastale med zdravljenjem bolnikov, je malo verjetno, saj so bili bolniki z obema

setoma mutacij epidemiološko nepovezani, prav tako jih večina (64–71 %) predhodno ni prejela zdravljenja z azoli (9, 10). Poleg tega so obe obliki mutacij osamili tudi iz okolja. Zaradi vseh teh spoznanj menijo, da mutacije s tandemskimi ponovitvami promotorske regije gena *cyp51A* izvirajo iz okolja in nastajajo zaradi izpostavljenosti zaviralcem 14 α -demetilaze, ki se uporabljajo v kmetijstvu za varstvo rastlin in ohranjanje raznega materiala (13, 17, 21).

Točkovne mutacije

Točkovne mutacije gena *cyp51A* so bile prisotne pri bolnikih, ki so bili zaradi kronične pljučne aspergiloze s prisotnimi kavitacijami (aspergilomi) dlje časa zdravljeni z azoli (10). Za seve, ki izvirajo od istega bolnika, je značilna visoka raznolikost mutacij. Razlagajo, da mikrookolje v kavernah in drugih kavitacijah omogoča živahno nespolno razmnoževanje konidijev, kar je hipotetično dejavnik tveganja za nastanek opisanih mutacij znotraj gostitelja, ki prejema zdravljenje z azoli. Poznanih je več točkovnih mutacij v genu *cyp51A*, ki se kažejo kot spremenjeno aminokislinsko zaporedje, najpogostejše so G54, M220 in G138 (22). Te točkovne mutacije povzročijo spremembe v primarni strukturi encima in bodisi onemogočijo dostop azolom do aktivnega mesta na encimu bodisi spremenijo obliko kanalčka na način, da se azoli ne morejo za dlje časa vezati na aktivno mesto (23).

Ne-*cyp51A* mutacije

Približno 10 % odpornih sevov *A. fumigatus*, ki jih najdemo v okolju, ne izraža mutacij v genu *cyp51A*. Vzrok za to je najpogosteje mehanizem povečanega črpanja azolov iz glivnih celic, obstaja pa še mnogo drugih (nepoznanih) možnih mehanizmov odpornosti (24). Nobena od opisanih odpornosti pa ne vpliva na virulenco povzročiteljev, saj je ta enakovredna virulenci sevov divjega tipa (25).

POJAV IN ŠIRJENJE PROTI AZOLOM ODPORNIH SEVOV *ASPERGILLUS FUMIGATUS*

Večina poročil o odpornosti *A. fumigatus* proti azolom izvirajo iz evropskih držav. Sistematične raziskave o odpornosti in mehanizme odpornosti so začeli preučevati v skupini iz Nijmegna na Nizozemskem. Poročali so o letnem povečevanju odpornosti proti itrakonazolu (v letih 1994–2007 se je odpornost z 1,7 % povečala na 6 %) (17). Kasneje, od leta 2004 dalje, so v Manchestru v Veliki Britaniji pri kliničnih izolatih *A. fumigatus* opisali alarmantno povečanje azolne odpornosti (5%). Britanci so imeli v letu 2008 14 % in v letu 2009 20 % odpornosti proti azolom (26). Od takrat naprej so opisali odpornost proti azolom tudi v številnih drugih državah v Evropi. Najpogostejša mutacija v Evropi je TR34/L98H, ki je opisana tudi v drugih svetovnih državah. S prospektivno raziskavo evropske mreže za nadzor odpornosti aspergilov (Surveillance Collaboration on Aspergillus Resistance in Europe, SCARE), ki je zajela 19 evropskih držav, je bilo ugotovljeno, da je v Evropi povprečna prevalenca odpornosti *A. fumigatus* proti azolom 3,2 %. Poročali so o odpornosti v 11 od 19 vključenih držav s prevalenco 0–26 % v 22 centrih (27).

Obstaja tudi nekaj podatkov za azijske države. Prva poročila izvirajo iz leta 2005 s Tajvana (dva izolata od 40 testiranih sta bila odporna proti azolom) in Kitajske (28). Pri izolatih iz Kitajske je bila mutacija TR₃₄/L98H prisotna v osmih od 29 izolatov. Tudi z Japonske poročajo o TR₃₄/L98H mutaciji in visoki prevalenci odpornosti (11,2 %). Poleg te so opisali tudi tri druge točkovne mutacije in nazadnje še mutacijo TR₄₆/Y121F/T289A (29). V Indiji je bila prevalenca med kliničnimi izolati nizka (do 2 %), podobno tudi v Iranu in Kuvajtu (3,2–4,2 %).

Raziskava, v katero je bilo vključenih 62 medicinskih centrov s Kitajske, Portugalske, Brazilije, Češke in ZDA, je pokazala, da

je imelo 5,8 % sevov *A. fumigatus* minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) za azole povišane nad 1 µg/ml. V ZDA so o mutacijah TR₃₄/L98H in TR₄₆/Y121F/T289A, ki jih v predhodni raziskavi z več kot 1.000 izolati niso našli, prvič poročali leta 2008 (30, 31). Brazilska raziskava, v katero je bilo vključenih 170 izolatov iz obdobja 2000–2012, je poročala o 3,5 % prevalenci odpornosti, ni pa opredelila mutacij. Iz Avstralije so poročali o devetih od 418 pregledanih izolatov z zmanjšano občutljivostjo za azole, leta 2004 pa so objavili prvi izolat z mutacijo TR₃₄/L98H (32).

KLINIČNE POSLEDICE POJAVLJANJA PROTI AZOLOM ODPORNIH SEVOV ASPERGILLUS FUMIGATUS

Do sedaj opravljene raziskave so pokazale, da pri izolatih, ki so *in vitro* odporni proti azolom, zdravljenje z azoli ni učinkovito, kar je bilo potrjeno tudi s poskusi na živalih (8, 17, 26, 33–35). Pri bolnikih z IA, ki so imeli osamljen *A. fumigatus* z mutacijo TR₃₄/L98H, je bila umrljivost višja (88 %) v primerjavi z bolniki, ki so zboleli za IA in pri katerih je bil osamljen divji tip *A. fumigatus* z občutljivim fenotipom (umrljivost 30–50 %) (36). Podobno slabo prognozo so imeli tudi bolniki z verjetno in dokazano IA, ki so jih povzročili sevi z mutacijo TR₄₆/Y121F/T289A.

O odpornosti proti azolom so poročali tudi pri sevih, ki so povzročili kronične oblike aspergiloze in izražanje raznih alergij (npr. alergijske bronhopulmonalne aspergiloze). Tudi pri teh sevih zdravljenje z azoli ni bilo učinkovito (35). Raziskave *in vitro* so pokazale, da mehanizmi odpornosti proti azolom sprožijo navzkrižno odpornost proti vsem azolom. Mutacija TR₃₄/L98H kaže panazolno odpornost proti itrakonazolu, vorikonazolu in posakonazolu. Mutacija TR₄₆/Y121F/T289A vodi do višjih MIK za vorikonazol (50 %, > 16 µg/ml) v primerjavi z mutacijo TR₃₄/L98H (50 %, > 8 µg/ml) (19).

Tudi najnovejši azol – izavukonazol – ob teh mutacijah kaže *in vitro* zmanjšano aktivnost ter *in vivo* slabšo učinkovitost (19, 20).

Vloga azolov pri zdravljenju bolnikov s sevi, ki so odporni proti azolom, je tako bistveno omejena. Razen dokumenta skupine evropskih strokovnjakov, ki je bil objavljen leta 2015, trenutno ni smernic ali priporočil, ki bi opredeljevale zdravljenje proti azolom odpornih plesni iz rodu *Aspergillus*. V tem dokumentu je mnogo strokovnjakov mnenja, naj se za aspergilozo z odpornimi izolati proti azolom kot zdravilo izbora uporablja liposomalni amfotericin B ali pa kombinacija vorikonazola in ehinokandina. Na področjih z visoko (višjo od 10 %) prevalenco proti azolu odpornih okoljskih izolatov, npr. na Nizozemskem, so bili enakega mnenja (37).

Zadnje ameriške smernice iz leta 2016 temu problemu ne posvečajo večje pozornosti, kar je razumljivo zaradi relativno nizke prevalence odpornosti v ZDA. Kljub temu je kombinirano zdravljenje z vorikonazolom in ehinokandinom umeščeno kot alternativno začetno zdravljenje za bolnike s hematološkimi obolenji in tudi za bolnike s hudo nevtropenijo. Stranskih učinkov takšnega zdravljenja še niso ovrednotili, prav tako je zaradi dolgotrajnosti zdravljenja vprašljiva tudi njegova izvedljivost (38).

ODKRIVANJE PROTI AZOLOM ODPORNIH SEVOV ASPERGILLUS FUMIGATUS

Čeprav je delež odpornih izolatov *A. fumigatus* v svetu še nizek in slabše opredeljen kot v nekaterih evropskih državah, se bodo odporni sevi tudi po svetu verjetno kmalu razširili v večjem deležu, poleg poznanih mutacij se bodo pojavljale nove. Predvideti, kakšno je tveganje posameznega bolnika za okužbo z odpornimi sevi, je zaradi nastajanja mutacij v okolju izjemno težavno. Če bolnik izhaja iz okolja, kjer je z epidemiološkimi raziskavami potrjeno, da je prevalenca odpornih okoljskih izolatov

visoka, ima gotovo večje tveganje. Raziskave, ki so obravnavale bolnike z osamljenimi, proti azolom odpornimi sevi *A. fumigatus*, kažejo, da kar dve tretjini bolnikov nista prejemale zdravljenja z azoli (17, 36). V preostali tretjini bolnikov pa je verjetno prišlo do prebojne okužbe ob preventivi z azoli ali zdravljenju z njimi (39).

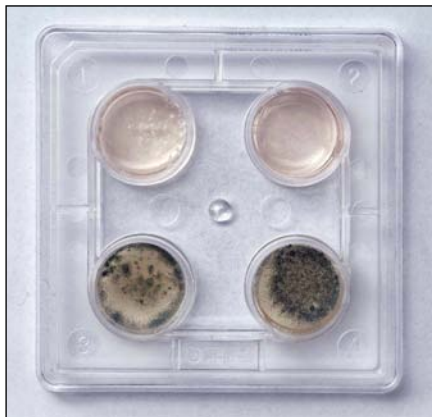
Večina nadzornih raziskav kaže, da je proti azolom odpornih izolatov še vedno manj kot 10% (27, 40). Pomembno je tudi dejstvo, da lahko delež odpornosti zelo niha ne samo med posameznimi državami, ampak celo med posameznimi oddelki iste bolnišnice (26, 27, 34, 36). V raziskavi iz leta 2016 poročajo o 26% stopnji prevalence kliničnih izolatov pri bolnikih s pozitivno kulturo iz enote intenzivne terapije, medtem ko je bila odpornost z ostalih oddelkov dosti nižja (14%) (34). V prihodnosti bo zato potrebno natančno spremljanje in opredelitev prevalence proti azolom odpornih izolatov, bodisi s sprotnim testiranjem bodisi s testiranjem shranjenih kliničnih izolatov, da bomo lahko na osnovi teh podatkov lažje svetovali, katera strategija zdravljenja bi bila najprimernejša.

VIP Check™ ploščica za spremljanje odpornosti proti azolom

Za zdaj nimamo smernic, ki bi opredeljevale spremljanje odpornosti izolatov *A. fumigatus* proti azolom. Ponekod (npr. na Nizozemskem) imajo že vzpostavljen sistem spremljanja odpornosti, ki ga denarno podpira država. V povprečju poročajo o 7% odpornosti kliničnih izolatov, vendar se ta delež med različnimi univerzitetnimi medicinskimi centri razlikuje (4,3–13,3% leta 2014 in 6,7–16,3% leta 2015) (11). Vzrokov za to nihanje še ne poznajo. Ob osamitvi *A. fumigatus* iz kliničnih vzorcev in potrebi za zdravljenje priporočajo *in vitro* testiranje občutljivosti iz več osamljenih kolonij. Številni mikrobiološki laboratoriji kljub temu rutinsko ne izvajajo testiranja občutljivosti in ne opredeljujejo MIK.

Mikrodilucijo, ki jo ameriški Inštitut za klinične in laboratorijske standarde (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) ter evropski Komite za testiranje antimikrobne dovzetnosti (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, EUCAST) opredeljujeta kot referenčno metodo testiranja filamentoznih gliv, je zaradi zapletenosti izvedbe in številnih drugih dejavnikov v rutinskih mikrobioloških laboratorijih težko izvajati, izvajajo pa jo v referenčnih laboratorijih (41, 42). Prav tako je CLSI opredelil epidemiološke mejne vrednosti za odkrivanje nedivjih tipov, medtem ko je EUCAST na osnovi številnih dejavnikov (standardna doza, farmakološki parametri, klinični izid zdravljenja) opredelil klinične mejne vrednosti.

Nedavno so razvili presejalni test na agarški plošči z vključenimi azoli (itrakonazol, posakonazol in vorikonazol) in negativno kontrolo (VIP Check™, Beneden-Leuven, Nizozemska) (slika 1), ki omogoča osamitev odpornih sevov brez znanega mehanizma odpornosti. S tem testom z visoko občutljivostjo in specifičnostjo lahko prepoznamo možne odporne seve oz. izključimo odpornost, če ugotovimo rast le na



Slika 1. Testna ploščica z vključenimi azoli. Vidna je rast plesni *Aspergillus fumigatus*, desno spodaj je pozitivna kontrola (fotografiral Marko Kolenc, univ. dipl. mikrobiol., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani).

delu ploščice brez protiglivnega zdravila (negativna kontrola). Test nam pomaga pri izbiri izolatov za *in vitro* testiranje. V primeru rasti na mestu gojišča z vključenim azolom je potrebno potrditveno testiranje z opredelitvijo MIK. Poleg epidemioloških podatkov, ki jih pridobimo s preizkusom, je ta uporaben tudi neposredno – npr. za svetovanje pri zdravljenju bolnikov z aspergilozo. Rast na delu gojišča z vključenim azolom namreč pomeni, da je potrebna sprememba zdravljenja, v primeru monoterapije z azolom celo brez potrditvenega testiranja. Alternativna metoda presejalnega testiranja je opredeljevanje MIK z gradientno difuzijsko metodo, pri čemer priporočajo testiranje itrakonazola. Ob tem je treba poudariti, da lahko v tem primeru nekatere mehanizme odpornosti prezremo.

Molekularni testi za neposredno dokazovanje najpogostejših mutacij, ki privedejo do odpornosti *Aspergillus fumigatus* proti azolom

Znano je, da je gojenje večine (do 90 %) vzorcev izpranih bronhusov in drugih vzorcev iz spodnjih dihal pri bolnikih z aspergilozo negativno (43). Zato je tudi opredeljevanje odpornosti pri bolnikih z negativnimi rezultati gojenja nemogoče brez molekularnih metod. Detekcija mehanizmov odpornosti neposredno iz kliničnih vzorcev z metodo verižne reakcije s polimerazo (angl. *polymerase chain reaction*, PCR) je bila prvič opisana v letu 2010 (44). Pred kratkim so razvili tržni test (AsperGeniusR, PathoNotics, Maastricht, Nizozemska), ki poleg aspergilne DNA zazna tudi dva najpogostejša mehanizma odpornosti (TR₃₄/L98H in TR₄₆/Y121F/T289A). Test kaže visoko občutljivost in specifičnost za zaznavanje *Aspergillus* spp. iz vzorcev izpranih bronhusov (za bolnike s hematološkimi malignimi bolehnji je občutljivost 88,9 % in specifičnost 89,3 %, za bolnike v enotah intenzivne terapije pa je občutljivost 80 % in specifičnost

93,3 %) (45). V drugi raziskavi poročajo o 100 % občutljivosti in 78,6 % specifičnosti tega testa pri bolnikih z IA in zaznavanju PCR produktov iz seruma (46). Ker je gen *cyp51A* prisoten v eni sami kopiji na celico, je detekcija mutacij iz seruma zaradi nizke občutljivosti omejena. Poleg tega ta test omogoča prepoznavanje le dveh najpogostejših mehanizmov odpornosti. To pomeni, da test ne izključuje možnosti, da je povzročitelj odporen proti azolom z drugim mehanizmom odpornosti.

ZAKLJUČEK

V zadnjem desetletju smo pričali pojavu odpornosti proti azolom z največjo prevalenco na nekaterih področjih v Evropi. Najpogosteje opisani in razširjeni sta mutaciji TR₃₄/L98H in TR₄₆/Y121F/T289A, za kateri menimo, da nastajata v okolju, zlasti zaradi široke uporabe azolov v kmetijstvu. Pri tem gre za pojav seta mutacij v promotorski regiji gena *cyp51A* in genu samem, kar privede do prekomernega izražanja gena *cyp51A*. Druga oblika mutacij so točkovne mutacije tarčnega encima, ki nastajajo znotraj gostitelja ob dolgotrajnem zdravljenju z azoli. Zato je postalo spremljanje odpornosti pomembno tudi za plesen *A. fumigatus* – ne samo zaradi izbire protiglivnega zdravila, temveč tudi za zaznavanje odpornosti. Izvajanje referenčnih metod je omejeno na referenčne laboratorije in je nenadomestljivo za testiranje in potrjevanje novih metod in novih protiglivnih zdravil. Potrebno je aktivno spremljanje prevalence odpornosti, za kar imamo enostaven test z vključenimi azoli v gojišču, ki omogoča selekcijo odpornih sevov. Razviti so tudi molekularni testi za neposredno dokazovanje najpogostejših vrst mutacij neposredno iz kliničnih vzorcev.

LITERATURA

1. Walsh TJ, Anaissie EJ, Denning DW, et al. Treatment of aspergillosis: clinical practice guidelines of the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2008; 46 (3): 327–60.
2. Schwartz S, Ruhnke M, Ribaud P, et al. Improved outcome in central nervous system aspergillosis, using voriconazole treatment. *Blood*. 2005; 106 (8): 2641–5.
3. Schweer KE, Bangard C, Hekmat K, et al. Chronic pulmonary aspergillosis. *Mycoses*. 2014; 57 (5): 257–70.
4. Miceli MH, Kauffman CA. Isavuconazole: a new broad-spectrum triazole antifungal agent. *Clin Infect Dis*. 2015; 61 (10): 1558–65.
5. Chishimba L, Niven RM, Cooley J, et al. Voriconazole and posaconazole improve asthma severity in allergic bronchopulmonary aspergillosis and severe asthma with fungal sensitization. *J Asthma*. 2012; 49 (4): 423–33.
6. Denning DW, Venkateswarlu K, Oakley KL, et al. Itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1997; 41 (6): 1364–8.
7. Verweij PE, Te Dorsthorst DT, Rijs AJ, et al. Nationwide survey of in vitro activities of itraconazole and voriconazole against clinical *Aspergillus fumigatus* isolates cultured between 1945 and 1998. *J. Clin. Microbiol*. 2002; 40 (7): 2648–50.
8. Verweij PE, Mellado E, Melchers WJ. Multiple-triazole-resistant aspergillosis. *N Engl J Med*. 2007; 356 (14): 1481–3.
9. Verweij PE, Ananda-Rajah M, Andes D, et al. International expert opinion on the management of infection caused by azole resistant *Aspergillus fumigatus*. *Drug Resist Update*. 2015; 21: 30–40.
10. Verweij PE, Chowdhary A, Melchers WJ, et al. Azole resistance in *Aspergillus fumigatus*: can we retain the clinical use of mold-active antifungal azoles? *Clin Infect Dis*. 2016; 62 (3): 362–8.
11. Verweij PE. 2016 Azole resistance in *Aspergillus fumigatus*. In: SC de Greeff, JW Mouton, AF Schoffelen (eds.). Consumption of antimicrobial agents and antimicrobial resistance among medically important bacteria in the Netherlands. Bergen, The Netherlands: SWAB; 2015. p. 128–131.
12. Camps SM, van der Linden JW, Li Y, et al. Rapid induction of multiple resistance mechanisms in *Aspergillus fumigatus* during azole therapy: a case study and review of the literature. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012; 56 (1): 10–6.
13. Snelders E, Huis In 't Veld RA, Rijs AJ, et al. Possible environmental origin of resistance of *Aspergillus fumigatus* to medical triazoles. *Appl Environ Microbiol*. 2009; 75 (12): 4053–7.
14. Dunne K, Hagen F, Pomeroy N, et al. Inter-country transfer of triazole-resistant *Aspergillus fumigatus* on plant bulbs. *Clin Infect Dis*. 2017; 65 (1): 147–9.
15. Mellado E, Garcia-Effron G, Alcazar-Fuoli L, et al. A new *Aspergillus fumigatus* resistance mechanism conferring in vitro cross-resistance to azole antifungals involves a combination of cyp51A alterations. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007; 51 (6): 1897–904.
16. Chowdhary A, Kathuria S, Xu J, et al. Emergence of azole-resistant *Aspergillus fumigatus* strains due to agricultural azole use creates an increasing threat to human health. *PLoS Pathog*. 2013; 9 (10): e1003633.
17. Snelders E, van der Lee HA, Kuijpers J, et al. Emergence of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* and spread of a single resistance mechanism. *PLoS Med*. 2008; 5 (11): e219.
18. Van der Linden JWM, Camps SMT, Kampinga GA, et al. Aspergillosis due to voriconazole highly resistant *Aspergillus fumigatus* and recovery of genetically related resistant isolates from domiciles. *Clin Infect Dis*. 2013; 57 (4): 513–20.
19. Van Ingen J, van der Lee HA, Rijs TA, et al. Azole, polyene and echinocandin MIC distributions for wild-type, TR34/L98H and TR46/Y121F/T289A *Aspergillus fumigatus* isolates in the Netherlands. *J Antimicrob Chemother*. 2015; 70 (1): 178–81.
20. Gregson L, Goodwin J, Johnson A, et al. In vitro susceptibility of *Aspergillus fumigatus* to isavuconazole: correlation with itraconazole, voriconazole, and posaconazole. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013; 57 (11): 5778–80.
21. Verweij PE, Snelders E, Kema GH, et al. Azole resistance in *Aspergillus fumigatus*: a side-effect of environmental fungicide use? *Lancet Infect Dis*. 2009; 9 (12): 789–95.
22. Chowdhary A, Sharma C, Hagen F, et al. Exploring azole antifungal drug resistance in *Aspergillus fumigatus* with special reference to resistance mechanisms. *Future Microbiol*. 2014; 9 (5): 697–711.
23. Snelders E, Karawajczyk A, Schaftenaar G, et al. Azole resistance profile of amino acid changes in *Aspergillus fumigatus* cyp51A based on protein homology modeling. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2010; 54 (6): 2425–30.
24. Meneau I, Coste AT, Sanglard D. Identification of *Aspergillus fumigatus* multidrug transporter genes and their potential involvement in antifungal resistance. *Med. Mycol*. 2016; 54 (6): 616–27.

25. Valsecchi I, Mellado E, Beau R, et al. Fitness studies of azole-resistant strains of *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015; 59 (12): 7866–9.
26. Howard SJ, Cerar D, Anderson MJ, et al. Frequency and evolution of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* associated with treatment failure. *Emerg Infect Dis*. 2009; 15 (7): 1068–76.
27. Van der Linden JW, Arendrup MC, Warris A, et al. Prospective multicenter international surveillance of azole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Emerg Infect Dis*. 2015; 21 (6): 1041–4.
28. Hsueh PR, Lau YJ, Chuang YC, et al. Antifungal susceptibilities of clinical isolates of *Candida* species, *Cryptococcus neoformans*, and *Aspergillus* species from Taiwan: Surveillance of multicenter antimicrobial resistance in Taiwan program data from 2003. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005; 49 (2): 512–17.
29. Hagiwara D, Takahashi H, Fujimoto M, et al. Multi-azole resistant *Aspergillus fumigatus* harboring Cyp51A TR46/Y121F/T289A isolated in Japan. *J Infect Chemother*. 2016; 22 (8): 577–9.
30. Wiederhold NP, Gil VG, Gutierrez F, et al. First detection of TR34 L98H and TR46 Y121F T289A Cyp51 mutations in *Aspergillus fumigatus* isolates in the United States. *J Clin Microbiol*. 2016; 54 (1): 168–71.
31. Pham CD, Reiss E, Hagen F, et al. Passive surveillance for azole-resistant *Aspergillus fumigatus*, United States, 2011–2013. *Emerg Infect Dis*. 2014; 20 (9): 1498–503.
32. Kidd SE, Goeman E, Meis JF, et al. Multi-triazole-resistant *Aspergillus fumigatus* infections in Australia. *Mycoses*. 2015; 58 (6): 350–5.
33. Van der Linden JW, Camps SM, Kampinga GA, et al. Aspergillosis due to voriconazole highly resistant *Aspergillus fumigatus* and recovery of genetically related resistant isolates from domiciles. *Clin Infect Dis*. 2013; 57 (4): 513–20.
34. Van Paassen J, Russcher A, In 't Veld-van Wingerden AW, et al. Emerging aspergillosis by azole-resistant *Aspergillus fumigatus* at an intensive care unit in the Netherlands, 2010 to 2013. *Euro Surveill*. 2016; 21 (30): pii 30300.
35. Lepak AJ, Marchillo K, VanHecker J, et al. Impact of in vivo triazole echinocandin combination therapy for invasive pulmonary aspergillosis: enhanced efficacy against *Cyp51* mutant isolates. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013; 57 (11): 5438–47.
36. Van der Linden JW, Snelders E, Kampinga GA, et al. Clinical implications of azole resistance in *Aspergillus fumigatus*, the Netherlands, 2007–2009. *Emerg Infect Dis*. 2011; 17 (10): 1846–54.
37. Verweij PE, Ananda-Rajah M, Andes D, et al. International expert opinion on the management of infection caused by azole-resistant *Aspergillus fumigatus*. *Drug Resist Updat*. 2015; 21–22: 30–40.
38. Patterson TF, Thompson GR 3rd, Denning DW, et al. Practice guidelines for the diagnosis and management of aspergillosis: 2016 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2016; 63 (4): e1–e60.
39. Chowdhary A, Sharma C, Kathuria S, et al. Prevalence and mechanism of triazole resistance in *Aspergillus fumigatus* in a referral chest hospital in Delhi, India and an update of the situation in Asia. *Front Microbiol*. 2015; 6: 428.
40. Burgel PR, Baixench MT, Amsellem M, et al. High prevalence of azoler-resistant *Aspergillus fumigatus* in adults with cystic fibrosis exposed to itraconazole. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012; 56 (2): 869–74.
41. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2008 Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; approved standard. 2nd ed. M38-A2. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.
42. Arendrup MC, Meletiadis J, Mouton JW, et al. EUCAST technical note on isavuconazole breakpoints for *Aspergillus*, itraconazole breakpoints for *Candida* and updates for the antifungal susceptibility testing method documents. *Clin Microbiol Infect*. 2016; 22 (6): 571–4.
43. Langridge PJ, Sheehan RL, Denning DW. Microbial yield from physiotherapy assisted sputum production in respiratory outpatients. *BMC Pulm Med*. 2016; 16 (1): 23.
44. Van der Linden JW, Snelders E, Arends JP, et al. Rapid diagnosis of azole-resistant aspergillosis by direct PCR using tissue specimens. *J Clin Microbiol*. 2010; 48 (4): 1478–80.
45. Chong GL, van de Sande WW, Dingemans GJ, et al. Validation of a new *Aspergillus* real-time PCR assay for direct detection of *Aspergillus* and azole resistance of *Aspergillus fumigatus* on bronchoalveolar lavage fluid. *J Clin Microbiol*. 2015; 53 (3): 868–74.
46. White PL, Posso RB, Barnes RA. An analytical and clinical evaluation of the PathoNostics AsperGeniusw Aszsay for detection of invasive aspergillosis and resistance to azole antifungal drugs when testing serum samples. *J Clin Microbiol*. 2015; 53 (7): 2115–21.

Miha Skvarč¹

***Pneumocystis jirovecii*: možni bolnišnični prenos**

***Pneumocystis jirovecii* as Hospital-Acquired Fungi**

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: *Pneumocystis jirovecii*, kolonizacija, okužba, povezana z zdravstveno obravnavo, pnevmocistična pljučnica, genotipizacija

Pneumocystis jirovecii spada med pogojno patogene glive, ki povzročajo pljučnico pri imunsko oslabilih osebah z visoko stopnjo umrljivosti. Še vedno med dejavnike tveganja spada okužba s HIV, med HIV-negativnimi bolniki pa so ogroženi predvsem bolniki, ki prejemajo večkratno imunosupresivno zdravljenje in imunomodulirajoča zdravila. Vedno je vir okužbe človek, kako pride do okužbe, pa je pri veliki večini bolnikov nejasno. Pomemben vir so otroci, ki so do petega leta skoraj vsi kolonizirani z glivo. Vir so lahko tudi zdravstveni delavci, ki *P. jirovecii* prenašajo med bolniki. Poleg naštetega so vir lahko tudi bolniki, saj se pri bolnikovem izkašljevanju gliva aerosolizira in širi po prostoru. V Sloveniji smo dokazali izbruh bolezni na oddelku, ki spremlja bolnike po presaditvi ledvic. Kdo je bil vir okužbe z glivo, ni znano. Prav tako ni jasno opredeljen čas začetka izbruha, saj gliva potrebuje nekaj časa, da se namnoži in prične povzročati težave. Ključno za prepoznavanje izbruha je pravočasna prepoznavanje okužbe, ki temelji na ustrezni klinični sliki in pravočasni diagnostiki. Zelo pomembno je, da se različni vzorci za dokaz pnevmocistične pljučnice vzamejo istočasno, saj to zagotavlja dovolj veliko diagnostično natančnost. Če je postavljen sum na izbruh, je pomembno, da se poskuša dokazati izbruh s pomočjo genotipizacije *P. jirovecii* iz vzorcev spodnjih dihal.

ABSTRACT

KEY WORDS: *Pneumocystis jirovecii*, colonization, hospital infection, pneumocystis pneumonia, genotyping

Pneumocystis jirovecii is a pathogenic fungus that causes *Pneumocystis* pneumonia (PCP) with very high mortality in HIV-positive and HIV-negative immunocompromised patients. The most common factor which contributes to the development of PCP is HIV infection. Other factors that contribute to the development of PCP are hematologic malignant diseases, solid cancers, transplantation of various solid organs, and treatment of chronic diseases with immunosuppressive or immunomodulatory therapeutic agents. The source of the fungi is always human. The main source are children up to five years of age, health care workers and patients with PCP. Patients with PCP cough and spread the fungi with aerosols. A center in Slovenia, where patients after kidney transplant are followed,

¹ Doc. dr. Miha Skvarč, dr. med., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana; miha.skvarc@mf.uni-lj.si

had one outbreak. The main obstacle in proving an outbreak is late presentation of PCP after fungi has settled itself in the respiratory tract. The key step for proving the outbreak is timely recognition of PCP and fast diagnostics with real time quantitative polymerase chain reaction.

UVOD

Pnevmocistična pljučnica (PCP), ki je posledica okužbe z glivo *Pneumocystis jirovecii*, povzroča visoko stopnjo umrljivosti pri osebah z oslabeлим imunskim sistemom, bodisi zaradi okužbe s HIV in razvojem aidsa bodisi so vzrok za motnjo imunskega sistema različne prirojene in pridobljene nenalezljive bolezni. Prevalenca in stopnja smrtnosti zaradi pljučnice, povzročene s *P. jirovecii*, sta se močno povežali med pojavom pandemije aidsa v 80. letih prejšnjega stoletja, vendar sta se z uvedbo protiretrovirusnih zdravil in preventivnega zdravljenja ponovno znižali. Še vedno pa PCP ostaja pomemben vzrok smrti med ranljivimi skupinami bolnikov, kot so bolniki po presaditvi organov, bolniki z avtoimunskimi obolenji ali hematookološki bolniki (1, 2).

P. jirovecii povzroča pljučnico pri osebah z imunsko pomanjkljivostjo. V Sloveniji imajo najvišjo incidenco osebe, ki imajo presajene organe ali krvotvorne matične celice in je potrebna večtirnо immunosupresivno zdravljenje. V ekonomsko razvitih državah z urejenim zdravstvenim sistemom je stopnja umrljivosti zaradi PCP pri HIV-pozitivnih osebah nizka. V delih sveta, kjer ni dostopa do visoko aktivnih protiretrovirusnih zdravil, predvsem v Podсахarski Afriki, pa je PCP še vedno zelo pomemben vzrok obolevnosti in smrtnosti. V Sloveniji ni podatka o umrljivosti zaradi PCP (3, 4).

KLINIČNA SLIKA

Simptomi in klinična slika PCP so neznačilni, bolezen spada med atipične intersticijske pljučnice. Bolniki imajo povišano telesno temperaturo do 38 °C, suh kašelj brez izmečka ter so dispnoični. S poslabšan-

jem hipoksemije pride do progresivnega povečanja dihalnega dela, tahipneje z visoko dihalno frekvenco (> 50 vdihov/min) in dihalne odpovedi (5).

Potek PCP pri HIV-pozitivnih in pri HIV-negativnih osebah, ki imajo okvarjeno delovanje imunskega sistema, se razlikujejo v hitrosti napredovanja okužbe kot tudi v simptomatiki okužbe. Pri HIV-pozitivnih bolnikih z aidsom je napredovanje bolezni počasnejše, manjša je tudi smrtnost. Pri HIV-negativnih bolnikih je potek bolj dramatičen, saj se lahko že v nekaj dneh stanje tako poslabša, da je potreben sprejem bolnikov na oddelke intenzivne terapije, saj zaradi dihalne odpovedi potrebujejo intubacijo in mehansko predihavanje. Gliva okuži alveolarne epiteljske celice oz. pnevmocite tipa 1. Zaradi aktivacije pljučnih makrofagov, CD4 (angl. *cluster of differentiation*) pozitivnih celic T pomagal, nevtrofilcev in drugih posrednikov vnetja pride do patoloških sprememb na alveolarnem epiteliju. Poveča se prepustnost alveolarnih kapilar in nastane intersticijski edem (4, 5). Kolonizacija s *P. jirovecii* pri imunsko kompetentnih osebah je brez klinično pomembnih simptomov. Tudi kolonizirani imunsko oslabei bolniki nimajo simptomov ali znakov.

DIAGNOSTIČNI POSTOPEK

Najvišjo občutljivost in specifičnost dosežemo z uporabo enostopenjske kvantitativne verižne reakcije s polimerazo (angl. *quantitative polymerase chain reaction*, qPCR) v realnem času s pomnoževanjem velike podenote mitohondrijske ribosomalne RNA (angl. *large mitochondrial rRNA subunit*, mtLSU rRNA). Pomnožuje se lahko še gen *msg* (kodira veliki površinski glikoprotein), gen

hsp70 (kodira protein toplotnega šoka 70) in gen *dhps* (kodira dihidropteorat sintetazo). Za diagnosticiranje PCP je občutljivost qPCR pri HIV-pozitivnih osebah 99 %, specifičnost pa 91 % in je primerljiva s specifičnostjo in občutljivostjo pri HIV-negativnih osebah z imunsko oslabeleostjo. S pomočjo qPCR je možno glede na koncentracijo odkrite DNA ločiti med pnevmocistično pljučnico in kolonizacijo s *P. jirovecii* (6–8).

Ključna za interpretacijo qPCR je koncentracija (1,3)- β -D-glukana v serumu. Omenjeni biooznačevalec je sestavni del glivne celične stene pri večini medicinsko pomembnih gliv, prisoten je pri rodovih *Candida*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Acremonium*, *Lomentospora*, *Pneumocystis*, odsoten pa pri redu *Mucorales* in rodu *Cryptococcus* (7, 8). Trenutno ima samo en test dovoljenje ameriškega regulatorja za uporabo v rutinski diagnostiki. Preiskava določanja (1,3)- β -D-glukana je ovrednotena le za serumske vzorce (7, 8). Serumska koncentracija (1,3)- β -D-glukana potrди diagnozo, saj je koncentracija pri bolnikih s PCP bistveno višja kot pri koloniziranih osebah in negativnih kontrolah. Upoštevati je treba tudi sivo območje med dejansko PCP in kolonizacijo; v slednjem primeru se lahko opremo na rezultate serumskih vrednosti (1,3)- β -D-glukana in neposredne imunofluorescence (9, 10).

ANALIZA IZBRUHA ALI PRENOSOV

Še vedno ni popolnoma jasno, ali se PCP razvije zaradi reaktivacije okužbe pri koloniziranih osebah ob padcu njihovega imunskega statusa ali gre za *de novo* okužbo iz okolja oz. od koloniziranih oseb. Rezervoar za *P. jirovecii* so lahko osebe z normalno delujočim imunskim sistemom (otroci, zdravstveni delavci itd.). Pri otrocih lahko pride do kolonizacije že pred prvim letom starosti, še preden se njihov imunski sistem razvije tako dobro, da bi odstranil kolonizacijo. Otroci so tudi pomembni prenašalci okužbe, predvsem ko zbolijo z virusnimi

okužbami zgornjih dihal. Kolonizirane so lahko tudi osebe, ki so pred kratkim prebolele PCP (11, 12).

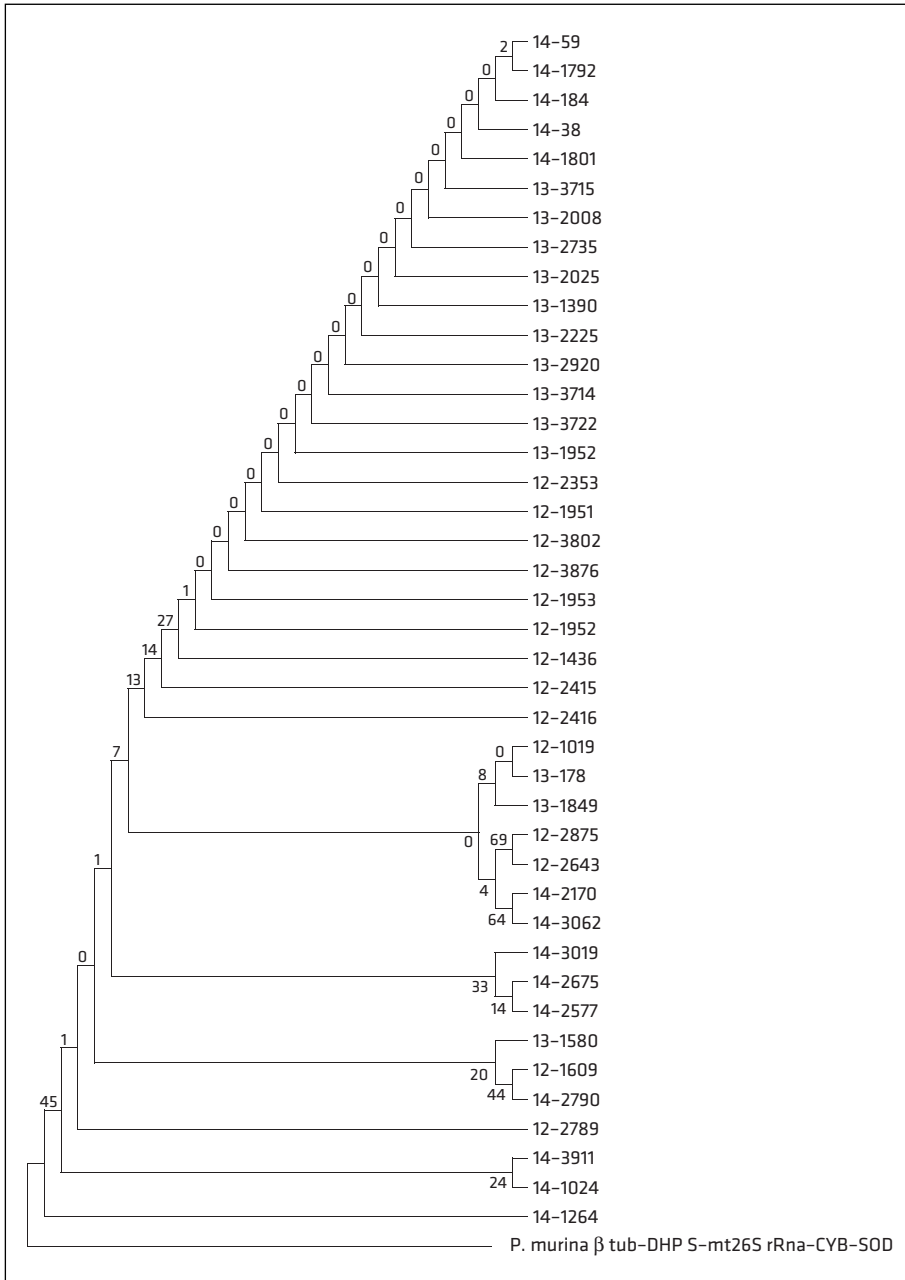
Le Gal in sodelavci so leta 2015 z genotipizacijskimi metodami dokazali kapljični in aerogeni prenos *P. jirovecii* tako pri bolnikih s PCP kot pri koloniziranih osebah. *P. jirovecii* je bila dokazana v oddaljenosti enega, petih in osmih metrov od bolniške postelje, kar je v sklopu bolnišnično-higienjskih ukrepov bistvenega pomena (13).

Konec leta 2011 so na Kliničnem oddelku za nefrologijo Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana naredili analizo bolnikov po presaditvi ledvic. Med 601 bolniki so odkrili 13 bolnikov s PCP (incidenca okužbe 2,2 %). Najkasneje se je PCP razvila 148 mesecev po presaditvi (mediana 17 mesecev, prvi bolnik tri mesece, zadnji 148 mesecev po presaditvi). Pri treh bolnikih je nastala v prvem letu po ukinitvi zaščite s trimetoprim/sulfametoksazolom (TMP/SMX), pri treh bolnikih, ki so imeli zavrnitveno reakcijo, in pri šestih bolnikih po citomegalovirusni okužbi. Nedvoumno je bila PCP dokazana pri desetih bolnikih (14). Za analizo so se odločili, ker se jim je v letu 2011 povečalo število bolnikov s PCP in so sumili, da je prišlo do izbruha. Vir izbruha naj bi bili bolniki, ki so se zdravili ambulantno in so imeli simptome PCP. Danes je odsotnost PCP eden izmed kazalnikov dobre oskrbe na kliniki.

Za magistrsko delo smo leta 2016 analizirali naše vzorce iz spodnjih dihal. Pomnožili in sekvencirali smo DNA *P. jirovecii*. Zbrali smo 73 dihalnih vzorcev 53 bolnikov s PCP, prejetih v obdobju januar 2012–december 2014 iz različnih oddelkov Onkološkega inštituta Ljubljana in klinik Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana. Genotipe oz. sekvenčne tipe smo dobili z metodo tipizacije zaporedij multiplih lokusov (angl. *multilocus sequence typing*, MLST). Izvedli smo tipizacijo MLST na osnovi pet lokusov genoma glive: *DHPS*, β -*tubulin*, *mt26S* rRNA, *CYB* in *SOD*. S sekvenčno analizo gena

DHPS, ki zapisuje dihidropteroat sintazo, smo ugotavljali tudi odpornosti glive proti TMP/SMX (13, 15).

Na koncu smo dobili informativne sekvence za 40 vzorcev 32 bolnikov (slika 1). Ugotovili smo 15 različnih sekvenčnih tipov



Slika 1. Drevo sorodnosti izolatov *Pneumocystis jirovecii*, osamljenih iz 32 bolnikov. Razvrščajo se v sedem genotipskih skupin (15).

P. jirovecii, ki smo jih lahko razvrstili v sedem genotipskih skupin (slika 1). Na podlagi dostopnih epidemioloških podatkov o bolnikih predvidevamo, da smo imeli v letih 2012–2014 en možen izbruh. Ta se je zgodil med bolniki, ki so se zdravili na istem oddelku v istem časovnem obdobju. Za potrditev izbruha bi potrebovali več epidemioloških podatkov, vendar pa nam pojavljanje istih genotipov skozi daljše časovno območje na različnih oddelkih nakazuje, da bi se lahko *P. jirovecii* prenašala med bolniki. Dva genotipa sta krožila med bolniki, ki so bili sicer hospitalizirani na različnih oddelkih, vendar pa oddelki veliko sodelujejo med sabo. Mutacij v genu *DHPS* (za dihidropteorat sintazo) nismo ugotovili, kar pomeni, da ni odpornosti na sulfonamidne kemoterapevtike (15).

PREPREČEVANJE PRENOSOV *PNEUMOCYSTIS JIROVECI*

Kolonizacija dihalnega sistema zdravih ljudi in otrok s *P. jirovecii* je pogosta, zato lahko prihaja do hitrega prenosa na občutljive bolnike. Najboljši prenašalci so vnuki do petega leta starosti. Kot možni prenašalci so navedeni tudi zdravstveni delavci, vendar je veliko vprašanje, če imajo zdravstveni delavci na svojih dihalnih poteh dovolj glive, da bi jo lahko ob normalni negi prenesli na bolnika.

Največja nevarnost za bolnika je drug bolnik s PCP, zato je treba bolnike, okužene s *P. jirovecii*, osamiti v enoposteljne sobe, ki imajo možnost ustvarjanja negativnega tlaka (11). Ostale imunsko oslabele bolnike, brez znakov PCP, je treba hospitalizirati ločeno od bolnikov s PCP. Zdravstveno osebje mora biti poučeno o načinih prenosa *P. jirovecii*, saj so lahko tudi zdravstveni delavci vir prenosa. Ob delu z imunsko oslabljenimi bolniki se mora obvezno nositi kirurška maska (6–8).

Če je bolnik ogrožen, je potrebna tudi podaljšana zaščita. Zaščito je treba ponovno uvesti, če se zazna, da je bolnik koloniziran

z glivo. Osnovna zaščita je s TMP/SMX. Pri bolnikih, ki so bili dlje časa na preprečevalnem zdravljenju, so se razvile različne mutacije v genu *DHPS* (4). Kombinacija TMP/SMX se uporablja kot fungistatično sredstvo za zdravljenje PCP. Učinkovitost profilakse in zdravljenja s TMP/SMX je kljub temu dobra. Opisani so namreč primeri, ko je bila odkrita mutacija, ki naj bi vodila v neuspeh zdravljenja, a so bolniki kljub temu ozdraveli. Neuspehu zdravljenja se lahko izognemo s povečanjem odmerka TMP/SMX, vendar pa je večja verjetnost za nastanek neželenih učinkov (10–13). Če bolnik ne prenaša dobro TMP/SMX, je treba uvesti alternativno zaščito. Na voljo sta dapson ali atovaqoun, alternativno zdravljenje je tudi klindamicin s primakinom (2–5).

ZAKLJUČEK

Pri HIV-negativnih imunsko oslabljenih bolnikih je PCP resna, hitro potekajoča okužba z visoko stopnjo smrtnosti. Zato spada mikrobiološka diagnostika med urgentne preiskave, saj zamujanje z zdravljenjem zelo poveča stopnjo smrtnosti. Mikrobiološka diagnostika pri HIV-negativnih bolnikih temelji na qPCR, ki je najbolj občutljiva in specifična metoda. Zaradi potrebe po ločevanju med kolonizacijo bolnikov s *P. jirovecii* in PCP, je treba določiti tudi (1,3)- β -D-glukan, ki nam služi kot potrditveni biooznačevalca za PCP. Če so koncentracije biooznačevalca zelo visoke (> 500 pg/ml) in je kolonizacija z glivami kvasovkami na večjem številu mest po telesu izključena, gre skoraj zagotovo za PCP. Genotipizacija izolatov *P. jirovecii* nam lahko služi kot orodje za potrjevanje izbruhov. Ne dela se je rutinsko, ampak samo v epidemiološke namene. Za preprečevanje okužbe je ključnega pomena zavedanje, da se lahko *P. jirovecii* prenaša med bolniki in da se lahko isti genotip pojavlja v daljšem časovnem obdobju. Če je bolnik ogrožen, je treba zaščito tudi podaljšati. Diagnostika kolonizacije ni smiselna.

LITERATURA

1. Sokulska M, Kicia M, Wesołowska M, et al. *Pneumocystis jirovecii* – from a commensal to pathogen: clinical and diagnostic review. *Parasitol Res.* 2015; 114 (10): 3577–85.
2. Tasaka S, Tokuda H. *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in non-HIV-infected patients in the era of novel immunosuppressive therapies. *J Kansenshogaku Zasshi.* 2014; 88 (6 Suppl 11): 26–39.
3. Erwig LP, Gow NAR. Interactions of fungal pathogens with phagocytes. *Nat Rev Microbiol.* 2016; 14 (3): 163–76.
4. Morris A, Norris KA. Colonization by *Pneumocystis jirovecii* and its role in disease. *Clin Microbiol Rev.* 2012; 25 (2): 297–317.
5. Maschmeyer G, Helweg-Larsen J, Pagano L, et al. ECIL guidelines for treatment of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in non-HIV-infected haematology patients. *J Antimicrob Chemother.* 2016; 71 (9): 2405–13.
6. Alanio A, Hauser PM, Lagrou K, et al. ECIL guidelines for the diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in patients with haematological malignancies and stem cell transplant recipients. *J Antimicrob Chemother.* 2016; 71 (9): 2386–96.
7. Karageorgopoulos DE, Qu JM, Korbila IP, et al. Accuracy of β -D-glucan for the diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia: a meta-analysis. *Clin Microbiol Infect.* 2013; 19 (1): 39–49.
8. Damiani C, Le Gal S, Goin N, et al. Usefulness of (1,3)- β -D-glucan detection in bronchoalveolar lavage samples in *Pneumocystis* pneumonia and *Pneumocystis* pulmonary colonization. *J Mycol Med.* 2015; 25 (1): 36–43.
9. Fauchier T, Housseine L, Gari-Toussaint M, et al. Detection of *Pneumocystis jirovecii* by Quantitative PCR to differentiate colonization and pneumonia in immunocompromised HIV-positive and HIV-negative patients. *J Clin Microbiol.* 2016; 54 (6): 1487–95.
10. Damiani C, Le Gal S, Da Costa C, et al. Combined quantification of pulmonary *Pneumocystis jirovecii* DNA and serum (1,3)- β -D-Glucan for differential diagnosis of *Pneumocystis* pneumonia and *Pneumocystis* colonization. *J Clin Microbiol.* 2013; 51 (10): 3380–8.
11. Yiannakis EP, Boswell TC. Systematic review of outbreaks of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia: evidence that *P. jirovecii* is a transmissible organism and the implications for healthcare infection control. *J Hosp Infect.* 2016; 93 (1): 1–8.
12. Glaser A, Robič E, Rogina P, et al. Kolonizacija s *Pneumocystis jirovecii* ali pnevmocistična pljučnica – pregled diagnostičnih metod. *Med. Razgl.* 2016; 55 Suppl. 4: 101–10.
13. Le Gal S, Pougnet L, Damiani C, et al. *Pneumocystis jirovecii* in the air surrounding patients with *Pneumocystis* pulmonary colonization. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2015; 82 (2): 137–42.
14. Borstnar S, Lindic J, Tomazic J, et al. *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in renal transplant recipients: a national center experience. *Transplant Proc.* 2013; 45 (4): 1614–7.
15. Robič E. Genotipizacija glive *Pneumocystis jirovecii* izolirane iz kužnin bolnikov s pnevmocistozo [magistrsko delo]. Ljubljana: Univerza v Ljubljani; 2017.

Milena Kerin Povšič¹, Saša Simčič²

Pomen opredeljevanja glivnih antigenov pri onkoloških bolnikih

The Role of Fungal Antigens in Oncological Patients

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: invazivna glivna okužba, (1,3)- β -D-glukan, galaktomanan, manan

Invazivne glivne okužbe so pogost zaplet zdravljenja pri bolnikih z oslabljenim imunskim sistemom, predvsem pri hematookoloških bolnikih in bolnikih v enotah intenzivne terapije. Najpogostejši sta invazivna kandidoza in aspergiloza. Zgodnje protiglavno zdravljenje je značilno zmanjša umrljivost in vpliva na prognozo bolezni. Diagnoza je težka, ker je klinična slika neznačilna, občutljivost hemokultur in invazivnih kliničnih vzorcev pa zgolj 50%. Verjetno glivno okužbo potrdimo z metodo določanja glivnih antigenov, ki so sestavine celične stene in se pri okužbi sproščajo v kri. Dokažemo jih tudi v bronhoalveolarnem izpirku in možgansko-hrbtenjačni tekočini. To so biooznačevalci (1,3)- β -D-glukan, galaktomanan in manan, ki so pozitivni več dni ali tednov pred kulturo. Diagnostično pomembna so tudi protitelesa proti mananu. Vrednosti glivnih antigenov vrednotimo skupaj s kliničnimi znaki, laboratorijskimi in slikovnimi preiskavami. Pri verjetni invazivni glivni okužbi uvedemo preemptivno protiglavno zdravljenje. Pomemben presejalni test za invazivno glivno okužbo, razen za zigomikozo in kriptokokozo, je (1,3)- β -D-glukan. Pomemben je tudi za diagnozo pljučnice, ki jo povzroča *Pneumocystis jirovecii*. Galaktomanan je specifičen za *Aspergillus* spp. in je mikrobiološko merilo za verjetno invazivno aspergilozo. Kombiniran test manan/antimanan ima boljšo občutljivost in specifičnost kot posamezna testa. Vsi testi določanja glivnih antigenov imajo visoko negativno napovedno vrednost. Na Onkološkem inštitutu je bil v letih 2016–2017 test (1,3)- β -D-glukan pozitiven pri 146 bolnikih, visoko pozitiven pri 47 bolnikih (> 500 pg/ml). Dejavnik tveganja v skupini z visoko pozitivno vrednostjo je bilo dolgotrajno zdravljenje s kortikosteroidi. Pljučnico, povzročeno s *P. jirovecii*, je imelo 11 bolnikov. Pri štirih bolnikih smo z galaktomananom v serumu oz. bronhoalveolarnem izpirku in s slikovno diagnostiko potrdili invazivno aspergilozo.

ABSTRACT

KEY WORDS: invasive fungal infection, (1,3)- β -D-glucan, galactomannan, mannan

Invasive fungal infections are common medical complications in patients with immune system deficiencies, especially in hematocologic and intensive care patients. The most common complications are candidiasis and aspergillosis. Early antifungal medication

¹ Dr. Milena Kerin Povšič, dr. med., Onkološki inštitut Ljubljana, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Zaloška cesta 2, 1000 Ljubljana; mkerin@onko-i.si

² Asist. dr. Saša Simčič, univ. dipl. kem., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 2, 1000 Ljubljana

provides a significant decrease in the mortality rate and improves the prognosis of the disease. The diagnosis itself is difficult because the clinical picture is atypical and the sensitivity of hemocultures and invasive clinical tests is only 50%. One can confirm a probable fungal infection by the method of determining fungal antigens present in the cell membranes, which are released into the bloodstream during an infection, and can also be detected in bronchoalveolar and cerebrospinal fluid. They are biological markers (1,3)- β -D-glucan, galactomannan, and mannan, which are positive several days or weeks before the culture is collected. Diagnostically, antibodies against mannan are also important. The results of fungal antigens need to be evaluated together with clinical signs, laboratory test values, and medical imaging. Probable invasive fungal infections should be treated with pre-emptive antifungal medication. (1,3)- β -D-glucan is an important screening test for invasive fungal infections, with the exception of zygomycosis and cryptococcosis. It is also important for the diagnosis of pulmonary *Pneumocystis jirovecii*. Galactomannan is specific for *Aspergillus* spp. and is the microbiological criterion for probable fungal infections. The combined test for mannan-antimannan has better sensitivity and specificity than the individual tests. All fungal antigen tests have a high negative predictive value. At the Institute of Oncology in Ljubljana, in the years 2016–2017, the (1,3)- β -D-glucan test was positive in 146 patients and highly positive in 47 patients (> 500 pg/ml). The risk factor for patients whose results were highly positive was a long-lasting medication with corticosteroids. Eleven of these patients had pneumonia caused by *P. jirovecii*. In four patients, we were able to confirm invasive aspergillosis using galactomannan in serum/bronchoalveolar fluid and medical imaging.

UVOD

Bolniki z maligno boleznijo imajo oslABLJENE obrambne mehanizme. To je posledica osnovne bolezni in postopkov zdravljenja (citostatiki, tarčna zdravila, obsevanje, kortikosteroidi itd.). Oslabljeni sta naravna in pridobljena imunost, predvsem celična. Zmanjšana je aktivnost celic naravnih ubijalk, ki so pomembne v obrambi proti glivam (1). Kemoterapija in obsevanje deluje tudi toksično na epitelij in limfatično tkivo v steni prebavnega, sinopulmonalnega in genitourinarnega trakta, ki je prva obramba proti mikroorganizmom. Črevesna pregrada postane prepustna za toksine, antigene, bakterije in glive, ki prehajajo v mezenterialne bezgavke, peritonealno votlino, limfni in krvni obtok (2, 3). Nastane sistemski vnetni odziv, lahko sepsa in večorganska odpoved (4). Endogeni mikroorganizmi postanejo izvor okužbe v obdobju nevtropenije.

Večje je tudi tveganje za razvoj oportunističnih okužb, ki jih povzročajo *Pneumocystis jirovecii*, *Nocardia* spp., mikobakterije, virusi in oportunistične glive (1).

Invazivne glivne okužbe (IGO) so heterogena skupina okužb, pri katerih so glive prisotne v primarno sterilnih telesnih tekočinah in/ali tkivih. Kandidemija je posledica prehoda gliv skozi črevesno pregrado ali inokulacije gliv skozi žilni kateter (5). Povzročitelji IGO so kvasovke (*Candida* spp., *Cryptococcus* spp.), plesni (*Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Scedosporium prolificans*, *Mucor* spp., *Rhizopus* spp.), redkeje dimorfne glive (*Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis*, *Sporothrix* spp.) (6). Najpogostejši obliki IGO sta invazivna kandidoza in invazivna aspergiloza (IA). Invazivna kandidoza vključuje tri klinične oblike:

- kandidemija brez tkivno invazivne kandidoze,

- kandidemija s tkivno invazivno kandidozo in
- tkivno invazivna kandidoza brez kandidemije.

Incidenca IGO se v zadnjih letih povečuje, ker se večja število bolnikov z imunsko pomanjkljivostjo (maligne in avtoimunske bolezni, presaditev organov, intenzivno zdravljenje, veliki kirurški posegi) (7). Kljub razvoju novih protiglivnih zdravil je umrljivost zaradi IGO, zlasti v enotah intenzivne terapije, še vedno visoka (8). Pri bolnikih s kandidemijo je umrljivost 20–40 % (9).

Diagnoza IGO je težka. Klinična slika je neznačilna, klasični diagnostični metodi (kultura in biopsija tkiva) sta dolgotrajni in slabo občutljivi. Občutljivost hemokultur za glive je 50 %, invazivnih vzorcev manj kot 50 % (5). Koncentracija kandid v prvi pozitivni hemokulturi je različna, v več kot polovici vzorcev je ≤ 1 CFU/ml (bakterijskih kolonijskih enot, angl. *colony-forming unit*, CFU). Mediana časa do pozitivnosti hemokulture je dva do tri dni (10).

Zgodnji začetek protiglivnega zdravljenja je pomemben napovedni dejavnik za preživetje (11, 12). Če se izkustveno zdravljenje kandidemije začne več kot 12 ur po pojavu kliničnih znakov, je umrljivost večja za 20 % (13). Če se protiglivno zdravljenje IA začne v prvih desetih dneh po pojavu pljučnice, je umrljivost 41 %, sicer se poveča na 90 % ($p < 0,01$) (14).

Druge diagnostične metode za IGO, ki ne temeljijo na gojenju, so metode določanja glivnih antigenov in molekularne metode, kot je verižna reakcija s polimerazo (angl. *polymerase chain reaction*, PCR). Metode glivnih antigenov temeljijo na določanju visoko imunogenih gradnikov celične stene gliv v serumu in drugih telesnih tekočinah, npr. možgansko-hrbtenjačni tekočini in bronhoalveolarnem izpirku (angl. *bronchoalveolar lavage*, BAL). Glivni antigeni služijo kot biooznačevalci. To so (1,3)- β -D-glukan (BDG), manan (Mn), galaktomanan

(GM) in kriptokokni antigen. Diagnostični pomen imajo tudi protitelesa v serumu npr. protitelesa proti mananu (A-Mn). Te metode omogočajo zgodnjo diagnozo IGO in so posebej pomembne v primerih, ko glivne okužbe ne uspemo potrditi s hemokulturo ali biopsijskimi vzorci. Test BDG je presejalni test za IGO pri bolnikih z velikim tveganjem, ki imajo npr. hematološko maligno bolezen, so imunsko oslabljeni po presaditvi organov, po kemoterapiji, pri kritično bolnih v enotah intenzivne terapije itd.

VLOGA GLIVNIH ANTIGENOV PRI DIAGNOZI INVAZIVNIH GLIVNIH OKUŽB

Leta 2008 sta Evropska organizacija za raziškave in zdravljenje raka (European Organisation for Research and Treatment of Cancer, EORTC) in Nacionalni inštitut za alergije in nalezljive bolezni raziskovalne skupine Mycoses (National Institute for Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group, NIAID-MSG) izdala posodobljene definicije za IGO (15). Diagnoza IGO je dokazana, verjetna ali možna. Merila za dokazano IGO so:

- mikrobiološki dokaz gliv s kulturo,
- mikroskopski dokaz gliv s histološko, citopatološko ali direktno mikroskopsko preiskavo ali
- dokaz kriptokoknega antigena v možgansko-hrbtenjačni tekočini.

Merila za verjetno IGO so dejavniki gostitelja, klinična in mikološka merila. Mikološka merila so dokaz gliv s kulturo ali mikroskopsko metodo ali metodo določanja glivnih antigenov v serumu. Za dokaz IGO se razen za kriptokokozo in zigomikozo uporablja BDG, za dokaz IA pa GM. Merila za možno IGO vključujejo samo dejavnike gostitelja in klinična merila, ne pa mikoloških meril. Prednost metode glivnih antigenov je, da so pozitivni že pred kulturo in ostanejo pozitivni tudi med protiglivnim zdravljenjem (5).

CELIČNA STENA IN GLIVNI ANTIGENI

Candida albicans ima dvoslojno celično steno. V zunanjem sloju je polisaharid Mn, polimer molekul manoze, ki so povezane z vezmi α -1,4, α -1,6 in α -1,2. Je sestavni del večjih molekul glikoproteinov in glikolipidov. Glavna sestavina notranjega sloja je polimer glukoze β -glukan, ki v obliki β -1,3- in β -1,6-glukana tvori mrežasto strukturo. Nanjo se kovalentno veže hitin, ki daje celični steni čvrstost (16). *Aspergillus fumigatus* ima zunanji sloj celične stene sestavljen iz galaktomanana in α -glukana. Peptidogalaktozan je polisaharid iz galaktofurana in α -1,2-manoze. Podobno kot pri kvasovkah sestavlja jedro celične stene β -glukan, ki je tukaj v obliki β -1,3- in β -1,4-glukana (17).

Polisaharidi v celični steni gliv delujejo kot antigeni, ki pridejo v stik z imunskim sistemom. Pri okužbi se sproščajo iz okuženega tkiva, nastane antigenemija (18). Po fungemiji ostanejo antigeni še nekaj časa v krvi. Polimorfonuklearni levkociti so prve efektorske celice v obrambi proti glivam, delujejo močno fungicidno. Glive odstranjujejo s fagocitozo in znižujejo koncentracijo glivnih antigenov v serumu (19). Nevtropenija in disfunkcija polimorfonuklearnih levkocitov sta ključna dejavnika tveganja za IGO (20). Glivni antigeni, kot sta *Candida* Mn in *Aspergillus* GM, se odstranjujejo iz krvi tudi z endocitozo Kupfferjevih celic v jetrih (21). Virulencijski dejavnik je še β -glukan, saj v topni obliki zavira fagocitozo monocitov in omogoči glivnim celicam, da se izognejo obrambnim mehanizmom (22).

(1,3)- β -D-glukan

Del številnih patogenih gliv (*Candida* spp., *Fusarium* spp., *Aspergillus* spp., *Pneumocystis* spp.) in nekaterih bakterij je BDG. Zigomicete (*Mucor* spp. in *Rhizopus* spp.), *Blastomyces dermatitidis* in *Cryptococcus neoformans* vsebujejo malo BDG, zato za diagnostiko teh okužb ni primeren. Prisoten je tudi v celični

steni gliv *Penicillium* spp., ki kontaminirajo zrak in lahko povzročijo kontaminacijo vzorca (12, 19).

Test BDG ni specifičen za invazivno kandidiazo, ampak opozori na verjetno IGO. Lahko je pozitiven več dni ali tednov pred pozitivno hemokulturo. Vrednost BDG odraža intenzivnost glivne okužbe. Je boljši diagnostični kazalec kot *Candida* score, kolonizacijski indeks ali korigiran kolonizacijski indeks. Omogoča zgodnje preemtivno protiglivo zdravljenje. Dinamika BDG korelira z uspešnostjo zdravljenja in prognozo bolezni (23). Začetni BDG pri invazivni kandidozi < 416 pg/ml napoveduje dober uspeh zdravljenja (24).

Rezultat metaanalize, ki je vključevala 16 raziskav (2.979 bolnikov), je pokazal, da je BDG dovolj natančen test za diagnozo dokazane in verjetne IGO. Skupna občutljivost testa je bila 76,8 %, specifičnost pa 85,3 %. Površina pod skupno krivuljo (angl. *area under the summary receiver operating characteristic curve*, AUC-SROC) je bila 0,89. Zdravljenje s protiglivnim zdravilom zmanjša diagnostično občutljivost testa (25). V drugi metaanalizi, v katero je bilo vključenih 11 raziskav (1.068 bolnikov), je bila skupna občutljivost BDG-testa za IGO 75 %, specifičnost 87 %, AUC-SROC 0,89 (26). V metaanalizi, v kateri je bilo 28 raziskav (skupaj 4.214 bolnikov, z IGO 896 bolnikov), je bila skupna občutljivost BDG 78 %, specifičnost 81 % in AUC-SROC 0,88. Najboljša mejna vrednost za BDG je bila 60 pg/ml (27). Pomembna omejitev BDG-testa je nizka pozitivna napovedna vrednost (PNV) za IGO, 13,6 %. Negativna napovedna vrednost (NNV) je visoka, 97,2 % (28).

Diagnostična omejitev je tudi lažna pozitivnost BDG-testa. To je pogost pojav pri bolnikih v enotah intenzivne terapije. Vzroki za lažno pozitivnost so: kolonizacija sluznic z glivami *Candida* spp. ali plesnimi, bakterijami s po Gramu pozitivnimi (*Streptococcus pneumoniae*) ali po Gramu negativnimi bakterijami (*Pseudomonas aeruginosa*, *Alca-*

ligenes faecalis), zdravljenje z nekaterimi β -laktamskimi antibiotiki (intravenska oblika amoksicilin-klavulanske kisline, piperacilin-tazobaktama), hemodializa s celulozno membrano, hemofiltracija, zdravljenje s humanimi albumini ali imunoglobulini (filtrirani skozi celulozno membrano), uporaba kirurške gaze za rane ali sluznice, mukozitis, druga okvara sluznice prebavnega trakta (7, 29, 30). V raziskavi v neonatalni enoti intenzivne terapije je bila vrednost BDG v skupini bolnikov s fungemijo značilno višja kot v skupini z bakteriemijo (31). V drugi raziskavi je bila vrednost BDG značilno višja pri bolnikih, ki so imeli bakteriemijo s po Gramu negativnimi bacili kot s po Gramu pozitivnimi koki (32).

Uporabnost BDG za diagnozo se kaže pri različnih oblikah IGO osrednjega živčnega sistema, kot so aspergiloza, histoplazmoza in nekateri primeri kriptokokoze. V raziskavi je bila povprečna koncentracija BDG v možgansko-hrbtenjačni tekočini 352 pg/ml in mediana 331 pg/ml (medčetrtinski razmik 103–523 pg/ml) (33).

Diagnostična vrednost BDG v BAL za glivno pljučnico je slaba. V metaanalizi šestih raziskav je bila skupna občutljivost 52 %, specifičnost 58 % in AUC-SROC 0,61 (34). BDG ima dobro diagnostično vrednost za pljučnico, povzročeno s *P. jirovecii* (občutljivost 98 %, specifičnost 94 %, PNV 64,7 %, NNV 99,8 %). Značilne so zelo visoke serumske vrednosti BDG, pogosto > 500 pg/ml. Povečan BDG lahko zaznamo že 5–21 dni pred drugo mikrobiološko diagnostiko (35).

Manan in antimanan

Glavni imunogen celične stene je Mn, bolj je izražen pri vrstah *C. albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis* in manj pri manj patogenih vrstah *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* in *Candida kefyr*. Imunogen Mn se iz krvi hitro odstranjuje z A-Mn, zato je njegova detekcija težka in občutljivost testa slaba. Omenjeni A-Mn je prisoten že pri kolonizaciji s kandido in je sorazmeren s stop-

njo kolonizacije. Test je slabo specifičen. V fazi imunске oslabelosti nastaja malo protiteles, A-Mn v krvi je nizek ali odsoten, prisoten je samo Mn. Z izboljšanjem imunosti nastaja več protiteles, antigenemija se manjša. Občutljivost kombiniranega testa Mn/A-Mn je odvisna od vrste *Candidae*: *C. albicans* 100 %, *C. glabrata* 83 %, *C. tropicalis* 80 %, *C. krusei* in *C. kefyr* 50 %, *C. parapsilosis* 40 % (36).

Metaanaliza 14 raziskav, v katero so bili vključeni hematookološki bolniki in bolniki v enotah intenzivne terapije, je pokazala, da je kombiniran test Mn/A-Mn boljši od posameznih testov. Občutljivost Mn-testa je bila 58 %, specifičnost 93 % in občutljivost A-Mn-testa 59 %, specifičnost 83 %. Občutljivost kombiniranega Mn/A-Mn-testa je bila 83 %, specifičnost 86 % (37). Kombiniran test Mn/A-Mn dobro napoveduje IGO, saj je vsaj eden od testov pozitiven že sedem dni pred hemokulturo. Test ima visoko negativno napovedno vrednost, 100 % (38).

Galaktomanan

Del celične stene *Aspergillus* spp. je GM, ki se sprošča med rastjo plesni in invazijo v tkiva. Po smernicah EORTC/MSG je mikrobiološko merilo za diagnozo verjetne IA. Največje tveganje za IA je pri nevtropeničnih bolnikih in bolnikih po alogeni presaditvi krvotvornih matičnih celic, srednje tveganje je pri bolnikih po avtologni presaditvi krvotvornih matičnih celic, bolnikih, zdravljenih s kortikosteroidi, bolnikih z okužbo s HIV, z različnimi malignimi boleznimi, pri podhranjenih in bolnikih s sladkorno boleznijo. Kortikosteroidi zavirajo fagocitozo, kemotakso, predstavljanje antigena, adhezijo celic in so dejavnik tveganja za IA (39). Bolniki s cistično fibrozo in sistemskimi boleznimi veziva spadajo v nizko stopnjo tveganja. V metaanalizo 27 raziskav so bili vključeni hematološki bolniki, bolniki po presaditvi čvrstih organov in bolniki v enotah intenzivne terapije. Občutljivost

GM-testa v serumu je bila 71 % in specifičnost 89 % (40). Občutljivost testa v BAL je boljša. V raziskavi, v katero so bili vključeni kritično bolni v enoti intenzivne terapije, je bila občutljivost serumskega GM za IA 35 %, specifičnost 70 %, občutljivost GM v BAL 70 % in specifičnost 94 %. Za serumski GM je bila NNV 94 %, za GM v BAL pa 90 %. Pri nenevtropeničnih bolnikih je za mejno vrednost GM v BAL 0,76 občutljivost 100 % in specifičnost 76,2 % (42). Pri nenevtropeničnih bolnikih je občutljivost serumskega GM-testa običajno nižja, ker ga nevtrofilni granulociti hitro odstranjujejo iz krvi. Pri nevtropeničnih bolnikih je ta proces upočasjen. V raziskavi je bil GM-indeks pri bolnikih z vrednostjo polimorfonuklearnih levkocitov $< 0,1 \times 10^9/l$ značilno višji kot pri manj izraženi nevtropeniji. V odsotnosti nevtropenije negativen GM ne izključuje IA (43).

Pri zdravljenju z β -laktamskimi antibiotiki (piperacilin/tazobaktam, amoksicilin/klavulanska kislina), ki so onesaženi z GM, zdravljenju z itraconazolom, s ciklofosfamidom, pri bakteriemiji, kolonizaciji z *Bifidobacterium* itd. je GM lahko lažno pozitiven. Lažno negativen GM pa je lahko posledica protiglivnega zdravljenja, hitrega odstranjevanja iz krvi pri nenevtropeničnih bolnikih ali visokega titra protiteles anti-*Aspergillus* (44).

Za diagnozo IA se poleg GM uporablja tudi BDG. Občutljivost in specifičnost je podobna kot pri GM. Oba antigena lahko določimo v serumu nekaj dni pred osamitvijo *Aspergillus* spp. BDG se odstranjuje iz krvi počasneje kot GM (25).

GLIVNI ANTIGENI PRI BOLNIKI NA ONKOLOŠKEM INŠTITUTU V OBDOBJU 2016–2017

Na vseh oddelkih Onkološkega inštituta je bilo v dveletnem obdobju 146 bolnikov, ki so imeli pozitiven BDG-test (vrednost > 80 pg/ml). Pri 47 bolnikih je bil test visoko pozitiven (vrednost > 500 pg/ml). V tej skupini se je 28 bolnikov (60 %) zdravilo za-

radi tumorja osrednjega živčnega sistema (12 bolnikov primarni, 16 bolnikov sekundarni tumor). Primarni tumor je bil največkrat glioblastom ali limfom, sekundarni pa metastaze pljučnega karcinoma. Ostalih 19 bolnikov je imelo druge maligne bolezni. Dolgotrajno zdravljenje s kortikosteroidi je prejelo 31 bolnikov (66 %). Zdravljenje s kemoterapijo in/ali radioterapijo v zadnjih treh mesecih je prejelo 40 bolnikov (85 %). Enajst bolnikov je imelo v času določitve BDG vrednost levkocitov $< 4,0 \times 10^9/l$, od teh samo eden segmentirane nevtrofilce $< 0,5 \times 10^9/l$.

Pri 11 bolnikih z visoko pozitivnim BDG-testom smo ugotovili pljučnico, povzročeno s *P. jirovecii*. Povzročitelj je bil potrjen s PCR-preiskavo. Mediana vrednost specifičnega PCR za *P. jirovecii* je bila 29,2 cikla (medčetrtnski razmik 27,9–37,3). V tej skupini bolnikov smo ugotovili najvišjo vrednost BDG, 42.200 pg/ml.

Dva bolnika sta imela iz hemokulture osamljene glive (pri enem *C. albicans*, pri drugem *C. krusei*). Umrljivost bolnikov v dveh mesecih je bila 57,4 % (27 bolnikov) (tabela 1).

Pri 13 bolnikih smo ugotovili pozitiven *Aspergillus* antigen GM – indeks encimsko imunskega testa (angl. *Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*, ELISA) je bil $> 0,5$. Štirje bolniki so imeli vrednost *Aspergillus* antigena GM > 9 (dva v serumu, brez podatka v BAL in dva samo v BAL, vrednost v serumu le blago povišana). Pri vseh štirih bolnikih smo z dodatnimi slikovnimi in laboratorijskimi preiskavami potrdili aspergilozo pljuč. Vsi štirje so imeli tudi povišano vrednost BDG v serumu.

Število preiskav na Mn/A-Mn je bilo 212. Število bolnikov s pozitivno preiskavo je bilo 15. Število pozitivnih preiskav je bilo 25 (3 Mn, 22 A-Mn). V nobenem primeru nista bila hkrati pozitivna oba testa.

Tabela 1. Razvrstitev bolnikov z visoko serumsko vrednostjo BDG na Onkološkem inštitutu v letih 2016–2017. BDG – (1,3)- β -D-glukan, OŽS – osrednji živčni sistem, PCP – pnevmocistična pljučnica, HK – hemokultura, KS – kortikosteroidi, KT – kemoterapija, RT – radioterapija.

Leto	BDG > 500 pg/ml	Tumor OŽS (primarni + sekundarni)	Drugi tumorji	Zdravljenje s KS	KT/RT (v zadnjih 3 mesecih)	Pozitivna HK (<i>Candida</i> spp.)	PCP	Umrljivost (dva meseca)
2016	27	16 (9 + 7)	11	17	22	1	6	18
2017	20	12 (3 + 9)	8	14	18	1	5	9
Skupaj	47	28	19	31	40	2	11	27

ZAKLJUČEK

Uporaba glivnih antigenov kot biooznačevalcev v diagnostiki glivnih okužb po smernicah EORTC/MSG omogoča, da postavimo diagnozo verjetna IGO. Vrednosti glivnih antigenov vrednotimo skupaj s kliničnimi znaki ter z izvidi laboratorijskih in slikovnih preiskav. Služijo kot dopolnilo in niso nadomestilo za klasične mikrobiološke

preiskave. Zgodnja diagnoza IGO omogoča preemtivno protiglavno zdravljenje, ki ugodno vpliva na obolevnost in prognozo bolezni.

Ker imajo glivni antigeni visoko NNV za IGO, se lahko pri normalnih vrednostih izognemo profilaktičnemu in izkustvenemu protiglavnemu zdravljenju, ki je toksično, drago in pogosto dolgotrajno (45).

LITERATURA:

- Smiley S, Almyroundis N and Segal Brahm H. Epidemiology and management of opportunistic infections in immunocompromised patients with cancer. *Abstr Hematol Oncol.* 2005; 8 (3): 20–30.
- Balzan S, de Almeida QC, de Cleve R, et al. Bacterial translocation: overview of mechanisms and clinical impact. *J Gastroenterol Hepatol.* 2007; 22 (4): 464–71.
- Trinchieri G. Cancer immunity: Lessons from infectious diseases. *J Infect Dis.* 2015; 212 Suppl 1: S67–73.
- Schoeffel U, Pelz K, Häring RU, et al. Inflammatory consequences of the translocation of bacteria and endotoxin to mesenteric lymph nodes. *Am J Surg.* 2000 180 (1): 65–72.
- Clancy JC and Nguyen MH. Finding the missing 50% of invasive candidiasis: how nonculture diagnostics will improve understanding of disease spectrum and transform patient care. *Clin Infect Dis.* 2013; 56 (9): 1284–92.
- Ramana KV, Kandi S, Bharatkumar V, et al. Invasive fungal infections: a comprehensive review. *Am J Infect Dis.* 2013; 1 (4): 64–9.
- Enoch DA, Ludlam HA and Brown NM. Invasive fungal infections: a review of epidemiology and management options. *J Med Microbiol.* 2006; 55 (Pt 7): 809–18.
- Falagas ME, Apostolou KE and Pappas VD. Attributable mortality of candidemia: a systematic review of matched cohort and case-control studies. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2006; 25 (7): 419–25.
- Clancy CJ and Nguyen MH. Non-culture diagnostics for invasive candidiasis: promise and unintended consequences. *J Fungi (Basel).* 2018; 4 (1): pii E27.
- Pfeiffer CD, Samsa GP, Schell WA, et al. Quantitation of *Candida* CFU in initial positive blood cultures. *J Clin Microbiol.* 2011; 49 (8): 2879–83.

11. Vergidis P, Clancy CJ, Shields RK, et al. Intra-abdominal candidiasis: the importance of early source control and antifungal treatment. *PLoS ONE* 2016; 11 (4): e0153247.
12. Dornbusch HJ, Groll A, Walsh TJ. Diagnosis of invasive fungal infections in immunocompromised children. *Clin Microbiol Infect*. 2010; 16 (9): 1328–34.
13. Morrel M, Fraser VJ, Kollef MH. Delaying the empiric treatment of *Candida* bloodstream infection until positive blood culture results are obtained: a potential risk factor for hospital mortality. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005; 49 (9): 3640–5.
14. Von Eiff M, Roos N, Schulten R, et al. Pulmonary aspergillosis: early diagnosis improves survival. *Respiration*. 1995; 62 (6): 341–7.
15. De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP, et al. Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organisation for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. *Clin Infect Dis*. 2008; 46 (12): 1813–21.
16. Masouka J. Surface glycans of *Candida albicans* and other pathogenic fungi: physiological roles, clinical uses, and experimental challenges. *Clin Microbiol Rev*. 2004; 17 (2): 281–310.
17. Figueiredo RT, Carneiro LAM and Bozza T. Fungal surface and innate immune recognition of filamentous fungi. *Front Microbiol*. 2011; 2: 248.
18. Leitao EA, Bittencourt VC, Haido RM, et al. Beta-galactofuranose-containing O-linked oligosaccharides present in the cell wall peptidogalactomannan of *Aspergillus fumigatus* contain immunodominant epitopes. *Glycobiology*. 2003; 13 (10): 681–92.
19. De Vlioger G, Lagrou K, Maertens J, et al. Beta-D-glucan detection as a diagnostic test for invasive aspergillosis in immunocompromised critically ill patients with symptoms of respiratory infection: an autopsy-based study. *J Clin Microbiol*. 2011; 49 (11): 3783–7.
20. Van Spruiel AB, van den Herik-Oudijk IE, van Sorge NM, et al. Effective phagocytosis and killing of *Candida albicans* via targeting FcγRI (CD64) or FcαRI (CD89) on neutrophils. *J Infect Dis*. 1999; 179 (3): 661–9.
21. De Repentigny L. Serodiagnosis of Candidiasis, Aspergillosis and Cryptococcosis. *Clin Infect Dis*. 1992; 14 (Suppl 1): S11–22.
22. Miyazaki T, Kohno S, Mitsutake K, et al. Plasma (1,3)-β-D-glucan and fungal antigenemia in patients with Candidemia, Aspergillosis, and Cryptococcosis. *J Clin Microbiol*. 1995; 33 (12): 3115–8.
23. Tissot F, Lamoth F, Hauser PM, et al. β-glucan antigenemia anticipates diagnosis of blood culture-negative intraabdominal candidiasis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013; 188 (9): 1100–9.
24. Jaijakul S, Vazquez JA, Swanson RN, et al. (1,3)-β-D-glucan as a prognostic marker of treatment response in invasive candidiasis. *Clin Infect Dis*. 2012; 55 (4): 521–6.
25. Karageorgopoulos DE, Vouloumanou EK, Ntziora F, et al. β-D-glucan assay for the diagnosis of invasive fungal infections: a meta-analysis. *Clin Infect Dis*. 2011; 52 (6): 750–70.
26. Hou TY, Wang SH, Liang SX, et al. The screening performance of serum 1,3-beta-D-glucan in patients with invasive fungal diseases: A meta-analysis of prospective cohort studies. *PLoS ONE*. 2015; 10 (7): e0131602.
27. He S, Hang JP, Zhang L, et al. A systematic review and meta-analysis of diagnostic accuracy of serum 1,3-β-D-glucan for invasive fungal infection: focus on cutoff levels. *J Microbiol Immunol Infect*. 2015; 48 (4): 351–61.
28. Racil Z, Kocmanova I, Weinbergerova B, et al. Detection of 1,3-β-D-glucan for diagnosis of invasive fungal infections in hematological patients: usefulness for screening of invasive mycosis and for confirmation of galactomannan positive results. *Klin Mikrobiol Infekc Lek*. 2009; 15 (2): 48–57.
29. Pappas PG, Kauffman CA, Andes DR, et al. Clinical practice guideline for the management of candidiasis: 2016 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2016; 62 (4): e1–50.
30. Mennink-Kersten M, Ruegebrink D, Verweij PE. *Pseudomonas aeruginosa* as a cause of 1,3-β-D-glucan assay reactivity. *Clin Infect Dis*. 2008; 46 (12): 1930–1.
31. Shabaan AE, Elbaz LM, El-Emshaty WM, et al. Role of serum 1,3-β-D-glucan assay in early diagnosis of invasive fungal infections in a neonatal intensive care unit. *J Pediatr (Rio J)*. 2017. pii S0021-7557(17)30358-3
32. Albert O, Toubas D, Strady C, et al. Reactivity of (1,3)-β-D-glucan assay in bacterial bloodstream infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2011; 30 (11): 1453–60.
33. Mikulska M, Furfaro E, Del Bono V, et al. (1,3)-β-D-glucan in cerebrospinal fluid is useful for the diagnosis of central nervous system fungal infections. *Clin Infect Dis*. 2013; 56 (10): 1511–2.
34. Shi X, Liu Y, Gu X, et al. Diagnostic value of (1,3)-β-D-glucan in bronchoalveolar lavage fluid for invasive fungal disease: a meta-analysis. *Respir Med*. 2016; 117: 48–53.

35. Held J, Koch MS, Reischl U, et al. Serum (1,3)- β -D-glucan measurement as an early indicator of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia and evaluation of its prognostic value. *Clin Microbiol Infect.* 2011; 17 (4): 595–602.
36. Sendid B, Poirot JL, Tabouret M, et al. Combined detection of mannanaemia and anti-mannan antibodies as a strategy for the diagnosis of systemic infection caused by pathogenic *Candida* species. *J Med Microbiol.* 2002; 51 (5): 433–42.
37. Mikulska M, Calandra T, Sanguinetti M, et al. The use of mannan antigen and anti-mannan antibodies in the diagnosis of invasive candidiasis: recommendations from the Third European Conference on Infections in Leukemia. *Crit Care.* 2010; 14 (6): R222.
38. Arendrup MC, Bergmann OJ, Larsson L, et al. Detection of candidemia in patients with and without underlying haematological disease. *Clin Microbiol Infect.* 2010; 16 (7): 855–62.
39. Lewis RE, Kontoyiannis DP. Invasive aspergillosis in glucocorticoid-treated patients. *Med Mycol.* 2009; 47 Suppl 1: S271–S81.
40. Pfeiffer CD, Fine JP, Safdar N. Diagnosis of invasive aspergillosis using a galactomannan assay: a meta-analysis. *Clin Infect Dis.* 2006; 42 (10): 1417–27.
41. Lahmer T, Neuenhahn M, Held J, et al. Comparison of 1,3- β -D-glucan with galactomannan in serum and bronchoalveolar fluid for the detection of *Aspergillus* species in immunosuppressed mechanically ventilated critically ill patients. *J Crit Care.* 2016; 36: 259–64.
42. Zhuang Q, Ma H, Zhang Y, et al. Galactomannan in bronchoalveolar lavage fluid for diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis with nonneutropenic patients. *Can Respir J.* 2017; 2017: 3685261.
43. Cordonnier C, Botterel F, Ben Amor R, et al. Correlation between galactomannan antigen levels in serum and neutrophil counts in haematological patients with invasive aspergillosis. *Clin Microbiol Infect.* 2009; 15 (1): 81–6.
44. Kedzierska A, Kochan P, Pietrzyk A, et al. Current status of fungal cell wall components in the immunodiagnosis of invasive fungal infections in humans: galactomannan, mannan and 1,3- β -D-glucan antigens. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2007; 26 (11): 755–66.
45. Cordonnier C, Pautas C, Maury S, et al. Empirical versus preemptive antifungal therapy for high risk, febrile, neutropenic patients: a randomized, controlled trial. *Clin Infect Dis.* 2009; 48 (8): 1042–51.

Prispelo: 15. 5. 2018

Marina Praprotnik¹, Ana Kotnik Pirš², Aleksandra Zver³, Malena Aldeco⁴, Dušanka Lepej⁵, Uroš Krivec⁶

Glivne okužbe pri cistični fibrozi

Fungal Infections in Cystic Fibrosis

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: cistična fibroza, glive, *Aspergillus fumigatus*, klinični spekter, pljučna funkcija

Pri velikem številu bolnikov s cistično fibrozo se v kužninah iz dihal poleg bakterij nahajajo tudi glive. Pri glivi *Aspergillus fumigatus*, ki jo najpogosteje osamijo iz kužnih dihal bolnikov s cistično fibrozo, gre za klinični spekter, ki sega od kolonizacije, senzibilizacije, aspergilusnega bronhitisa do alergijske bronhopulmonalne aspergiloze. Kolonizacija pomeni prisotnost mikroorganizma brez kliničnih simptomov ali imunološkega odziva, pri senzibilizaciji pa so povišane vrednosti specifičnih imunoglobulinov E na alergene *A. fumigatus*. Alergijska bronhopulmonalna aspergiloza je najbolj znana in najbolj opredeljena aspergilusna klinična entiteta pri cistični fibrozi z natančno postavljenimi diagnostičnimi merili. Aspergilusni bronhitis je novo opisana kronična bolezen spodnjih dihalnih poti, z dokazom plesni *A. fumigatus* iz izmečka bodisi z verižno reakcijo s polimerazo ali kulturo ter s prisotnostjo imunoglobulinov G proti *A. fumigatus*.

ABSTRACT

KEY WORDS: cystic fibrosis, fungi, *Aspergillus fumigatus*, clinical spectrum, lung function

Beside bacteria, fungi are commonly found in the respiratory secretions of many patients with cystic fibrosis. *Aspergillus fumigatus* is the most commonly isolated fungus from the sputum. Recently, classification criteria for the spectrum of cystic fibrosis *Aspergillus* disease were described and consist of colonization, sensitization, allergic bronchopulmonary aspergillosis, and aspergillus bronchitis. Colonization implies the presence of a microorganism which provokes neither symptoms nor immunologic response. Sensitization refers to elevated immunoglobulins E to *A. fumigatus*. Allergic bronchopulmonary aspergillosis is the most well-known amongst *Aspergillus* clinical spectrum entities with the most precisely established diagnostic criteria. *Aspergillus* bronchitis is a recently

¹ Mag. Marina Praprotnik, dr. med., Služba za pljučne bolezni, Pediatrična klinika, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Zaloška cesta 2, 1000 Ljubljana; marina.praprotnik@kclj.si

² Asist. dr. Ana Kotnik Pirš, dr. med., Služba za pljučne bolezni, Pediatrična klinika, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Zaloška cesta 2, 1000 Ljubljana

³ Aleksandra Zver, dr. med., Služba za pljučne bolezni, Pediatrična klinika, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Zaloška cesta 2, 1000 Ljubljana

⁴ Malena Aldeco, dr. med., Služba za pljučne bolezni, Pediatrična klinika, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Zaloška cesta 2, 1000 Ljubljana

⁵ Dušanka Lepej, dr. med., Služba za pljučne bolezni, Pediatrična klinika, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Zaloška cesta 2, 1000 Ljubljana

⁶ Uroš Krivec, dr. med., Služba za pljučne bolezni, Pediatrična klinika, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Zaloška cesta 2, 1000 Ljubljana

described chronic lower airway disease with detection of *A. fumigatus* in the sputum by culture or polymerase chain reaction and detection of *Aspergillus*-specific immunoglobulin G antibodies.

UVOD

Cistična fibroza (CF) je najpogostejša avtosomno recesivna kronična pljučna bolezen pri belcih, ki pomembno skrajša življenjsko dobo. Je večorganska bolezen, ki prizadene predvsem dihala in prebavila. Ocenjujejo, da ima CF 70.000 ljudi po vsem svetu (1).

Nastane kot posledica okvare kloridnega kanalčka – regulatorja transmembranske prevodnosti pri cistični fibrozi (angl. *cystic fibrosis transmembrane regulator*, CFTR), ki se nahaja na površini epitelijskih celic različnih organov (2).

Okvara omenjenega kanalčka povzroča nastanek goste viskozne sluzi in oslabi mukociliarno čiščenje. To olajša zadrževanje bakterij, kot so *Staphylococcus aureus* in *Haemophilus influenzae* pri mlajših ter *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Achromobacter xylosoxidans* in *Burkholderia cepacia* pri večjih otrocih in mladostnikih (3).

Zaradi boljšega razumevanja kronične okužbe ter napredka v zdravljenju z antibiotiki, nadomestki pankreatičnih encimov, podpornega prehranskega zdravljenja in celovite obravnave v centrih za CF se je pričakovana življenjska doba ljudi s CF v zadnjih nekaj desetletjih močno podaljšala (4, 5).

GLIVE PRI CISTIČNI FIBROZI

Pri velikem številu bolnikov s CF v kužninah iz dihal poleg bakterij pogosto osamijo tudi glive. Kljub temu da so bakterije najpogostejši vzrok okužb, pa raziskave kažejo, da so tudi glive pomemben vzrok poslabšanja pri CF. Prisotnost in raznovrstnost gliv v kužninah iz dihal se je v zadnjih letih pomembno povečala (6).

Razen gliv *A. fumigatus* in *Aspergillus terreus* iz vzorcev dihal bolnikov s cistično

fibrozo pogosto osamimo tudi *Scedosporium* spp., *Exophiala dermatitidis*, *Rasamsonia argillacea* ter *Candida albicans* in *Candida glabrata* (7–9).

Vzrok za povečanje števila osamitev gliv iz različnih kužnin iz dihal bolnikov s CF (izmeček, globoki aspirat žrela, bronhoalveolarni izpirek) ni povsem jasen. Eden pomembnejših je gotovo uvedba občutljivejših tehnik osamitve gliv iz kužnin, na strani gostitelja pa zelo razširjena uporaba antibiotikov in podaljšanje življenjske dobe (10, 11). Osamitev gliv je še vedno podcenjena, ker v večini centrov ne uporabljajo selektivnih gojišč za glive, temveč standardna bakterijska gojišča (7).

ASPERGILLUS FUMIGATUS PRI CISTIČNI FIBROZI

Kljub temu da glive (tako plesni kot kvasovke) pogosto osamimo iz kužnin dihal bolnikov s CF, njihov vpliv na pljučno funkcijo in poslabšanja pljučne bolezni ni povsem jasen (12).

Največ raziskav o vlogi gliv pri CF je osredotočenih na *A. fumigatus*, ki ga najpogosteje osamimo. Prevalenca *A. fumigatus* v izmečku bolnikov s CF je 6–57 %, odvisno od preiskovane skupine in laboratorijskih tehnik osamitve (13). Tudi vloga *A. fumigatus* v patogenezi drugih kliničnih stanj pri bolnikih s CF razen alergijske bronhopulmonalne aspergiloze (ABPA) še ni dovolj znana.

V zadnjih letih je v literaturi vse več podatkov o tem, da je okužba z *A. fumigatus* klinični spekter, kontinuum. Na temelju seroloških podatkov (celokupni imunoglobulini (Ig) E, specifični IgE in IgG na *A. fumigatus*) ter biooznačevalcev v izmečku (verižna reakcija s polimerazo v realnem

času (angl. *reverse transcription-polimerase chain reaction*, RT-PCR) in galaktomananski antigen) so razvili klasifikacijski sistem aspergiloze pri CF (14).

DIAGNOSTIKA ASPERGILLUS FUMIGATUS

Klasične metode, temelječe na kulturi

Pomanjkljivost te metode je, da je rezultat odvisen od številnih dejavnikov, zlasti od načina jemanja vzorca, transporta, načina in trajanja gojenja.

Molekularne metode

Zelo občutljiva je metoda z uporabo verižne reakcije s polimerazo (angl. *polymerase chain reaction*, PCR), njena pomanjkljivost pa je, da zazna DNA tako aktivnih rastočih hif kot tudi inaktivnih spor.

Biooznačevalci

Test z dokazom galaktomanana v izmečku: galaktomanan je sestavina celične stene *A. fumigatus*. Sprošča se samo pri rastočih hifah, ne pa pri sporah, ki le kolonizirajo dihalne poti. Pri tem testu moramo biti previdni pri njegovi razlagi, saj je lahko lažno pozitiven pri bolnikih, ki prejemajo parenteralne betalaktamske antibiotike.

KOLONIZACIJA

Kolonizacija pomeni prisotnost mikroorganizma brez kliničnih simptomov ali imunološkega odziva (serološko negativno stanje). Vsekakor pa je kolonizacija vir za morebiten razrast mikroorganizmov in okužbo.

Prevalenca kolonizacije z *A. fumigatus* pri bolnikih s CF je 10–57 %. Poveča se pri starejših bolnikih in pri tistih s slabšo pljučno funkcijo. Velike razlike pa so tudi posledica različnih opredelitev kolonizacije in razlik pri jemanju kužnin, transportu in laboratorijski obdelavi (15, 16). Pomen kolonizacije na pljučno funkcijo in število poslabšanj ni znan. Velika kanadska raziskava je denimo pokazala, da so imeli bolniki

s CF, pri katerih so v dveh ali več vzorcih dihal v enem letu osamili *A. fumigatus*, slabšo pljučno funkcijo in več pljučnih poslabšanj, pri katerih je bila potrebna hospitalizacija, dodatne analize te raziskave in druge raziskave pa tega niso potrdile (15, 17).

Za zdaj ni znano, katera obravnava kolonizacije z *A. fumigatus* je najboljša, saj na voljo ni dovolj podatkov (18).

SENZIBILIZACIJA

Pri senzibilizaciji gre za prisotnost povišanih vrednosti specifičnih IgE na alergene *A. fumigatus*, torej serološko dokazano preobčutljivost na *A. fumigatus*, a brez kliničnega poslabšanja. Ker so povišani le specifični IgE proti *A. fumigatus*, ne pa tudi specifični IgG in celokupni IgE, kar je značilno za »serološko« ABPA, to dokazuje, da gre za različna patofiziološka procesa (tabela 1).

Na splošno velja, da kolonizacija in senzibilizacija ne povzročata kliničnih simptomov oz. poslabšanj. Vsekakor pa je pri bolnikih s CF, zlasti pri tistih z napredovalo boleznijo, slabo pljučno funkcijo in pogostimi poslabšanji, težko oceniti, kdaj ti izolati vplivajo na poslabšanje oz. prispevajo k napredovanju bolezni (18).

Pri odraslih bolnikih s CF, ki so bili kolonizirani z *A. fumigatus*, se forsirani izdih v eni sekundi (angl. *forced expiratory volume in one second*, FEV1) ni razlikoval od tistih, ki niso bili kolonizirani ($p = 0,41$). Po drugi strani pa so ugotavljali pomembno višji upad FEV1 ($p = 0,03$) in večje število dni, ko je bilo potrebno parenteralno antibiotično zdravljenje ($p = 0,03$), pri tistih, ki so bili senzibilizirani z *A. fumigatus* (19).

ALERGIJSKA BRONHOPULMONALNA ASPERGILOZA

Najbolj znana in najboljše opredeljena aspergilusna klinična entiteta pri CF je ABPA, ki je posledica preobčutljivosti na antigene v steni *A. fumigatus*, posredovane s celicami T

pomagalkami 2 (18). Metaanaliza je pokazala, da je prevalenca ABPA 8,9 % in je višja pri odraslih kot pri otrocih (20). Diagnozo je kljub opisanim diagnostičnim merilom pogosto težko postaviti, saj klinični, radiološki, mikrobiološki in imunološki kazalci niso specifični za ABPA in se lahko prekrivajo s poslabšanjem zaradi bakterijskih povzročiteljev (21). V nedavno objavljeni raziskavi, v katero so bili vključeni otroci in mladostniki s CF iz Registra bolnikov Evropskega združenja za cistično fibrozo, so proučevali vpliv ABPA na FEV1. V nasprotju s splošno sprejetim prepričanjem so ugotovili, da je bila razlika v FEV1 med tistimi, ki imajo ABPA (n = 346), in tistimi, ki je nimajo (n = 2.806), le neznatna (p > 0,05) (22).

Merila za alergijsko bronhopulmonalno aspergilozo

Klinična merila

Klinična merila za opredelitev ABPA so piskanje, stiskanje in bolečina v prsih, ki jih ne moremo pripisati drugim vzrokom, vročina in slabo počutje, ki ju jemanje antibiotika ne izboljša, ter gost izmeček z rjavkastimi ali črnimi čepki

Laboratorijska merila

Laboratorijska merila za diagnozo ABPA delimo na velika in mala (18, 20, 23):

- Velika: nove pljučne zgostitve na RTG pljuč, povišane vrednosti celokupnih IgE (> 1.000 kU/l), specifičnih IgE in IgG na *A. fumigatus*, eozinofilija, pozitivni vbodni testi na antigen *A. fumigatus*, reverzibilna bronhokonstrikcija ter centralne bronhiektazije na RTG pljuč.
- Mala: pozitivna kultura na *A. fumigatus* (le v 30 %), rjavi ali črni čepki v izmečku, pozna kožna reakcija.

Zdravljenje ABPA poteka s sistemskimi glukokortikoidi, ki zmanjšajo vnetje in vplivajo na imunski odziv, ter protiglivnimi zdravili. V novejših raziskavah opisuje-

jo tudi vlogo omalizumaba pri zdravljenju ABPA, predvsem kot zdravilo, ki varčuje s sistemskimi glukokortikoidi, vendar so podatki skopi in tudi naše lastne izkušnje ne potrjujejo pomembne klinične učinkovitosti (24).

ASPERGILUSNI BRONHITIS

Prvič so ga opisali Shoseyev in sodelavci leta 2006 pri skupini odraslih bolnikov s CF, ki so imeli vztrajajoče težave kljub dolgotrajnemu zdravljenju z antibiotiki. Pri njih so večkrat zapored osamili *A. fumigatus*, nadaljnje klinično slabšanje pa je preprečilo šele zdravljenje s protiglivnimi zdravili (25). Baxterjeva in sodelavci so ugotovili, da ima aspergilusni bronhitis 30 % njihovih odraslih bolnikov s CF (14). Nedavno je Chrdele opisal aspergilusni bronhitis kot simptomatsko kronično bolezen spodnjih dihalnih poti z dokazom *A. fumigatus* iz izmečka, s pozitivno RT-PCR ali kulturo ter s prisotnostjo IgG proti *A. fumigatus* (tabela 1) (26).

Uvedba te entitete je omogočila klinično razlikovanje med asimptomatsko kolonizacijo, z IgE posredovano senzibilizacijo ter ABPA in tako postavila temelje za uvedbo protiglivnega zdravljenja (18).

ZAKLJUČEK

Glavni cilj zdravljenja CF je čim bolj zmanjšati upad pljučne funkcije, zato je treba opredeliti vse možne dejavnike, tudi okužbo z glivami, in proučiti njihov vpliv nanjo. Glive pogosto osamimo iz izmečka in drugih kužnin bolnikov s CF, najpogostejše *A. fumigatus*. Novejša razvrstitev v štiri imunološke razrede omogoča proučevanje dolgoročnega učinka *A. fumigatus* na klinični potek CF in zdravljenja različnih entitet, kot so senzibilizacija, ABPA in aspergilusni bronhitis.

Za zdaj je z dokazi podprto le zdravljenje ABPA in aspergilusnega bronhitisa, glede obravnave kolonizacije in senzibilizacije pa podatki niso tako enoznačni.

Tabela 1. Klasifikacijska merila za spekter aspergillusne bolezni pri cistični fibrozi. ABPA – alergijska bronhopulmonalna aspergiloza, Ig – imunoglobulin, RT-PCR – verižna reakcija s polimerazo v realnem času (angl. *reverse transcription-polymerase chain reaction*).

	Kolonizacija	Serološka ABPA	Senzibilizacija	Aspergillusni bronhitis
Koncentracija specifičnih IgG proti <i>Aspergillus fumigatus</i>	normalna	povišana ^a	normalna	povišana ^a
Koncentracija specifičnih IgE proti <i>Aspergillus fumigatus</i>	normalna	povišana ^b	povišana ^b	normalna
Koncentracija celokupnih IgE	normalna	povišana	povišana	normalna
<i>Aspergillus</i> RT-PCR	+/-	pozitivna	+/-	pozitivna
Galaktomananski test v sputumu	negativen	pozitiven	negativen	pozitiven

^a povišani specifični IgG (> 75 kU/l)

^b povišani specifični IgE (> 3,7 kU/l)

LITERATURA

- Rowe SM, Miller S, Sorscher EJ. Cystic fibrosis. *N Engl J Med*. 2005; 352 (19): 1992–2001.
- Callebaut I, Chong PA, Forman-Kay JD. CFTR structure. *J Cyst Fibros*. 2018; 17 (25): S5–8.
- Salsgiver EL, Fink AK, Knapp EA, et al. Changing epidemiology of the respiratory bacteriology of patients with cystic fibrosis. *Chest*. 2016; 149 (2): 390–400.
- MacKenzie T, Gifford AH, Sabadosa KA, et al. Longevity of patients with cystic fibrosis in 2000 to 2010 and beyond: survival analysis of the Cystic Fibrosis Foundation patient registry. *Ann Intern Med*. 2014; 161 (4): 233–41.
- Cystic Fibrosis Foundation. Patient Registry Annual Data Report 2015. Bethesda: Cystic Fibrosis Foundation; 2016.
- Schwarz C, Hartl D, Eickmeier O, et al. Progress in definition, prevention and treatment of fungal infections in cystic fibrosis. *Mycopathologia*. 2018; 183 (1): 21–32.
- Hong G, Miller HB, Allgood S, et al. Use of selective fungal culture media increases rates of detection of fungi in the respiratory tract of cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol*. 2017; 55 (4): 1122–30.
- Nagano YMB, Millar BC, Johnson E, et al. Fungal infections in patients with cystic fibrosis. *Rev Med Microbiol*. 2007; 18 (1): 11–16.
- Sudfeld CR, Dasenbrook EC, Merz WG, et al. Prevalence and risk factors for recovery of filamentous fungi in individuals with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*. 2010; 9 (2): 110–6.
- Middleton PG, Chen SC, Meyer W. Fungal infections and treatment in cystic fibrosis. *Curr Opin Pulm Med*. 2013; 19 (6): 670–5.
- Tomazin R, Matos T. Glivne okužbe pri bolnikih s cistično fibrozo. *Zdrav Vestn*. 2017; 86 (1–2): 42–52.
- Armstead J, Morris J, Denning DW. Multi-country estimate of different manifestations of aspergillosis in cystic fibrosis. *PLoS One*. 2014; 9 (6): e98502.
- Masoud-Landgraf L, Badura A, Eber E, et al. Modified culture method detects a high diversity of fungal species in cystic fibrosis patients. *Med Mycol*. 2014; 52 (2): 179–86.
- Baxter CG, Dunn G, Jones AM, et al. Novel immunologic classification of aspergillosis in adult cystic fibrosis. *J Allergy Clin Immunol*. 2013; 132 (3): 560–6.

15. De Vrankrijker AM, van der Ent CK, van Berkhout FT, et al. *Aspergillus fumigatus* colonization in cystic fibrosis: implications for lung function? Clin Microbiol Infect. 2011; 17 (9): 1381–6.
16. Borman AM, Palmer MD, Delhaes L, et al. Lack of standardization in the procedures for mycological examination of sputum samples from CF patients: a possible cause for variations in the prevalence of filamentous fungi. Med Mycol. 2010; 48 (1): S88–97.
17. Amin R, Dupuis A, Aaron SD, et al. The effect of chronic infection with *Aspergillus fumigatus* on lung function and hospitalization in patients with cystic fibrosis. Chest. 2010; 137 (1): 171–6.
18. Felton IC, Simmonds NJ. *Aspergillus* and cystic fibrosis: old disease – new classifications. Curr Opin Pulm Med. 2014; 20 (6): 632–8.
19. Baxter CG, Moore CB, Jones AM, et al. IgE-mediated immune responses and airway detection of *Aspergillus* and *Candida* in adult cystic fibrosis. Chest. 2013 May; 143 (5): 1351–7.
20. Maturu VN, Agarwal R. Prevalence of *Aspergillus* sensitization and allergic bronchopulmonary aspergillosis in cystic fibrosis: systematic review and meta-analysis. Clin Exp Allergy. 2015; 45 (12): 1765–78.
21. Janahi IA, Rehman A, Al-Naimi AR. Allergic bronchopulmonary aspergillosis in patients with cystic fibrosis. Ann Thorac Med. 2017; 12 (2): 74–82.
22. Kaditis AG, Miligkos M, Bossi A, et al. Effect of allergic bronchopulmonary aspergillosis on FEV1 in children and adolescents with cystic fibrosis: a European Cystic Fibrosis Society Patient Registry analysis. Arch Dis Child. 2017; 102 (8): 742–7.
23. King J, Brunel SF, Warris A. *Aspergillus* infections in cystic fibrosis. J Infect. 2016; 72 (5): S50–5.
24. Jat KR, Walia DK, Khairwa A. Anti-IgE therapy for allergic bronchopulmonary aspergillosis in people with cystic fibrosis. Cochrane Database Syst Rev. 2015; 4 (11): CD010288.
25. Shoseyov D, Brownlee KG, Conway SP, et al. *Aspergillus* bronchitis in cystic fibrosis. Chest. 2006; 130 (1): 222–6.
26. Chrdele A, Mustakim S, Bright-Thomas RJ, et al. *Aspergillus* bronchitis without significant immunocompromise. Ann N Y Acad Sci. 2012; 1272: 73–85.

Tadeja Kotar¹, Jasna Černoša²

Endemske mikoze včeraj, danes, jutri

Endemic Mycoses Yesterday, Today and Tomorrow

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: endemske glive, popotniki, imunska pomanjkljivost

Z izrazom endemske mikoze opisujemo glivične okužbe, ki so prisotne le v določenih, geografsko zelo omejenih predelih sveta. Najpomembnejši povzročitelji endemskih mikoz so *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis* in *Paracoccidioides brasiliensis*. Endemske mikoze so pomemben vzrok obolevnosti in umrljivosti pri bolnikih z oslabljenim imunskim odzivom. Z naraščanjem števila teh bolnikov pričakujemo porast števila obolelih. Zbolijo lahko tudi zdrave osebe z normalnim imunskim odzivom. V Sloveniji se srečujemo z endemskimi mikozami predvsem pri popotnikih, najpogostejša je okužba s *H. capsulatum*. Endemske mikoze postajajo vedno bolj prepoznavne zaradi izboljšane diagnostike, porasta popotnikov in števila ljudi, ki imajo večje tveganje za hud potek okužbe z endemskimi glivami. Na razširjenost vplivajo tudi podnebne spremembe, širjenje prostora za bivanje, večja možnost potovanja in selitve ljudi.

ABSTRACT

KEY WORDS: endemic mycoses, traveler, immunocompromised

The term endemic mycoses describes fungal infections, which are present in very limited geographical areas around the world. The most important causative agent of endemic mycoses are *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, and *Paracoccidioides brasiliensis*. Endemic mycoses are an important cause of morbidity and mortality in immunosuppressed patients. With rising numbers of such individuals, we also expect more patients with endemic mycoses. In Slovenia, endemic mycoses are travel-related. The most important causative agent found in Slovenian travelers is *H. capsulatum*. Due to improvement of diagnostics and rising numbers of patients at high risk for severe disseminated disease, the endemic mycoses are increasingly recognized. Important factors in greater recognition of endemic mycoses are also climate change, accessibility of travel, and migrations.

¹ Asist. mag. Tadeja Kotar, dr. med., Klinika za infekcijske bolezni in vročinska stanja, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Japljeva ulica 2, 1525 Ljubljana; tadeja.kotar@kclj.si

² Jasna Černoša, dr. med., Klinika za infekcijske bolezni in vročinska stanja, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Japljeva ulica 2, 1000 Ljubljana

UVOD

Najpomembnejši povzročitelji endemskih mikoz so *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis* in *Paracoccidioides brasiliensis* (1).

Endemske mikoze najdemo na omejenih geografskih področjih, njihova naravna ekološka niša pa je večinoma prst (1). V Evropi so opisani le posamezni avtohtoni primeri bolezni. V Sloveniji se srečujemo z endemskimi mikozami predvsem pri popotnikih, najpogostejša je okužba s *H. capsulatum*.

Endemske mikoze so pomemben vzrok bolehnosti in umrljivosti pri bolnikih z oslabljenim imunskim odzivom. Z naraščanjem števila takih bolnikov pričakujemo tudi porast števila obolelih, saj z dostopnostjo do medicinske oskrbe vedno več ljudi te populacije potuje tudi v predele, kjer so prisotne endemske glive. Bolniki s hudo imunsko pomanjkljivostjo imajo lahko neznačilno klinično sliko, bolezen ima hujši, lahko tudi razsejan potek, zato moramo pri naših bolnikih diferencialno diagnostično misliti tudi na endemske mikoze. Za endemskimi mikozami zbolijo tudi zdrave osebe z normalnim imunskim odgovorom, vendar je klinična oblika navadno blažja in zdravljenje ni vedno potrebno (1).

ENDEMSKE MIKOZE VČERAJ

Endemske mikoze so prvič zbudile pozornost leta 1945 v ZDA, ko so v Tennesseeju ugotovili, da je lahko vzrok za na videz tuberkulozne spremembe na RTG pljuč ob negativnem tuberkulinskem testu v resnici okužba s *H. capsulatum*. To je vodilo v ponovno diagnostiko številnih primerov tuberkuloze, pri katerih je bila diagnoza postavljena samo na podlagi RTG pljuč. Sledile so dodatne epidemiološke raziskave, ki so podrobneje opredelile lastnosti teh okužb in razširjenost njihovih patogenov v okolju (2).

Z izrazom endemske mikoze označujejo mo skupino glivnih okužb, ki se pojavljajo

v določenih klimatskih področjih sveta, ti pa so nam večinoma bolj oddaljeni. Najpogostejši ter najbolj znani endemski mikozi sta histoplazmoza (povzročena s *H. capsulatum* ali *H. dubosii*) ter kokcidioidomikoza (povzročena s *C. immitis* ali *C. posadasii*), v to skupino pa štejemo še parakokcidiomikozo, blastomikozo, sporotrihozo, peniciliozo in emonziozo. Za povzročitelje teh okužb velja, da gre večinoma za temperaturno dimorfne glive, kar pomeni, da v naravi pri temperaturi 25–30 °C rastejo v obliki plesni, po vdihu konidijev v pljuča pa se v gostitelju pri temperaturi okoli 37 °C preoblikujejo v obliko kvasovk (1).

Okužbe lahko povzročajo klinično izraženo bolezen tako pri osebah z oslabljenim imunskim odzivom kot pri posameznikih z ohranjenim imunskim odzivom. Pri okuženih osebah z normalno imunsko sposobnostjo se patogeni izločijo iz telesa s pomočjo makrofagov. Tako je okužba večinoma asimptomatska ali pa ima blag potek. Pri okuženih z okrnjeno imunostjo pa se patogeni ne izločijo iz telesa, ampak se še naprej razmnožujejo. To lahko vodi tudi v sistemski razsoj okužbe, pri kateri pride poleg prizadetosti pljuč še do prizadetosti drugih organov v telesu (3).

Geografsko najdemo povzročitelje kokcidioidomikoze v prsti zelo suhih območij Amerike, povzročitelji histoplazmoze se nahajo v prsti toplih in vlažnih predelov Amerike, o avtohtonih primerih histoplazmoze pa so poročali na vseh kontinentih, razen na Antarktiki. Širjenje histoplazmoze je povezano tudi z iztrebki ptičev ter netopirjev, ki so lahko nosilci glive *Histoplasma* spp. in jo tako širijo daleč od izvornega mesta (4).

Z epidemiološkimi raziskavami so ugotovili, da ima lokalno prebivalstvo endemskih področij na te glive prisotno določeno nizko stopnjo imunosti, zato pri njih okužba večinoma poteka asimptomatsko. Klinična bolezen se izrazi zlasti pri priseljencih na endemsko področje ter pri posamezni-

kih z oslabljenim imunskim sistemom. V preteklosti so prevladovali predvsem posamični primeri endemskih mikoz. Do večjih izbruhov kokcidioidomikoze je prišlo predvsem pri selitvah prebivalstva na endemsko področje ter ob naravnih nesrečah, ko je bilo okoljskim patogenom izpostavljeno večje število ljudi (2).

Do prvega večjega poročanega izbruha kokcidioidomikoze je prišlo med drugo svetovno vojno v Arizoni, ko je okužba pričela razsajati med 13.000 nemškimi zaporniki. Kljub temu da večina okuženih ni bila hudo prizadeta, so zapornike po smrti dveh izmed obolelih premestili na drugo lokacijo (5). Med letoma 1991 in 1993 je v Kaliforniji prišlo do velikega izbruha kokcidioidomikoze s skupno skoraj 10.000 zbolelimi v endemskih področjih Kalifornije. Takrat so ugotovili, da je glavni vzrok večanja števila okužb ter razsejanega poteka bolezni starajoče se prebivalstvo ter vedno višji delež oseb z oslabljenim imunskim odzivom (6).

Za razliko od kokcidiomikoze je do izbruhov histoplazmoze prišlo predvsem pri delavcih v gradbeništvu, rudnikih, jamah ter pri drugih aktivnostih, pri katerih so bili posamezniki izpostavljeni okuženim iztrebkom ptičev ter netopirjev. Med letoma 1938 ter 2013 je kar 105 poročil o izbruhih histoplazmoze. Do največjega izmed teh izbruhov je prišlo leta 1970, ko je imelo v Ohio histoplazmozo kar 383 srednješolcev, ki so se okužili ob čiščenju okolice šole ter odstranjevanju ptičjih iztrebkov (7). Leta 1997 je po koncertih na endemskih področjih Indiane zaradi histoplazmoznega perikarditisa skoraj umrl glasbenik Bob Dylan (8).

ENDEMSKE MIKOZE DANES

Zaradi vedno večjega števila popotnikov ter oseb z oslabljenim imunskim odzivom se dandanes vedno pogosteje srečujemo z endemskimi mikozami v vseh predelih sveta. Na razvoj ter potek teh okužb vplivajo

predvsem trije dejavniki: količina in virulenca povzročitelja ter imunološko stanje gostitelja.

Najpogostejši endemski mikoz, ki se pojavljata pri popotnikih, sta histoplazmoza ter kokcidioidomikoza. Do večjih izbruhov histoplazmoze je prišlo zlasti pri popotnikih, ki so obiskali ter raziskovali z netopirji naseljene jame Srednje ter Južne Amerike, v zadnjih letih pa obstajajo poročila o nekaj avtohtonih primerih histoplazmoze v Turčiji, Nemčiji ter Italiji, kjer naj bi glivo *Histoplasma* spp. osamili iz prsti ob reki Pad (9).

Pri popotnikih, ki zbolijo z akutno obliko histoplazmoze, se ta po navadi kaže z visoko vročino, mrzlico, bolečinami v mišicah, glavobolom, suhim kašljem, plevritično bolečino v prsih ter utrujenostjo. Na RTG pljuč so vidni retikuloendeoteljski infiltrati ter medpljučna limfadenopatija. Simptomi se po navadi pojavijo od teden do tri tedne po izpostavitvi in večina posameznikov okreva spontano v nekaj tednih, čeprav lahko utrujenost traja dlje časa (9).

Pri majhnem deležu bolnikov se iz akutne pljučne histoplazmoze razvije resna pljučnica, ki lahko vodi v akutni respiratorni distressni sindrom (angl. *acute respiratory distress syndrom*, ARDS). Do tega najpogosteje pride pri bolnikih s hudo motnjo imunskega odziva ali pa pri tistih, ki so bili izpostavljeni veliki količini povzročitelja (10).

Kronična pljučna histoplazmoza s tvorbo kavitacij v pljučih se skoraj vedno pojavi pri starejših posameznikih s kronično obstruktivno pljučno boleznijo (KOPB) in klinično posnema reaktivacijo tuberkuloze. Kaže se z vročino, utrujenostjo, pomanjkanjem apetita, izgubo teže, produktivnim kašljem z gnojnim izmečkom ter izkašljevanjem krvi iz pljuč ali dihalnih poti. Na RTG lahko vidimo enostranske ali obojestranske infiltrate v zgornjih režnjih ter kavitacije in fibrozo v spodnjih pljučnih poljih (10).

Razsejana histoplazmoza je redkejša, do katerega pride predvsem pri osebah z oslabiljenim imunskim sistemom. Nastane zaradi razširitve okužbe po krvi, najpogosteje v trebušno slinavko, jetra, vranico ali črevo. Redko lahko pride tudi do prizadetosti ovojnic osrednjega živčevja ter kože. V 10–20 % primerov razsejane histoplazmoze se razvije klinična slika septičnega šoka z vročino, nizkim krvnim tlakom, ledvično in dihalno odpovedjo ter diseminirano intravaskularno koagulacijo. Pomembno je vedeti, da se lahko z glivo *H. capsulatum* okužimo večkrat, ob vsaki okužbi se inkubacijska doba skrajša (10, 11).

Povzročitelja histoplazmoze lahko dokažemo neposredno v kužninah z neposrednim mikroskopskim pregledom ali gojenjem na kulturi, ki pa je dolgotrajno. Pri dokazu glive *Histoplasma* spp. si lahko pomagamo tudi s serološkimi testi ali dokazom antigenov v seču, krvi, možgansko-hrbtenjačni tekočini ali bronhoalveolarnem izpirku (1, 11).

Večina bolnikov z akutno histoplazmozo ima bolezen, ki mine sama od sebe in ne potrebuje protiglivnega zdravljenja. Bolnike z blago ali srednje težko pljučno histoplazmozo zdravimo z itraconazolom, bolnike s hudimi oblikami pljučne histoplazmoze pa najprej zdravimo z amfotericinom B, po nekaj tednih zdravljenja pa nadaljujemo z itraconazolom (4).

Pri približno 40 % oseb, okuženih s *C. immitis*, se razvije bolezen, običajno od teden do tri tedne po izpostavitvi. Večina okuženih nima simptomov, pri nekaterih pa pride do vročine, glavobola, bolečin v mišicah, suhega kašlja, izgube teže ter šibkosti. Pogosto pride tudi do pojava nodoznega eritema na koži. Na endemskih področjih povzroča kokcidioidomikoza 20–25 % vseh doma pridobljenih pljučnic (9).

Pri imunsko oslabilih bolnikih in osebah, izpostavljenih večji količini povzročitelja, lahko pride do razvoja resne pljučnice

z retikulonodularnimi infiltrati, ki lahko vodi v ARDS (10, 11).

Pri starejših posameznikih s KOPB ali sladkorno boleznijo lahko pride do kronične napredujoče pljučnice s tvorbo kavitacij v pljučih ter pljučno fibrozo (10).

Pri manj kot enem odstotku bolnikov s simptomatsko kokcidioidomikozo bo prišlo do razsejane okužbe. Za razliko od histoplazmoze postanejo posamezniki po preboleli kokcidioidomikozi imuni na ponovno okužbo s *C. immitis* (10).

Diagnozo postavimo na podlagi neposrednega dokaza povzročitelja v preparatu tkiva z mikroskopom, lahko ga dokažemo tudi z gojenjem na kulturi ali posredno s serološkimi metodami (1, 11).

Večina bolnikov z akutno pljučno kokcidioidomikozo ima blag potek okužbe in ne potrebuje zdravljenja s protiglivnimi zdravili. Bolnike, pri katerih v treh do štirih tednih ne pride do izboljšanja, zdravimo s flukonazolom ali itraconazolom. Bolnike z imunsko pomanjkljivostjo vedno zdravimo zaradi visoke verjetnosti razvoja okužbe.

Hudo pljučno kokcidioidozo zdravimo na začetku z amfotericinom B, kasneje pa nadaljujemo zdravljenje z itraconazolom. Kronično pljučno kokcidioidomikozo zdravimo z itraconazolom ter kirurško odstranitevijo pljučnih kavitacij (4).

ENDEMSKE MIKOZE JUTRI

V prihodnosti pričakujemo nadaljnjo rast incidence okužb z endemskimi glivami. Svetovna turistična organizacija ocenjuje, da se bo število popotnikov povečalo z okoli 595 milijonov (leta 1997) na 1,6 milijarde do leta 2020 (9). Prav tako se večja števila ljudi z oslabiljenim imunskim odzivom, saj v to skupino ne spadajo samo bolniki z aidsom, ampak tudi prejemniki organov, osebe na dolgotrajnem zdravljenju z glukokortikoidi, posamezniki, zdravljeni z zaviralci dejavnika tumorske nekroze α , osebe z različnimi malignimi obolenji ter zdravljeni s kemoterapijo (3). Tudi ljudje z oslabiljenim imun-

skim odzivom vedno več potujejo, kar še dodatno viša incidenco huje potekajočih endemskih mikoz. Glive so se sposobne prilagoditi na najrazličnejše življenjske pogoje. Z rastjo nekaterih vrst gliv so imeli težave celo na mednarodni vesoljski postaji, kar pomeni, da nas v prihodnosti s potovanji v vesolje zagotovo čakajo tudi nove vrste endemskih mikoz (12).

ZAKLJUČEK

Endemske glive postajajo vedno bolj pomembne in prepoznavne. Razlog za to je po-

rast števila ljudi, ki imajo večje tveganje za hud potek okužbe z endemskimi glivami, in njihova mobilnost. Na razširjenost vplivajo tudi podnebne spremembe, širjenje prostora za bivanje, večja možnost potovanja in preseljevanja ljudi. Izboljšala se je tudi diagnostika (slikovna, mikrobiološka, izvedba biopsij itd.), ki omogoča identifikacijo endemskih gliv in pojasnitev prej nejasnih bolezenskih stanj.

LITERATURA

1. Cohen J et al. Infectious diseases. 4th ed. Elsevier; 2016. p. 292–9.
2. Homei A, Worboys M. Fungal disease in Britain and the United States 1850–2000: mycoses and modernity. Basingstoke: Palgrave Macmillan; 2013. p. 98–118.
3. Lee PP, Lau YL. Cellular and molecular defects underlying invasive fungal infections—revelations from endemic mycoses. *Front Immunol.* 2017; 8: 735.
4. Bonifaz A, Vázquez-González D, Perusquía-Ortiz AM. Endemic systemic mycoses: coccidioidomycosis, histoplasmosis, paracoccidioidomycosis and blastomycosis. *J Dtsch Dermatol Ges.* 2011; 9 (9): 705–14
5. Hirschmann JV. The early history of coccidioidomycosis: 1892–1945. *Clin Infect Dis.* 2007; 44 (9): 1202–7.
6. Freedman M, Jackson BR, McCotter O, et al. Coccidioidomycosis outbreaks, United States and worldwide, 1940–2015. *Emerg Infect Dis.* 2018; 24 (3): 417–23.
7. Benedict K, Mody RK. Epidemiology of histoplasmosis outbreaks, United States, 1938–2013. *Emerg Infect Dis.* 2016; 22: 370–8.
8. Dylan recovers from heart ailment [internet]. *Rolling Stone*; 1997 [citirano 2018 Apr 10]. Dosegljivo na: <https://www.rollingstone.com/music/news/dylan-recovers-from-heart-ailment-19970710>
9. Ericsson CD, Steffen R, Panackal AA, Hajjeh AR, et al. Fungal infections among returning travelers. *Clin Infect Dis.* 2002; 35 (9): 1088–95.
10. Matos T. Povzročitelji endemskih mikoz. *Med Razgl.* 2009; 48 (4): 369–82.
11. Cohen, J. The International Space Station is home to potentially dangerous bacteria. *Science* [internet]. 2015 [citirano 2018 Apr 10]. Dosegljivo na: <http://www.sciencemag.org/news/2015/10/international-space-station-home-potentially-dangerous-bacteria>

Andrej Golle¹, Tadeja Matos², Rok Tomazin³, Pij Bogomir Marko⁴, Urša Košir⁵, Marica Lugovski⁶, Urška Dermota⁷, Anamarija Jurjašević Dodič⁸, Zdenka Horvat Šardi⁹, Tatjana Harlander¹⁰, Ingrid Berce¹¹

Dermafotitije: diagnostika, epidemiologija in zdravljenje

Dermatophytoses: Diagnostics, Epidemiology and Therapy

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: povrhnje mikoze, dermatomikoze, onihomikoze, *Trichophyton*, *Microsporum*, *Epidermophyton*, glive

Prispevek obravnava mikrobiološko diagnostiko dermafotitij, navaja priporočila za zdravljenje in predstavi podatke o osamitvi dermafotitov, ki smo jih osamili na Oddelkih za medicinsko mikrobiologijo Nacionalnega laboratorija za okolje, zdravje in hrano ter v Laboratoriju za diagnostiko glivičnih okužb Inštituta za klinično mikrobiologijo in imunologijo Univerze v Ljubljani, v obdobju 2013–2017. Pri 2.310 bolnikih smo iz 2.512 kužnin osamili dermafote. Trije najpogosteje osamljeni dermafoti so bili *Trichophyton rubrum* (41,30 % bolnikov), *Microsporum canis* (24,20 % bolnikov) in *Trichophyton mentagrophytes* (21,13 % bolnikov). Glede treh najpogosteje osamljenih vrst je stanje epidemiološko podobno v drugih evropskih državah. Ugotavljamo pa razliko med našim pregledom in raziskavo, izvedeno v ljubljanski regiji v letih 1995–2002. Takrat je bil najpogosteje osamljen dermafotit *M. canis*. Okužbe z drugimi vrstami dermafotitov se pojavljajo sporadično. Za razliko od severnih in zahodnoevropskih držav ne opažamo porasta okužb z antropofilnimi dermafotiti, kot so *Tricholophyton violaceum*, *Trichophyton tonsurans* in *Microsporum audouinii*.

¹ Mag. Andrej Golle, dr. med., Oddelek za medicinsko mikrobiologijo Maribor, Center za medicinsko mikrobiologijo, Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Prvomajska ulica 1, 2000 Maribor; andrej.golle@nlzoh.si

² Doc. dr. Tadeja Matos, dr. med., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana

³ Asist. Rok Tomazin, univ. dipl. mikrobiol., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana

⁴ Prim. mag. Pij Bogomir Marko, dr. med., Univerzitetni klinični center Maribor, Ljubljanska ulica 5, 2000 Maribor

⁵ Mag. Urša Košir, mag. mikrobiol., Oddelek za medicinsko mikrobiologijo Maribor, Center za medicinsko mikrobiologijo, Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Prvomajska ulica 1, 2000 Maribor

⁶ Marica Lugovski, dr. med., Oddelek za medicinsko mikrobiologijo Celje, Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Gregorčičeva ulica 5, 3000 Celje

⁷ Dr. Urška Dermota, univ. dipl. mikrobiol., Oddelek za medicinsko mikrobiologijo Kranj, Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Gosposvetska ulica 12, 4000 Kranj

⁸ Anamarija Jurjašević Dodič, univ. dipl. mikrobiol., Oddelek za medicinsko mikrobiologijo Koper, Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Verdijeva ulica 11, 6000 Koper

⁹ Zdenka Horvat Šardi, univ. dipl. biol., Oddelek za medicinsko mikrobiologijo Murska Sobota, Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Ulica arhitekta Novaka 2b, 9000 Murska Sobota

¹⁰ Tatjana Harlander, dr. med., Oddelek za medicinsko mikrobiologijo Novo mesto, Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Mej vrti 5, 8000 Novo mesto

¹¹ Ingrid Berce, dr. vet. med., Oddelek za medicinsko mikrobiologijo Nova Gorica, Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Vipavska cesta 13, 5000 Nova Gorica

ABSTRACT

KEY WORDS: superficial mycoses, dermatomycoses, onychomycoses, *Trichophyton*, *Microsporum*, *Epidermophyton*, fungi

This paper discusses the microbiological diagnostics of dermatophytosis, provides recommendations for treatment, and presents data about isolation of dermatophytes isolated at the Centre for Medical Microbiology of the National Laboratory of Health, Environment and Food and the Laboratory for Diagnostics of Fungal Infections of the Institute of Microbiology and Immunology of the University of Ljubljana in the period 2013–2017. In 2310 patients, dermatophytes were isolated from 2512 specimens. The three most commonly isolated dermatophytes were *Trichophyton rubrum* (41.30% patients), *Microsporum canis* (24.20% patients) in *Trichophyton mentagrophytes* (21.13% patients). Concerning the three most frequently isolated species, the situation is epidemiologically similar to the situation in other European countries. However, we find a difference between the current findings and the study carried out in the Ljubljana region between the years 1995–2002. In that study the most commonly isolated dermatophyte was *M. canis*. Infections with other types of dermatophytes occur sporadically. In contrast to northern and western European countries, there is no increase in infection with anthropophilic dermatophytes, such as *Trichosporum violaceum*, *Trichophyton tonsurans*, and *Microsporum audouinii*.

UVOD

Dermatofiti so keratinofilne nitaste glive, ki naseljujejo poroženelo plast kože, sposobni pa so prodreti tudi v lase in nohte (1). Pomemben dejavnik njihove patogenosti je izločanje encimov keratinaz, ki razgrajujejo keratin (2, 3). Na potek in klinično sliko pomembno vplivajo tudi dejavniki gostitelja, kot so motnje prekrvavitve, sladkorna bolezen, motnje celične imunosti ter obolenja kože (4).

Obstaja okoli 40 vrst dermatofitov, od tega jih približno 20 povzroča okužbe pri človeku (5). Taksonomsko jih razvrstimo v tri medsebojno sorodne anamorfnе rodove: *Trichophyton*, *Microsporum* in *Epidermophyton* (6).

Okužbe z dermatofiti poimenujemo glede na mesto lezije, ki je običajno v povezavi z vrsto povzročitelja (tabela 1) (7).

Glede na njihovo bivalno okolje delimo dermatofite v tri skupine: antropofilne, zoofilne in geofilne (1, 7).

Rezervoar antropofilnih dermatofitov je človek. Med ljudmi se prenašajo neposred-

no in posredno preko onesnaženih predmetov. Okužbe z antropofilnimi dermatofiti običajno potekajo z blažje izraženim vnetjem in so povezane z značilnimi kliničnimi slikami (tabela 1).

Zoofilni dermatofiti povzročajo okužbe pri živalih, sporadično se lahko prenesejo na ljudi. Pogosto so prizadeti otroci, na katere se okužba prenese s hišnih ljubljencev. Praviloma okužbe z zoofilnimi dermatofiti potekajo izraziteje in z močnejšo stopnjo vnetja. Prenasajo se tudi med ljudmi (1).

Geofilni dermatofiti so saprofiti, ki jih najdemo v prsti, sporadično povzročajo okužbe ljudi in živali. Okužbe se lahko prenašajo tudi med ljudmi (1).

Dermatofiti so razširjeni po vsem svetu. Domneva se, da so odgovorni za vsaj 20–25 % povrhnjih glivnih okužb, preostali delež povzročajo kvasovke in nedermatofitne plesni (1, 7). Epidemiologija glivnih okužb se spreminja, na kar vplivajo številni dejavniki, pomembni so predvsem geografska lokacija, življenjski slog, preselje-

Tabela 1. Poimenovanje okužb, ki jih povzročajo dermatofiti glede na mesto lezije, in najpogostejši povzročitelji v povezavi z mestom lezije (7).

Lokacija lezije	Poimenovanje	Najpomembnejši povzročitelji
Lasišče	tinea capitis	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Microsporum cani</i> • <i>Trichopyton tonsurans</i> • <i>Tricholosporem violaceum</i> • <i>Microsporum audouinii</i> • <i>Trichopyton soudanense</i>
Stopalo	tinea pedis	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Trichopyton rubrum</i> • <i>Trichopyton mentagrophytes^a</i> • <i>Epidermophyton floccosum</i>
Dimlje	tinea cruris	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Trichopyton rubrum</i> • <i>Trichopyton mentagrophytes</i>
Telo (roke, noge, trup)	tinea corporis	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Trichopyton rubrum</i> • <i>Microsporum canis</i> • <i>Trichopyton tonsurans</i>
Nohti	tinea unguium (onihomikoza)	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Trichopyton rubrum</i> • <i>Trichopyton mentagrophytes^a</i>

^a (var. *interdigitale*)

vaje prebivalstva (begunci, masovni turizem) in družbeno-ekonomski pogoji (1, 7, 8). Zlasti opazamo porast onihomikoze in tinea pedis med odraslimi osebami v razvitih državah, kar je povezano z življenjskim slogom (rekreacija, javna kopališča, nezračna obutev) (1, 9, 10). K večji dovzetnosti za okužbo prispeva tudi naraščanje prevalence sladkorne bolezni med prebivalstvom razvitih držav.

Pri otrocih v Evropi opazamo povečanje obolevnosti za tinea capitis, ki jo povzročajo antropofilne vrste dermatofitov. Menijo, da je to povezano s povečanim priseljevanjem iz držav, kjer je tinea capitis endemična (1).

Klinične slike pri onihomikozi in dermatomikozah niso značilne, zato moramo diagnozo postaviti na osnovi neposrednega dokaza povzročitelja (11). Mikrobiološka prepoznavna povzročiteljev je pomembna zaradi začetka zdravljenja, ki je praviloma dolgotrajno in je lahko povezano s stranskimi učinki, ter zaradi izvajanja epidemioloških ukrepov, kadar so ti potrebni za zajezitev širjenja okužb (1, 11).

Skrb za dobro mikrobiološko diagnostiko dermatomikoz in onihomikoze se prič-

ne že izven mikrobiološkega laboratorija s pravilnim odvzemom in transportom kužnine. Splošno pravilo pri tem je, da kužnino odvezamo z mesta aktivne okužbe in jo v laboratorij prenesemo tako, da preprečimo kontaminacijo z vseprisotnimi okoljskimi plesnimi.

Pri diagnostiki onihomikoze so ustrezne kužnine pravilno odvzeti koščki nohta in nohtnega debrisa. Pred samim odvzemom naj si bolnik umije roke ali noge. Noht je pred odščipanjem ali struženjem treba razkužiti s 70 % raztopino alkohola. Za struženje uporabimo skalpel ali dermatološko kireto. Odvzeti je treba dovolj kužnine, ki jo razdelimo na dva dela. En del uporabimo za pripravo neposrednega mikroskopskega preparata, drugi del nacepimo za mikološko kulturo (1, 11, 12). Pri kožnih lezijah odvezamo kožne luske ali postružke kože, dodatno pa lahko tudi bris. Z lasišča odvezamo luske in lase (12).

Kužnino odvezamo v sterilne posodice (npr. posodica za urin oz. sputum ali petrijevka), ki jih lahko dobro zapremo. Uporaba papirnatih ovojnic se odsvetuje, saj so lahko kontaminirane s plesnimi (1, 11, 12).

Laboratorijska diagnostika še vedno temelji na prikazu gliv v neposrednem mikroskopskem preparatu in na gojitvenih metodah. Na gojiščih porasle glive spoznavamo glede na makroskopsko in mikroskopsko morfologijo (1, 11, 12). Neposredni mikroskopski preparat pripravimo z uporabo kalijevega hidroksida, ki raztopi keratin, ali fluorokromnih barvil (npr. kalkofluor belo). S to hitro predhodno metodo lahko izkušeni preiskovalec loči dermatofitne od nedermatofitnih hif in od psevdomicelija kvasovk. Vrste glive na tak način ne moremo določiti (11, 12).

Za gojitev je treba kužnine nacepiti na gojišča, najpogosteje se uporablja Sabouraudov agar z dodanimi selektivnimi dejavniki. Gojišča inkubiramo pri temperaturi 26–30 °C. Ker dermatofiti rastejo počasi, so te metode dolgotrajne, zahtevana je inkubacija dva do šest tednov. Porasle kolonije identificiramo na osnovi makroskopskih in mikroskopskih značilnosti (11, 12). Občutljivost kulture je 75–81 %, lahko pa še manj, če identifikacijo opravljajo v laboratorijih brez izkušenj in s slabim nadzorom kakovosti. Možni so tudi lažni rezultati, kolonije so pogosto neznačilne. V določenih primerih kolonije niti ne tvorijo za razpoznavo pomembnih makrokonidijev (1, 12, 13).

Izolate, porasle v kulturi, lahko identificiramo tudi z masno spektrometrijo oz. z uporabo molekularno-bioloških metod (6, 14). Pogosto se uporablja določanje nukleotidnega zaporedja pomnoženih medgenskih področij (angl. *internal transcribed spacer*, ITS). Področja ITS najdemo med geni za ribosomalno RNK, zanje pa je značilna visoka stopnja polimorfizma (15, 16).

Hitrost, specifičnost in občutljivost preiskav za neposredno dokazovanje povzročitelja v kužnini se lahko poveča z vpejlavo molekularno-bioloških tehnik v mikološki laboratorij. Vse pogosteje se uporabljajo tehnike pomnoževanja nukleinskih kislin, predvsem različne oblike verižne reakcije s polimerazo. Njihova občutljivost

je pomembno višja kot občutljivost gojitvenih metod in znaša 97–99 % (13, 17–19).

Temelj zdravljenja glivičnih bolezni kože predstavljajo protiglivna zdravila za lokalno zdravljenje v kremah, raztopinah, gelih, pršilih, zdravilnih šamponih, zdravilnih lakih in drugih farmacevtskih oblikah. Najpogosteje uporabljena protiglivna zdravila za lokalno zdravljenje glivičnih okužb kože so imidazoli (klotrimazol, mikonazol, ketokonazol) in alilamini (terbinafin).

Za sistemsko zdravljenje glivičnih bolezni kože se odločimo ob večjem številu žarišč, okužbi lasišča in drugih poraslih delov kože, okužbi nohtov, v primeru primarne ali sekundarne imunske pomanjkljivosti in neuspehu predhodnega lokalnega zdravljenja. Sistemsko zdravimo vedno v povezavi z lokalnim zdravljenjem. Protiglivna zdravila za sistemsko zdravljenje glivičnih bolezni kože so terbinafin, itrakonazol, flukonazol in griseofulvin. Pred pričetkom zdravljenja s sistemskimi protiglivnimi zdravili je priporočljivo opraviti osnovne laboratorijske preiskave, hemogram ter osnovne jetrne teste, ki jih je smiselno preverjati v primeru podaljšanega, več kot štiri tedne trajajočega sistemskega zdravljenja (20). Pred zdravljenjem s sistemskimi protiglivnimi zdravili je treba upoštevati kontraindikacije za sistemsko protiglivno zdravljenje zaradi pridruženih bolezni in preveriti bolnikova že predpisana zdravila zaradi možnega medsebojnega delovanja zdravil in razvoja neželenih učinkov zaradi interakcij med zdravili.

Čas lokalnega in sistemskega zdravljenja je odvisen od mesta okužbe in izvidov nadzornih mikoloških preiskav (tabela 2). Na neporasli koži običajno zadošča štiritedensko zdravljenje, pri okužbi lasišča traja zdravljenje najmanj šest tednov, pri zdravljenju onihomikoze na nohtih prstov stopal 12 tednov. Po ukinitvi sistemskega protiglivnega zdravila nadaljujemo zdravljenje z lokalnim protiglivnim zdravilom do dveh negativnih mikoloških kultur. Zdravljenje mikrosporije traja najmanj dva meseca (21).

Ustrezni preventivni ukrepi za preprečevanje prenosa glivičnih bolezni kože in sočasno zdravljenje pridruženih bolezni, ki vodijo k večji nagnjenosti za glivične bolezni kože, izboljšajo učinkovitost lokalnega in sistemskega protiglivnega zdravljenja.

OSAMITEV DERMATOFITOV IZ KUŽNIN KOŽE, NOHTOV IN LAS V SLOVENIJI V OBDOBJU 2013–2017 Materiali in metode

Retrospektivno smo pregledali rezultate preiskav na glive iz kliničnih vzorcev, pri katerih smo osamili dermatofite v obdobju

Tabela 2. Protiglavno zdravljenje glivičnih bolezni kože, povzročenih z dermatofiti.

Bolezen	Zdravljenje		Trajanje	Opombe
	Priporočeno zdravilo	Dnevni odmerek		
Tinea capitis, tinea barbae	griseofulvin	20–25 mg/kg (zdravilo prve izbire za zdravljenje mikrosporije pri otrocih do drugega leta starosti)	6–12 tednov	dodatno lokalno zdravljenje: <ul style="list-style-type: none"> • ketokonazol šampon, • šampon s selenijevim sulfidom, • protiglivne kreme
	terbinafin	62,5 mg (< 20 kg) 125 mg (20–40 kg) 250 mg (> 40 kg)	4–6 tednov	
Tinea faciei, tinea corporis, tinea inguinalis, tinea cruris	lokalna protiglivna zdravila	dvakrat dnevno	2–4 tedne	nanašanje preko robov žarišč
	terbinafin	250 mg	1–2 tedna	kronične in razširjene oblike, predhodna uporaba lokalnih kortikosteroidov
	itrakonazol	200 mg	1 teden	
	flukonazol	50 mg	2–4 tedne	
		150 mg enkrat tedensko	2–4 tedne	
Tinea pedis, tinea manuum	lokalna protiglivna zdravila	dvakrat dnevno	2–4 tedne	nanašanje preko robov žarišč
	terbinafin	250 mg	2 tedna	kronične in hiperkeratotične oblike
	itrakonazol	400 mg	1 teden	
	flukonazol	150 mg enkrat tedensko	2–6 tednov	
Tinea unguium	lokalna protiglivna zdravila	dvakrat dnevno	več mesecev	slaba učinkovitost
	terbinafin	250 mg	6 tednov	nohti rok
			12 tednov	nohti nog
	itrakonazol	200 mg dvakrat dnevno (pulzno zdravljenje)	1 teden	<ul style="list-style-type: none"> • nohti rok: dva pulza • nohti nog: trije pulzi • en teden pulzno zdravljenje, nato tri tedne premor
	flukonazol	150 mg enkrat tedensko	12 tednov	nohti rok
24 tednov			nohti nog	

1. 1. 2013–31. 12. 2017. Podatke so prispevali laboratoriji Nacionalnega inštituta za zdravje, okolje in hrano (NLZOH, Maribor: OMM Celje, OMM Maribor, OMM Kranj, OMM Novo mesto, OMM Nova Gorica) ter Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Univerze v Ljubljani (IMI, Ljubljana).

Kužnine smo pridobili iz enot za dermatologijo Univerzitetnih kliničnih centrov v Ljubljani in Mariboru, dermatoloških enot drugih bolnišnic in ambulant v sklopu vsakodnevnega rednega dela.

Kužnine smo v naših laboratorijih obdelali v skladu s standardnimi delovnimi navodili za preiskave na glive: kužnino smo vedno nacepili na neselektivno gojišče za glive in selektivno gojišče z dodanimi snovmi, ki zavirajo razraščanje bakterij in/ali saprofitnih plesni. Gojišča smo inkubirali pri 30 °C za obdobje štirih tednov. Na značilno rast smo jih pregledovali dva- do trikrat tedensko. Kolonije dermatofitov, ki smo jih osamili, smo identificirali glede na njihove makroskopske in mikroskopske značilnosti. V nekaterih primerih smo si pri identifikaciji pomagali z masno spektrometrijo z ionizacijo v matriksu z desorpcijo z laserjem in masnim analizatorjem na čas preleta ionov (angl. *matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry*, MALDI-TOF MS) oz. s sekvenciranjem.

REZULTATI

V obdobju 2013–2017 smo iz 2.512 kužnin pri 2.310 bolnikih osamili dermatofite, ki so porasli iz 1.730 vzorcev kože (kožne luske, brisi kože, postružki kože), 719 vzorcev nohtov (koščki nohtov, odščipi nohtov, nohtni debris), 24 vzorcev las in 39 vzorcev drugih tkiv (brisi ran, brisi pustul itd.). Anatomske lokacije odvzema kužnine praviloma niso bile natančno opredeljene, zato jih nismo vključili v naš prikaz. Strukturne deleže osamljenih patogenov in razmerje glede na spol prikazujemo v tabeli 3.

Najpogosteje osamljen dermatofit je bil *Trichophyton rubrum* (41,30 % bolnikov),

približno enako pogosto smo ga osamili tako iz kože kot iz nohtov. Drugi najpogosteje osamljen patogen je bil *Microsporium canis* (24,20 % bolnikov), ki smo ga največkrat osamili iz vzorcev kože, nato las in zatem nohtov. Tretji najpogosteje osamljeni povzročitelj dermatomikoz je bil *Trichophyton mentagrophytes* (21,13 %), ki smo ga največkrat osamili iz vzorcev kože, nato nohtov. Četrta najpogostejša skupina so bili izolati, ki smo jih identificirali le do nivoja rodu – *Trichophyton* spp. (7,01 %). Tri najpogostejše osamljene vrste skupaj zajemajo 86,63 % vseh bolnikov (2.001 bolnik), pri katerih smo iz kužnin osamili dermatofite. Porazdelitev treh najpogosteje osamljenih vrst dermatofitov po starostnih skupinah bolnikov prikazujeta tabela 4 in slika 1.

RAZPRAVA

Glede na podatke so najpogostejši povzročitelji dermatofitij v našem prostoru predstavniki rodu *Trichophyton*, med katerimi prednjačita *T. rubrum* in *T. mentagrophytes*, ter *M. canis*. Podoben vrstni red najpogostejših povzročiteljev dermatofitij in onihomikoz je prisoten tudi drugod v Evropi, relativni deleži pa se nekoliko razlikujejo (7).

Relativni delež *T. rubrum* med dermatofiti pri nas znaša 41,30 % in je v obdobju 2013–2017 najpogosteje osamljen dermatofit iz kože in nohtov. Tudi v drugih evropskih državah je *T. rubrum* najpogostejši izolat med dermatofiti (5, 22). V nekaterih državah, kot so Velika Britanija, Nemčija, Švedska in Slovaška, delež *T. rubrum* med dermatofiti dosega 60–80 % (1, 7, 23, 24). Največkrat ga povezujejo s tinea pedis in onihomikozo, pogosto pa tudi s tinea corporis in tinea cruris (7, 23, 25–27). Ugotavljamo, da smo ga zlasti pogosto osamili med populacijo, starejšo od 31 let: prevalenca osamitve se začne zviševati v starostni skupini 16–30 let in doseže najvišje vrednosti v starostni skupini 61–75 let (slika 1, tabela 4). Prevladuje pri moških. Podobna starostna in spolna porazdelitev je prisot-

na tudi v drugih evropskih državah, le da pri nas vedno ugotavljamo relativno velik delež oseb, mlajših od 31 let, ki so okužene s *T. rubrum* (23). Veljalo je, da *T. rubrum* kot povzročitelj dermatomikoz in onihomikoz prevladuje zlasti v srednji in vzhodni Evropi, medtem ko so podatki za Slovenijo, Italijo in ostale sredozemske države kot najpogostejšega povzročitelja dermatomikoz navajale *M. canis* (26, 28–30). Za Ljubljansko regijo v obdobju 1995–2002 avtorica

navaja 46 % delež *Microsporium canis* in 36,7 % delež *T. rubrum*, vendar že takrat ugotavlja, da se v zadnjih dveh letih pogostost pojavljanja *T. rubrum* zvišuje in presega pogostost pojavljanja *M. canis* (28).

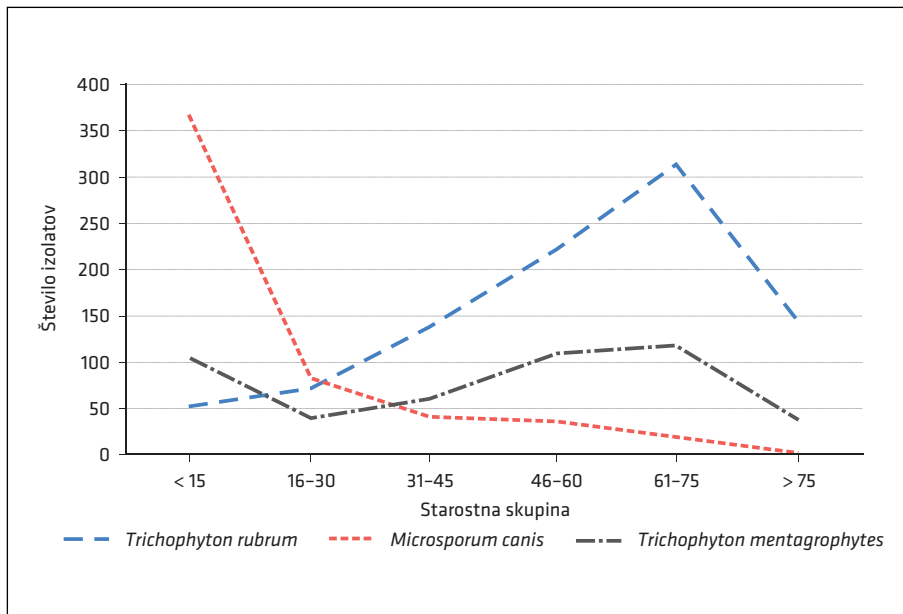
Drugi najpogostejše osamljeni povzročitelji v obdobju 2013–2017 je zoofilni dermatofit *M. canis*. Delež tega med bolniki, pri katerih smo osamili dermatofite, znaša 24,20 %, večina obolelih je v starostni skupini do 15 let (66 %). Visoke deleže *M. canis*

Tabela 3. Strukturni deleži dermatofitov, ki smo jih osamili iz kužnin, število obolelih, razmerje med spoloma obolelih in kužnine, iz katerih so dermatofiti porastli, v obdobju 2013–2017.

Vrsta dermatofita	Delež vrste glede na število obolelih	Število obolelih	Moški/ženske	Koža	Nohti	Lasje	Drugo
<i>Trichophyton rubrum</i>	41,30	954	1,6	590	434	1	17
<i>Microsporium canis</i>	24,20	559	0,53	593	10	21	5
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	21,13	488	0,93	312	197	1	12
<i>Trichophyton</i> spp.	7,01	162	1,0	112	54	1	5
<i>Trichophyton verrucosum</i>	1,90	44	1,1	41	3	0	0
<i>Trichophyton tonsurans</i>	1,69	39	1,4	41	3	0	0
<i>Microsporium gypseum</i>	1,65	38	1,2	41	3	0	0
<i>Trichophyton interdigitale</i>	0,26	6	2	3	3	0	0
<i>Epidermophyton floccosum</i>	0,26	6	0,5	3	3	0	0
<i>Microsporium</i> spp.	0,22	5	4	3	2	0	0
<i>Tricholozporium violaceum</i>	0,17	4	/	2	2	0	0
<i>Trichophyton terrestre</i>	0,09	2	1	2	0	0	0
<i>Trichophyton schoenleinei</i>	0,04	1	/	0	1	0	0
<i>Microsporium nanum</i>	0,04	1	/	1	0	0	0
<i>Microsporium persicolor</i>	0,04	1	/	1	0	0	0

Tabela 4. Tri najpogostejše osamljene vrste dermatofitov in porazdelitev izolatov glede na starostne skupine bolnikov.

Vrsta dermatofita	Starostna skupina					
	< 15	16–30	31–45	46–60	61–75	> 75
<i>Trichophyton rubrum</i>	56	75	143	223	315	145
<i>Microsporium canis</i>	369	85	43	39	20	3
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	106	44	64	112	121	41



Slika 1. Grafična predstavitev pojavljanja najpogosteje osamljenih vrst dermatofitov – število bolnikov glede na starostne skupine.

opisujejo tudi v Avstriji, Nemčiji, Italiji, Bolgariji ter na Poljskem in Madžarskem, kjer se pojavlja kot poglavitni povzročitelj tinea capitis (5). *M. canis* se po podatkih iz literature pojavlja predvsem kot povzročitelj tinea capitis in tinea corporis, zlasti pri mlajši, predpubertetni populaciji (5, 27). Glede na spol se okužba pri nas pogosteje pojavlja pri deklicah, podobno so ugotavljali tudi drugi avtorji (26, 31). Menijo, da je to zato, ker se deklice pogosteje in raje igrajo z mačkami in drugimi hišnimi ljubljenci (31). Povprečna starost otrok, pri katerih smo *M. canis* osamili pri nas, je bila 7,5 let. V obdobju 1995–2002 je bil *M. canis* najpogosteje osamljen dermatofit v ljubljanski regiji, temu pa je sledil *T. rubrum* (28). Danes ugotavljamo, da sta se povzročitelja na prvih dveh mestih zamenjala, še vedno pa velja, da *M. canis* povzroča okužbe predvsem pri otrocih, medtem ko *T. rubrum* pri starejših osebah. Najpomembnejši zoonotični vir okužbe naj bi bile mačke, se pa kot rezervoar okužbe lahko pojavljajo tudi druge vrste se-

salcev (28, 32). Živali so lahko tudi klicenosci brez znakov okužbe (5).

Podobno kot v raziskavi, ki zajema ljubljansko regijo v obdobju 1995–2005, je tudi pri našem pregledu tretji najpogosteje osamljeni dermatofit *T. mentagrophytes*, vendar v relativno višjem deležu. Ta vrsta se med dermatofiti tudi v drugih evropskih državah pojavlja na drugem ali tretjem mestu po pogostosti (1, 7). V sosednji Hrvaški je *T. mentagrophytes* najpogosteje osamljen dermatofit, kjer predstavlja več kot polovico vseh osamljenih dermatofitov (33). Navajajo ga zlasti kot povzročitelja tinea capitis, pa tudi onihomikoze in tinea pedis (5, 32).

Razen treh omenjenih vrst smo vse ostale dermatofite osamili v nizkem deležu, manj kot 2 %. Nizko incidenco okužb z *Epidermophyton floccosum* je ugotavljala že raziskava, opravljena v ljubljanski regiji v obdobju 1995–2002, ki ugotavlja 0,7 % delež med vsemi osamljeni dermatofiti (28). V našem pregledu je ta delež 0,26 %, kar se ujema z nizkim deležem tega patogena

v drugih razvitih evropskih državah (10). Zelo redko smo osamili tudi druge antropofilne dermatofite, kot so *Tricholosporem violaceum*, *Trichophyton tonsurans*, *Microsporum audouinii*. Ti se zadnja leta pogosteje pojavljajo v državah zahodne Evrope, predvsem v povezavi z migracijami prebivalstva (1, 8, 34).

ZAKLJUČKI

Na osnovi naših podatkov lahko zaključimo, da se je epidemiološka situacija glede najpomembnejših povzročiteljev dermatofitij med raziskavo v obdobju 1995–2002 in pregledom naših podatkov obdobja 2013–2017 v Sloveniji spremenila v relativni zastopanosti treh najpogostejših povzročiteljev dermatomikoz. V prejšnjem obdobju je kot povzročitelj na prvem mestu izstopal zoofilni *M. canis*, ki povzroča

okužbe zlasti pri otroški populaciji, medtem ko danes med povzročitelji dermatofitij in onihomikoze prevladuje antropofilni *T. rubrum*. Porast okužb s *T. rubrum* se povezuje z življenjskim slogom, pa tudi s sočasno obolevnostjo (obolenja žil, sladkorna bolezen), okužbe s to glivo pa se pojavljajo predvsem pri starejšem prebivalstvu. Takšne epidemiološke razmere so znane iz večine evropskih držav, čeprav se zlasti v nekaterih sredozemskih državah kot vodilni povzročitelj še vedno pojavlja *M. canis*. Zadnje desetletje v zahodnih državah opisujejo porast antropofilnih vrst, ki jih povezujejo s priseljevanjem imigrantov s področij, kjer so okužbe s temi dermatofiti endemične. Porasta teh antropofilnih povzročiteljev v preiskanem obdobju v Sloveniji nismo opazili. Okužbe z omenjenimi vrstami se pojavljajo le sporadično.

LITERATURA

1. Hayette MP, Sacheli R. Dermatophytosis, trends in epidemiology and diagnostic approach. *Curr Fungal Infect Rep.* 2015; 9 (3): 164–79.
2. Weitzman I, Summerbell RC. The dermatophytes. *Clin Microbiol Rev.* 1995; 8 (2): 240–59.
3. Martinez-Rossi NM, Peres NT, Rossi A. Pathogenesis of Dermatophytosis: Sensing the Host Tissue. *Mycopathologia.* 2017; 182 (12): 215–27.
4. Nenoff P, Kruger C, Ginter-Hanselmayer G, et al. Mycology - an update. Part 1: Dermatormycoses: causative agents, epidemiology and pathogenesis. *J Dtsch Dermatol Ges.* 2014; 12 (3): 188–209.
5. Ginter-Hanselmayer G, Weger W, Ilkit M, et al. Epidemiology of tinea capitis in Europe: current state and changing patterns. *Mycoses.* 2007; 50 Suppl 2: 6–13.
6. Packeu A, Hendrickx M, Beguin H, et al. Identification of the *Trichophyton mentagrophytes* complex species using MALDI-TOF mass spectrometry. *Med Mycol.* 2013; 51 (6): 580–5.
7. Havlickova B, Czaika VA, Friedrich M. Epidemiological trends in skin mycoses worldwide. *Mycoses.* 2008; 51 Suppl 4: 2–15.
8. Ameen M. Epidemiology of superficial fungal infections. *Clin Dermatol.* 2010; 28 (2): 197–201.
9. Lupa S, Seneczko F, Jeske J, et al. Epidemiology of dermatomycoses of humans in central Poland. Part IV. Onychomycosis due to dermatophytes. *Mycoses.* 1999; 42 (1112): 65–79.
10. Seebacher C, Bouchara JP, Mignon B. Updates on the epidemiology of dermatophyte infections. *Mycopathologia.* 2008; 166 (56): 335–52.
11. Feuilhade de Chauvin M. New diagnostic techniques. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2005; 19 Suppl 1: 20–4.

12. Pihet M, Le Govic Y. Reappraisal of conventional diagnosis for dermatophytes. *Mycopathologia*. 2017; 182 (12): 169–80.
13. Wisselink GJ, van Zanten E, Kooistra-Smid AM. Trapped in keratin; a comparison of dermatophyte detection in nail, skin and hair samples directly from clinical samples using culture and real-time PCR. *J Microbiol Methods*. 2011; 85(1): 62–6.
14. L'Ollivier C, Cassagne C, Normand AC, et al. A MALDI-TOF MS procedure for clinical dermatophyte species identification in the routine laboratory. *Med Mycol*. 2013; 51 (7): 713–20.
15. Li HC, Bouchara JP, Hsu MM, et al. Identification of dermatophytes by sequence analysis of the rRNA gene internal transcribed spacer regions. *J Med Microbiol*. 2008; 57 (5): 592–600.
16. Dabas Y, Xess I, Singh G, et al. Molecular Identification and Antifungal Susceptibility Patterns of Clinical Dermatophytes Following CLSI and EUCAST Guidelines. *J Fungi (Basel)*. 2017; 3 (2): 17.
17. Koc AN, Atalay MA, Inci M, et al. Identification and molecular epidemiology of dermatophyte isolates by repetitive-sequence-PCR-based DNA fingerprinting using the DiversiLab system in Turkey. *Mycoses*. 2017; 60 (5): 348–54.
18. Mirhendi H, Motamedi M, Makimura K, et al. Development a diagnostic pan-dermatophyte TaqMan probe real-time PCR assay based on beta tubulin gene. *Mycoses*. 2016; 59 (8): 520–7.
19. Kobylak N, Bykowska B, Nowicki R, et al. Real-time PCR approach in dermatophyte detection and *Trichophyton rubrum* identification. *Acta Biochim Pol*. 2015; 62 (1): 119–22.
20. Kaul S, Yadav S, Dogra S. Treatment of dermatophytosis in elderly, children, and pregnant women. *Indian Dermatol Online*. 2017; 8 (5): 310–8.
21. Kansky A., Miljković J., Dolenc-Voljč M. Kožne in spolne bolezni. 3rd ed. Maribor, Ljubljana: Združenje slovenskih dermatovenerologov; 2017.
22. Svejgaard EL, Nilsson J. Onychomycosis in Denmark: prevalence of fungal nail infection in general practice. *Mycoses*. 2004; 47 (34): 131–5.
23. Drakensjo IT, Chryssanthou E. Epidemiology of dermatophyte infections in Stockholm, Sweden: a retrospective study from 2005–2009. *Med Mycol*. 2011; 49 (5): 484–8.
24. Monod M, Jaccoud S, Zaugg C, et al. Survey of dermatophyte infections in the Lausanne area Switzerland. *Dermatology*. 2002; 205 (2): 201–3.
25. Maraki S, Mavromanolaki VE. Epidemiology of dermatophytoses in Crete, Greece. *Med Mycol J*. 2016; 57 (4): E69–E75.
26. Maraki S, Nioti E, Mantadakis E, et al. A 7-year survey of dermatophytoses in Crete, Greece. *Mycoses*. 2007; 50 (6): 481–4.
27. Vena GA, Chieco P, Posa F, et al. Epidemiology of dermatophytoses: retrospective analysis from 2005 to 2010 and comparison with previous data from 1975. *New Microbiol*. 2012; 35 (2): 207–13.
28. Dolenc-Voljč M. Dermatophyte infections in the Ljubljana region, Slovenia, 1995–2002. *Mycoses*. 2005; 48 (3): 181–6.
29. Terragni L, Lasagni A, Oriani A. Dermatophytes and dermatophytoses in the Milan area between 1970 and 1989. *Mycoses*. 1993; 36 (910): 313–7.
30. Mercantini P, Marsella R, Palamara G, et al. Epidemiology of dermatophytoses observed in Rome, Italy, between 1985 and 1993. *Mycoses*. 1995; 38 (910): 415–9.
31. Ginter G. *Microsporium canis* infections in children: results of a new oral antifungal therapy. *Mycoses*. 1996; 39 (78): 265–9.
32. Panasiti V, Devirgiliis V, Borroni RG, et al. Epidemiology of dermatophytic infections in Rome, Italy: a retrospective study from 2002 to 2004. *Med Mycol*. 2007; 45 (1): 57–60.
33. Kastelan M, Utjesinovic-Gudelj V, Prpic-Massari L, et al. *Dermatophyte* infections in Primorsko-Goranska County, Croatia: a 21-year survey. *Acta Dermatovenerol Croat*. 2014; 22 (3): 175–9.
34. Juncosa T, Aguilera P, Jaen A, et al. *Trichophyton violaceum*: an emerging pathogen. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2008; 26 (8): 502–4.

Bojana Beović¹

Strategije zdravljenja invazivnih glivnih bolezní in poraba protiglívnih zdravil pri nas in v Evropi

Strategies for Treatment of Invasive Fungal Infections and Antifungal Use in Slovenia and Europe

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: protiglívna zdravila, smernice, nadzorovana raba protiglívnih zdravil, poraba protiglívnih zdravil

Nove smernice protiglívnega zdravljenja ne prinašajo bistvenih novosti, zdravila izbire za zdravljenje večine primerov invazivne kandidoze so ehinokandinska protiglívna zdravila, za aspergilozo pa vorikonazol. Novost predstavlja isavukonazol, ki ga za zdravljenje invazivne aspergiloze postavljajo ob bok vorikonazolu. Zahtevnost zdravljenja sistemskih glivnih okužb narekuje ukrepe za izboljšanje diagnostike in zdravljenja. Ti naj bi tudi optimizirali stroške, zato je v bolnišnicah smiselno uvesti programe nadzorovane rabe protiglívnih zdravil. Poraba protiglívnih zdravil v Sloveniji je med manjšimi v Evropi, ambulantno je najpogosteje predpisovan terbinafin, v bolnišnicah pa flukonazol. Čeprav je poraba protiglívnih zdravil v bolnišnicah precej manjša kot poraba protibakterijskih učinkovin, so stroški skoraj primerljivi.

ABSTRACT

KEY WORDS: antimycotics, guidelines, antimicrobial stewardship, antifungal use

New guidelines on antifungal treatment do not introduce substantial novelties; echinocandins are the therapy of choice for most cases of invasive candidosis, and voriconazole is the therapy of choice for invasive aspergillosis. Isavuconazole has been introduced recently for the treatment of invasive aspergillosis, and it is comparable to voriconazole. Severity of the disease and difficulties in diagnosing fungal infection call for antifungal stewardship programmes in hospitals that aim to optimise the treatment efficacy, safety, and cost. The consumption of antifungals in Slovenia is among the lowest in Europe, in outpatients the most commonly used antifungal is terbinafine, the most common antifungal drug in hospitals is fluconazole.

¹ Prof. dr. Bojana Beović, dr. med., Klinika za infekcijske bolezni in vročinska stanja, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Japljeva ulica 2, 1525 Ljubljana; Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana; bojana.beovic@kclj.si

UVOD

Pogostost glivnih okužb narašča zaradi povečevanja števila bolnikov, ki so zaradi bolezní ali zdravljenja posebej dovzetni zanje. V zadnjih desetletjih smo bili priča razvoju diagnostike in zdravljenja glivnih okužb, ki se je precej izboljšalo, še vedno pa gre posebej pri imunsko oslabilih bolnikih za hude in življenje ogrožajoče bolezní. Na razpolago imamo sedaj več diagnostičnih metod, s katerimi skušamo dokazati glivno okužbo pri bolnikih, pri katerih nimamo na razpolago ustreznih kužnin za osamitev glive. Več je tudi protiglívnih zdravil, ki so učinkovitejša in varnejša od zdravil, ki so bila v uporabi pred desetletji. Še vedno pa ostajata tako diagnostika kot zdravljenje težavni in pogosto povezani s precejšnjimi stroški, zato je posebej pomembno poznati indikacije tako za diagnostične metode kot za izbiro zdravil (1). V zadnjih nekaj letih so izšle nove mednarodne smernice za zdravljenje invazivne aspergiloze in kandidoze, po svetu pa se v bolnišnicah podobno kot za protibakterijska zdravila uveljavljajo tudi posebni programi za tako imenovano nadzorovano rabo protiglívnih zdravil (angl. *antifungal stewardship*) (2). V kratkem preglednem prispevku so predstavljene najnoveše smernice za zdravljenje pogostih glivnih okužb, izkušnje z nadzorovano rabo protiglívnih zdravil in podatki o obsegu predpisovanja teh zdravil v Sloveniji in po svetu.

NOVE SMERNICE ZA ZDRAVLJENJE INVAZIVNE KANDIDOZE

Pred dvema letoma so izšle nove smernice za zdravljenje invazivne kandidoze pri Ameriškem združenju za infekcijske bolezní (Infectious Diseases Society of America, IDSA) (3). Od evropskih smernic, ki jih je izdalo Evropsko združenje za klinično mikrobiologijo in infekcijske bolezní (European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, ESCMID) leta 2012, se ne razlikujejo bistveno (4). Za zdravljenje kan-

didemije priporočajo ehinokandinska protiglívna zdravila, flukonazol navajajo kot drugo možnost pri občutljivih vrstah kandidate, medtem ko evropska priporočila flukonazol priporočajo le še mejno.

Liposomalni amfotericin B, ki je po evropskih smernicah skupaj z vorikonazolom prva možna zamenjava za ehinokandine, priporočajo ameriške smernice le pri neprenašanju, odpornosti ali pomanjkanju drugih zdravil. Vorikonazol po ameriških smernicah nima posebne prednosti pred flukonazolom, lahko pa se uporablja kot sestopno zdravljenje pri okužbi z glivo *Candida krusei*. Drugačno je tudi priporočilo za čas sestopnega zdravljenja po začetnem zdravljenju z ehinokandinom, kadar občutljivost kandidate to omogoča. Evropske smernice omenjajo zamenjavo ehinokandina s flukonazolom po desetih dneh, medtem ko ameriške smernice omenjajo možnost sestopa že po petih do sedmih dneh.

Pri nevtropeničnih oz. hematoloških bolnikih so tako po evropskih kot po nedavnih ameriških smernicah zdravila izbire ehinokandini, prva zamenjava je liposomalni amfotericin B (3, 5). Enako je priporočilo nove izdaje smernic Evropske konference za okužbe pri levkemiji (European Conference on Infections in Leukemia, ECIL), ki je izšla leta 2017 (6).

NOVE SMERNICE ZA ZDRAVLJENJE INVAZIVNE ASPERGILOZE

Pred dvema letoma je IDSA izdala nove smernice za zdravljenje invazivne aspergiloze (7). Zdravilo izbire ostaja vorikonazol. Kot drugo možnost priporočajo liposomalni amfotericin B ali pa isavukonazol, ki je bil za klinično rabo odobren nedavno. Novo je tudi priporočilo glede zdravljenja invazivne aspergiloze s kombinacijo protiglívnih zdravil. Najbolj prepričljivo je dokazana učinkovitost kombinacije vorikonazola in anidulafungina, ki jo priporočajo za zdravljenje dokazane hude invazivne aspergiloze pri hematoloških bolnikih in bolnikih

s podaljšano hudo nevtropenijo ali kot reševalno zdravljenje (7). Smernice ECIL kot zdravljenje izbire priporočajo vorikonazol ali isavukonazol (6).

NADZOROVANA RABA PROTIGLIVNIH ZDRAVIL

Potreba po sistematičnem nadzoru in strokovnem svetovanju pri zdravljenju invazivnih glivnih okužb je nastala iz več vzrokov. Število učinkovitih protiglivnih zdravil se povečuje, zato je bistveno poznati njihov protiglivni spekter in indikacije ter s tem povezano mesto pri zdravljenju glivnih okužb. Pri indikacijah je pomembno poznati pogostost posameznih vrst gliv rodu *Candida*, ki se v različnih bolnišničnih okoljih lahko precej razlikuje (4). Različen je tudi njihov varnostni profil. Triazolna protiglivna zdravila imajo več součinkovanj predvsem z zdravili, ki se presnavljajo preko družine citokromov P450 kot ehinokandini (8). Pojavljajo se poročila o odpornosti gliv proti protimikrobnim zdravilom. Predvsem je zaskrbljujoča odpornost proti azolom pri glivah *Candida glabrata* in *Aspergillus fumigatus* (9). Pomembno je tudi, da so sorazmerno visoka sredstva za protiglivna zdravila porabljena smotrno. V Univerzitetnem kliničnem centru Ljubljana stroški za protiglivna zdravila že nekaj let presegajo stroške za protibakterijska zdravila, čeprav predstavljajo protiglivna zdravila le desetinno porabe obeh skupin po količini (Univerzitetni klinični center Ljubljana, neobjavljeno).

Nedavni sistematični pregled raziskav (vključenih 97 raziskav), v katerih so ocenjevali učinkovitost ukrepov nadzorovane rabe protiglivnih zdravil, so ugotovili, da so se zmanjšali predvsem poraba in stroški za protiglivna zdravila. Zelo se je povečala tudi skladnost zdravljenja s priporočili, medtem ko se smrtnost ni spremenila (9).

Pri nadzorovani rabi protiglivnih zdravil gre za več dejavnosti (10):

- poznavanje lokalne epidemiologije glivnih okužb,

- ustrezna raba (indikacija, interpretacija) novih metod za diagnozo glivnih okužb (bioznačevalci),
- ustrezna raba drugih diagnostičnih metod (CT, histologija),
- oblikovanje lokalnih smernic za ustrezno izkustveno in usmerjeno zdravljenje glivnih okužb,
- pristop k bolnikom z različnimi osnovnimi boleznimi, različnimi glivnimi okužbami in različno resnostjo bolezni,
- ravnanje z osrednjimi žilnimi katetri pri bolnikih z glivno okužbo,
- sestopne strategije (zamenjava ehinokandinskega protiglivnega zdravila za flukonazol, prehod z intravenskega na peroralno zdravljenje),
- farmakokinetika in farmakodinamika protiglivnih zdravil v vsakodnevem zdravljenju bolnikov, spremljanje terapevtskih koncentracij protiglivnih zdravil in
- farmakoekonomika zdravljenja glivnih okužb.

PORABA PROTIGLIVNIH ZDRAVIL V SLOVENIJI IN DRUGOD

Evropska točkovno prevalenčna raziskava predpisovanja protimikrobnih zdravil v evropskih bolnišnicah, izvedena leta 2008 in 2009, je pokazala, da v bolnišnicah, ki predpisujejo protiglivna zdravila, slednja prejema povprečno 2,5 % bolnikov. V več kot 40 % je šlo za bolnišnične okužbe in pri približno eni tretjini za profilaktično rabo protiglivnih zdravil. Najpogostejše navedene indikacije so bile zdravljenje okužb v prebavilih in dihalih. V 60 % je bil predpisan flukonazol in v 10 % kaspofungin. Široka profilaktična raba protiglivnih zdravil in predpisovanje protiglivnih zdravil za okužbe dihal, pri katerih gre zelo pogosto le za kolonizacijo in ne za glivno etiologijo, je bilo ocenjeno kot zaskrbljujoče (11).

Po anatomsko-terapevtsko-kemični (Anatomical Therapeutic Chemical, ATC) klasifikaciji (J02 – protiglivna zdravila za sistemsko rabo in D01B – protiglivna zdravila

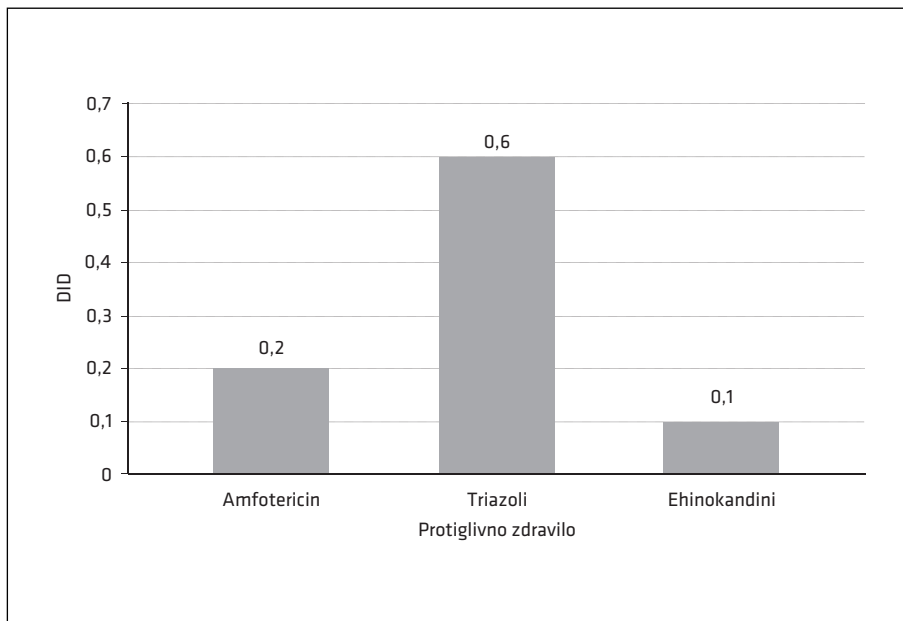
za sistemsko zdravljenje v dermatologiji), je bila v Sloveniji v letu 2016 poraba sistemskih protiglivnih zdravil 0,85 definiranih dnevni odmerkov na 1.000 prebivalcev na dan (angl. *defined daily dose per 1,000 inhabitants per day*, DID), medtem ko je v istem časovnem obdobju poraba protibakterijskih zdravil (J01 – po ATC-klasifikaciji) znašala 13,3 DID (12). Najpogosteje je bil predpisovan terbinafin, in sicer 0,58 DID. V bolnišnicah je bila leta 2016 poraba ATC-klasifi-kacijske skupine D01B zanemarljiva, poraba skupine J02 pa je znašala 0,08 DID, sočasno je bila poraba protibakterijskih učinkovin skupine J01 v bolnišnicah 1,68 DID (12). Med triazoli je bilo v bolnišnici najpogosteje predpisovano zdravilo flukonazol, kate-rega poraba je bila 0,5 DID (13). Slika 1 prikazuje strukturo predpisanih protiglivnih zdravil skupine J01 v bolnišnicah v Sloveniji leta 2016. Stroški za sistemsko protiglivna zdravila v bolnišnicah so znašali malo

več kot šest milijonov evrov, za protibak-terijska zdravila pa malo več kot osem mi-lijonov evrov (13).

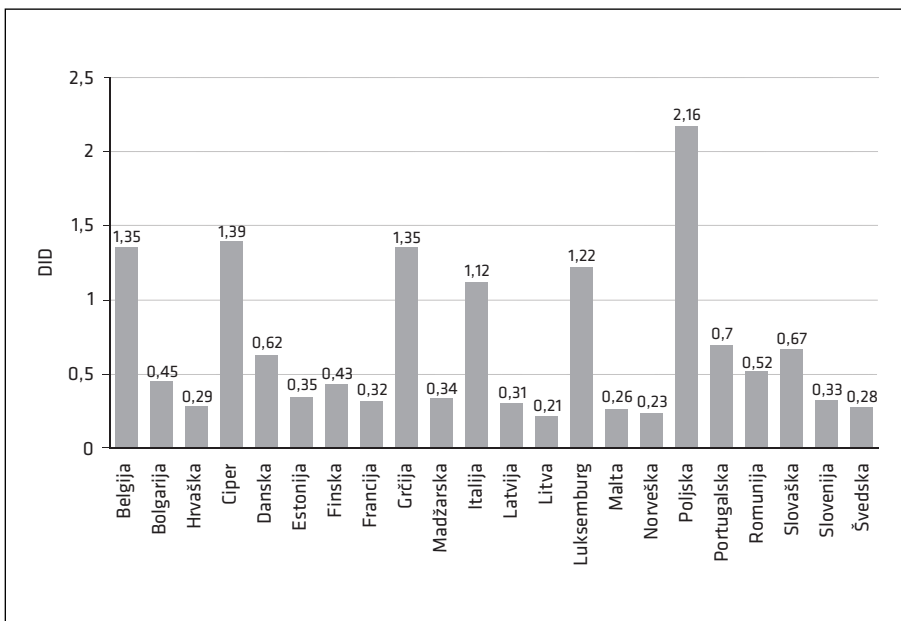
Evropski center za nadzor in preprečevanje bolezni (European Centre for Diseases Prevention and Control, ECDC) zbira podatke o bolnišnični in zunajbolnišnični rabi sistemskih protiglivnih zdravil (12). Po-raba protiglivnih zdravil za sistemsko rabo v evropskih državah, ki poročajo v sistem zbiranja podatkov ECDC, za leto 2016 je pri-kazana na sliki 2, samo bolnišnična raba pa na sliki 3.

ZAKLJUČEK

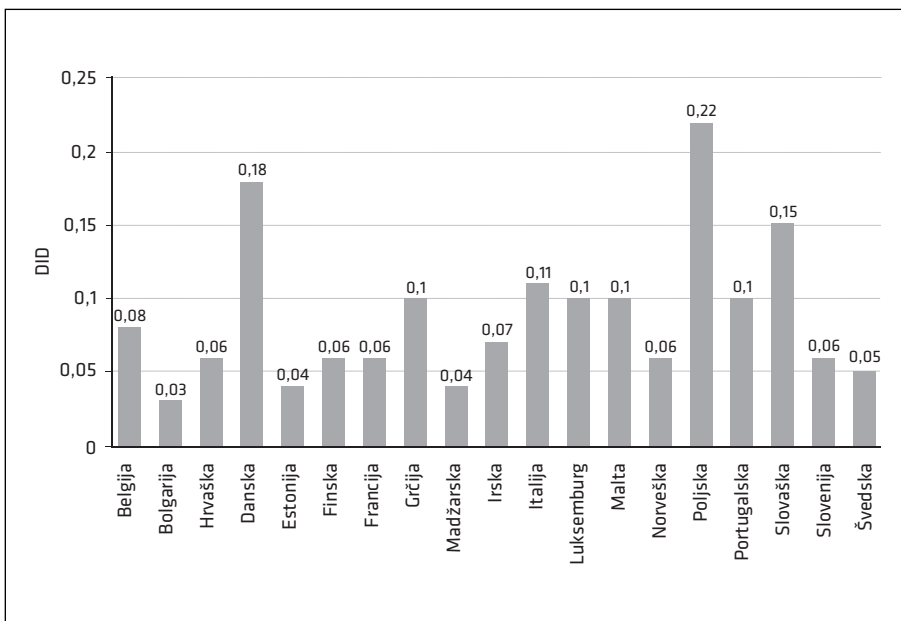
Kljub povečanju števila protiglivnih zdra-vil za sistemsko rabo v zadnjem času ostaja-jo glivne okužbe težko obvladljive. Njihovo zdravljenje je povezano z velikimi stroški, zato je nujna posebna skrb pri njihovem pred-pisovanju. V Sloveniji je predpisovanje zmer-no, ni pa znana kakovost predpisovanja.



Slika 1. Poraba protiglivnih zdravil za sistemsko rabo v Sloveniji v definiranih dnevni odmerkih na 1.000 prebivalcev na dan leta 2016 (13). DID – definiran dnevni odmerek na 1.000 prebivalcev na dan (angl. *defined daily dose per 1,000 inhabitants per day*).



Slika 2. Poraba protiglavnih zdravil za sistemsko rabo v bolnišnicah in zunaj bolnišnic v letu 2016 v definiranih dnevni odmerkih na 1.000 prebivalcev na dan (12). DID – definiran dnevni odmerek na 1.000 prebivalcev na dan (angl. *defined daily dose per 1,000 inhabitants per day*).



Slika 3. Poraba protiglavnih zdravil za sistemsko rabo v bolnišnicah leta 2016 v definiranih dnevni odmerkih na 1.000 prebivalcev na dan (12). DID – definiran dnevni odmerek na 1.000 prebivalcev na dan (angl. *defined daily dose per 1,000 inhabitants per day*).

LITERATURA

1. Lejko Zupanc T. Glivne okužbe, uvod. In: Tomažič J, Strle F (eds.). *Infekcijske bolezni*. Ljubljana: Littera picta; 2017. p. 543–4.
2. Bienvenu AL, Argaud L, Aubrun F, et al. A systematic review of interventions and performance measures for antifungal stewardship programmes. *J Antimicrob Chemother*. 2018; 73 (2): 297–305.
3. Pappas PG, Kauffman CA, Andes DR, et al. Clinical practice guideline for the management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2016; 62 (4): e1–50.
4. Cornely OA, Bassetti M, Calandra T, et al. ESCMID guideline for the diagnosis and management of *Candida* diseases 2012: non-neutropenic adult patients. *Clin Microbiol Infect*. 2012; 18 Suppl 7: 19–37.
5. Ullmann AJ, Akova M, Herbrecht R, et al. ESCMID guideline for the diagnosis and management of *Candida* diseases 2012: adults with haematological malignancies and after haematopoietic stem cell transplantation (HCT). *Clin Microbiol Infect*. 2012; 18 Suppl 7: 53–67.
6. Tissot F, Agrawal S, Pagano L, et al. ECIL-6 guidelines for the treatment of invasive candidiasis, aspergillosis and mucormycosis in leukemia and hematopoietic stem cell transplant patients. *Haematologica*. 2017; 102 (3): 433–44.
7. Patterson TF, Thompson GR III, Denning DW, et al. Practice guidelines for the diagnosis and management of Aspergillosis: 2016 update by the Infectious Disease Society of America. *Clin Infect Dis*. 2016; 63 (4): e1–60.
8. European Medicines Agency [internet]. London: European public assessment reports. c1995–2018 [citirano 2018 May 14]. Dosegljivo na: http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/landing/epar_search.jsp&mid=WCOB01ac058001d124
9. Bienvenu AL, Argaud L, Aubrun F, et al. A systematic review of interventions and performance measures for antifungal stewardship programmes. *J Antimicrob Chemother*. 2018; 73 (2): 297–305.
10. Ruhnke M. Antifungal stewardship in invasive *Candida* infections. *Clin Microbiol Infect*. 2014; 20 Suppl 6: 11–18.
11. Zarb P, Amadeo B, Muller A, et al. Antifungal therapy in European hospitals: data from the ESAC pointprevalence surveys 2008 and 2009. *Clin Microbiol Infect*. 2012; 18 (10): E389–95.
12. European Union: Antimicrobial consumption database 2018 [internet]. Solna: European Centre for Disease Prevention and Control [citirano 2018 May 14]. Dosegljivo na <https://ecdc.europa.eu/en/antimicrobial-consumption/database/distribution-by-antimicrobial-group>
13. Lejko Zupanc T, Čížman M. Poročilo o porabi protimikrobnih zdravil v Sloveniji v letu 2016. Ljubljana: Klinika za infekcijske bolezni in vročinska stanja, Univerzitetni klinični center Ljubljana; 2016.

Prispelo: 19. 5. 2018

Rok Tomazin¹

Smiselnost in problem standardizacije mikološkega nadzora zraka bolnišničnega okolja

Rationality and the Standardization Problem of Mycological Surveillance of the Air of Hospital Environment

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: plesni, sedimentacijska metoda, volumetrične metode, z zdravstvom povezane okužbe

Številne okužbe se prenašajo preko zraka, zato predstavlja njihovo omejevanje poseben izziv. Med take okužbe spadajo tudi različne invazivne mikoze, ki jih povzročajo plesni. Običajna pot okužbe je vdihavanje konidijev, v bolnišničnem okolju pa do okužb lahko pride tudi preko usedanja konidijev v anatomsko sicer sterilna mesta med operativnimi in drugimi invazivnimi posegi. Poznavanje koncentracije plesni v zraku zato lahko vodi do ukrepov, ki bolnika zaščitijo pred glivno okužbo. Strokovna in znanstvena literatura na to tematiko podaja neenotne in včasih dvoumne informacije, kar se kaže v odsotnosti enotnih mednarodnih priporočil ali smernic, ki bi predpisovale metodologijo vzorčenja zraka in interpretacijo pridobljenih rezultatov. Kirurški oddelki in enote intenzivne terapije ter mikološki laboratoriji so tako prepuščeni sami sebi, kar vodi v precejšnje razlike v izvajanju mikološkega nadzora bolnišničnega okolja.

ABSTRACT

KEY WORDS: filamentous fungi, settle plate method, active sampling methods, healthcare-associated infections

Many infectious diseases are airborne, which is why their control is particularly challenging. These infections include various invasive mycoses caused by molds. The usual pathway of infection is inhalation of conidia. In a hospital environment, it can also occur through sedimentation of conidia in the anatomically otherwise sterile sites during surgical and other invasive procedures. Knowing the concentration of molds in the air can thus lead to measures that protect the patient against fungal infections. Literature on this subject provides inadequate and sometimes ambiguous information as evidenced in the absence of any international recommendations or guidelines that would define the methodology of air sampling and the interpretation of the obtained results. Surgical, intensive care units, and medical mycology laboratories are thus left to themselves, which leads to significant differences in the implementation of mycological surveillance in hospital environments.

¹ Asist. Rok Tomazin, univ. dipl. mikrobiol., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška 4, 1000 Ljubljana; rok.tomazin@mf.uni-lj.si

BOLNIŠNIČNE OKUŽBE, POVEZANE S PLESNIMI

Glivne okužbe, povezane z zdravstvom, se pojavljajo v okviru kontaminiranih infuzijskih pripravkov, posegov v primarno sterilna anatomna mesta, prenosov preko rok zdravstvenih delavcev, bioloških snovi in zraka (1–3). Bolnišnične invazivne mikoze predstavljajo problem predvsem v slabo zasnovanih zdravstvenih ustanovah (1). Največ opisanih primerov se nanaša na okužbe z vrstami iz rodov *Aspergillus* in *Mucorales*, ki so tudi sicer najpomembnejši in najpogostejši povzročitelji invazivnih mikoz med plesnimi (1, 4, 5). Bolnišnično pogojene aspergiloze in mukormikoze beležimo predvsem v enotah intenzivne terapije, neонатologije, hematologije in enotah za presaditve (4, 5). V teh enotah se namreč nahajajo bolniki, ki imajo zaradi poškodovanih anatomskih pregrad oz. stanj imunske pomanjkljivosti največje tveganje za razvoj invazivnih okužb. Vzrok okužb sta običajno vdihavanje konidijev oz. sporangiospor in usedanje teh na izpostavljena, primarno sterilna anatomna mesta (4–6). Bolnišnične glivne okužbe spodnjih dihal, ki se lahko preko krvi razširijo v različne organe in povzročijo sistemske okužbe, povezane z visoko smrtnostjo, so skupna točka večine oportunistično patogenih plesni in se pojavljajo predvsem pri imunsko oslabeledih bolnikih, zdravljenih v bolnišnicah (4, 5). V bolnišničnem okolju so pomembne še pooperativne okužbe ran in primarne okužbe kože kot posledica usedanja konidijev ali sporangiospor v kirurško rano ali na poškodovano kožo (4, 5). Med bolnišničnimi mukormikozami je pogostejša še gastrointestinalna oblika, ki se pojavi predvsem pri prezgodaj rojenih dojenčkih in osebah po opravljenih kirurških posegih v trebušni votlini (4). Vir okužb so največkrat gradbena in prenavljalna dela v bližini enot z bolniki z visokim tveganjem oz. v bližini bolnišnic (5). Konidiji in sporangiospore se širijo v prostore preko neustreznega prezračevanja bolniš-

ničnih prostorov (odprta okna, dovod nefiltriranega zraka, neustrezno očiščeni filtri ipd.) in preko kontaminiranih predmetov, kot so brizge, igle, gaze, elektronske naprave v operacijski dvorani in številne druge (4, 5, 7).

AEROMIKOTA – GLIVNA ZDRUŽBA V ZRAKU

Vir bolnišničnih mikoz je bolnišnična aeromikota, združba gliv, predvsem spor in konidijev, ki se nahajajo v zraku. Opravljenih je bilo več raziskav o pestrosti aeromikote v različnih zaprtih prostorih, tako v bolnišničnih kot v ostalih javnih in zasebnih ustanovah (1, 8, 9). Omenjene raziskave so med seboj zelo težko primerljive zaradi uporabe različnih metod vzorčenja, geografske lokacije, letnega časa in še nekaterih drugih aerobioloških spremenljivk. Kljub temu se v vseh kot najpogostejši glivni rodovi v zaprtih prostorih pojavljajo *Cladosporium*, *Penicillium* in *Aspergillus* (1, 8, 9). Vsi trije so medicinsko pomembni, čeprav so aspergili od vseh treh omenjenih edini prepoznani kot povzročitelji invazivnih okužb. Poleg *Cladosporium* spp., *Penicillium* spp. in *Aspergillus* spp. pogosto najdemo v bolnišnični aeromikoti še nekatere druge oportunistično patogene plesni, kot so *Rhizopus* spp., *Alternaria* spp. in *Trichoderma* spp., ter plesni, ki sproščajo mikotoksine, kot sta *Aspergillus versicolor* in *Stachybotrys chartarum* (1).

Med pomembnejše aerobiološke parametre, ki vplivajo na okužbe s plesnimi, sodijo velikost kužnih delcev, temperatura in relativna vlažnost prostora ter človeška aktivnost v vzorčenem prostoru (7, 10). Sestava aeromikote notranjih prostorov je poleg omenjenih parametrov odvisna tudi od zunanje aeromikote, ki se razlikuje glede na podnebne razmere, kot so padavine, hitrost vetra in letni čas (11, 12). Glede na samo velikost kužnih delcev delimo okužbe na tiste, ki se širijo preko kapljic (kapljični prenos), in tiste, ki se širijo preko aerosolov (aerogeni prenos). O kapljičnem preno-

su govorimo v primeru delca, večjega od 5 μm , o aerogenem prenosu pa v primerih, ko je delec manjši od 5 μm (7). Slednji na račun svoje velikosti dlje časa lebdi v zraku, se z zračnim tokom širijo in lahko prehajajo v spodnja dihala (7, 13). Konidiji večine plesni so bistveno manjši od 5 μm in ob ugodnih pogojih zlahka prepotujejo daljše razdalje po zraku (13). Konidiji vseh vrst plesni izražajo določeno stopnjo hidrofobnosti, ki vpliva na njihovo aerosolizacijo in širjenje po okolici. Konidiji vrste *Aspergillus fumigatus* so bistveno bolj hidrofobni od konidijev ostalih vrst in posledično uspešnejši pri širjenju v okolico že pri manjših premikih zraka (13). Majhna velikost (2–3 μm v premeru), sferična oblika in izrazita hidrofobnost površine konidijev *A. fumigatus* ter učinkovito prilagajanje na temperaturna nihanja, pomanjkanje hranil in različne relativne vlažnosti so glavni razlog, da je *A. fumigatus* najpogostejša in najpomembnejša oportunistično patogena plesen, ki jo najdemo v bolnišničnem okolju (1, 6, 9, 13).

VZORČENJE ZRAKA

Izmed vseh bolnišničnih okužb naj bi bila ena petina povezana z aerogenim ali kapljičnim prenosom, podobno velja za pooperativne okužbe ran (7). Plesni zaradi vseobsegajoče prisotnosti, enostavne aerosolizacije, sposobnosti dolgotrajnega lebdenja in prehajanja v notranje prostore predstavljajo posebno kategorijo bolnišničnih patogenov, ki jih je težko nadzorovati. Iz napisanega sklepamo, da je spremljanje »kužnosti« zrak za določene skupine bolnikov pomembno in se ga lahko lotimo na več načinov. Prvi je ugotavljanje števila in velikosti aerosoliziranih delcev, kar je v skladu z dopustnimi mejami po farmacevtski razvrstitvi čistih sob po standardu ISO 14644-1:2015. To metodo odlikujeta visoka ponovljivost in točnost, toda rezultati niso usklajeni z mikrobno bremenom, kar otežuje ocenitev tveganja za nastanek z zdravstvom poveza-

nih okužb (14, 15). Drugi način je mikrobiološki nadzor čistosti prostorov, pri katerem z mikrobiološkimi metodami pridemo do rezultatov, ki najbolj realno predstavijo mikrobno kontaminacijo in s tem tveganje za bolnika.

Z vzorčenjem zraka poskušamo poleg neposrednega tveganja za bolnika posredno opredeliti še ustreznost prezračevalnih in filtracijskih sistemov (vzorčenje operacijskih dvoran med mirovanjem) in ustreznost oz. spoštovanje pravil obnašanja in dela v operacijski dvorani (vzorčenje aktivnih, delujočih operacijskih dvoran) (14, 16).

Mikrobiološke metode vzorčenja zraka delimo na dve skupini:

- pasivno vzorčenje, ki temelji na usedanju mikrobov na trdna gojišča, in
- aktivno vzorčenje, ki temelji na črpanju zraka na trdna ali tekoča gojišča oz. različne tekočine.

Obe metodi sta namenjeni odkrivanju plesni in bakterij v zraku, različica aktivnega vzorčenja pa omogoča še odkrivanje virusov. Prav izbira tipa vzorčenja je glavna težava standardizacije preiskave, saj sta si metodi različni v skoraj vseh pogledih, od enostavnosti izvedbe, preko občutljivosti in natančnosti, pa vse do načina podajanja in interpretacije rezultatov. Številna priporočila in standardi podajajo mejne vrednosti za dopustne koncentracije plesni v zraku, vendar ne dajo jasnih informacij o načinu vzorčenja (16, 17).

Metodi veljata za precej enakovredni, vendar moramo izbrati eno ali drugo, saj kombiniranje metod lahko vodi v nejasno podajanje in interpretacijo rezultatov (16). Enakovrednost obeh metod se kaže predvsem pri vzorčenju prostorov, kjer pričakujemo višje mikrobno breme. Pri vzorčenju ultračistih prostorov, kot so npr. operacijske dvorane in bolniške sobe z nadtlakom, pa zaradi boljše občutljivosti prevladujejo metode aktivnega vzorčenja (17, 18).

PASIVNO VZORČENJE

Metode pasivnega vzorčenja zraka so se sprva uveljavile v proizvodnji zdravil in kasneje prešle še v zdravstvene ustanove. Pasivno vzorčenje vključuje zgolj sedimentacijsko metodo, pri kateri odprte agarске plošče za nekaj časa izpostavimo zraku v prostoru. Po končani izpostavitvi plošče pokrijemo in jih inkubiramo pri izbrani temperaturi, običajno 37 °C. Obstajajo številne različice, vendar je najbolj uveljavljena in dodelana metoda 1/1/1 – agarске plošče premera 9 cm za eno uro izpostavimo v prostoru en meter od tal in en meter od sten ter večjih objektov (19). Način vzorčenja je konstanten, razlikuje se predvsem raba gojišča, čas inkubacije in interpretacija rezultatov. Uporabljajo se številna trdna gojišča, glede na mikroorganizme, ki jih želimo dokazati v zraku. Med mikološkimi gojišči se najpogosteje uporabljata agar s sladnim ekstraktom in Sabouraudov agar (10, 17).

Sedimentacijska metoda temelji na usedanju konidijev in sporangiospor na izpostavljeno gojišče, zato so rezultati izraženi s hitrostjo usedanja v kolonijskih enotah (angl. *colony forming unit*, CFU) na kvadratni meter na uro (CFU/m²/h). S sedimentacijsko metodo tako ne dobimo podatka o količini mikroorganizmov v določeni prostornini zraka. Hitrost usedanja bakterij je bistveno večja kot hitrost usedanja plesni, saj so slednje prilagojene na lebdenje in potovanje po zraku. Posledično je tudi občutljivost sedimentacijske metode za detekcijo bakterij boljša, vsaj v primeru vzorčenja čistih prostorov (7, 10, 13). Nekatera priporočila tako odsvetujejo sedimentacijsko metodo za ugotavljanje koncentracije plesni v zraku (20). Večina priporočil in smernic, ki urejajo mikrobiološki nadzor bolnišničnega okolja, predvsem v operacijskih dvoranah, podaja mejne vrednosti v CFU na kubični meter (CFU/m³), ki so pridobljene z metodami aktivnega vzorčenja (16, 17, 19). Standardizaciji interpretacije rezultatov so se najbolj približali v Švici

s postavitvijo mejnih vrednosti za operacijske dvorane s turbulentnim zračnim tokom, in sicer do 786,4 CFU/m²/h (bakterije skupaj s plesnimi) za mirujoče dvorane ter do 3.932,1 CFU/m²/h (bakterije skupaj s plesnimi) za aktivne dvorane (17).

Pozitivne lastnosti sedimentacijske metode so enostavnost izvedbe, da metoda ne moti naravnega toka zraka, in rezultati, ki so v skladu z dejanskim tveganjem (na agarških ploščah dobimo mikroorganizme, ki z usedanjem v anatomsko sterilne predele dejansko lahko povzročijo okužbe). Med slabosti štejemo slabšo občutljivost v ultračistih prostorih in pomanjkanje mejnih vrednosti v mednarodnih smernicah (19).

AKTIVNO VZORČENJE

Aktivno vzorčenje zraka izvajamo z volumetričnimi metodami, pri katerih določeno prostornino zraka prečrpamo na trdna ali tekoča gojišča. Volumetrične metode so se v ultračistih prostorih izkazale za občutljivejše od sedimentacijske metode, saj zajamejo tudi mikroorganizme, ki se usedajo počasneje (17, 18).

V grobem ločimo impaktorsko in impinger-sko vzorčenje – pri prvem gre za črpanje zraka neposredno na agarске plošče, pri drugem pa v tekočino, ki jo lahko porabimo bodisi za inokulacijo agarških plošč bodisi za molekularno-biološke preiskave. Tako pri impaktorskem kot tudi impinger-skem vzorčenju poznamo več tipov vzorčevalnikov, ki se med drugim razlikujejo po možnostih hitrosti črpanja zraka, prostornini zajetega zraka in številu nosilcev agarških plošč. Pred izvedbo preiskave se moramo zavedati, da je zrak zelo kompleksen vzorec z mikrobiološko sestavo, ki je odvisna od številnih dejavnikov, to pa je povezano z majhno ponovljivostjo. Ključni pomen za podajanje in interpretacijo rezultatov ima torej prostornina zajetega zraka, ki je odvisna predvsem od stopnje čistosti vzorčenega prostora. Večjo zastopanost vzorca dosežemo z večjo prostornino, zato

se teži k vzorčenju čim večjih prostornin. V literaturi se pojavljajo različne prostornine za isti tip prostora, kar ovira pripravo enotnih smernic. Za operacijske dvorane se na primer priporoča odvzem od 0,25–2 m³ zraka (14, 16, 17). Omejitve v prostornini postavljajo tudi metode same. Z impaktorskimi vzorčevalniki, ki se uporabljajo rutinsko, ne moremo zajeti več kot 1 m³ zraka, saj se sicer gojišča preveč izsušijo. Z impingerskimi vzorčevalniki te težave nimamo, saj teoretično lahko vzorčimo tudi več kot 10 m³. Težava impingerskih vzorčevalnikov je v tem, da so za rutinsko delo nepraktični, zahtevnejši za pripravo, po vzorčenju pa tudi obdelava vzorcev od laboratorija zahteva kompleksnejšo obravnavo (lastne izkušnje).

Glavni adut volumetričnih metod so visoka občutljivost, omembe v nacionalnih smernicah in postavljene mejne vrednosti v CFU/m³ za različne tipe prostorov, predvsem operacijskih dvoran (14, 16, 17). Mejne vrednosti se v glavnem razlikujejo glede na tip prezračevanja operacijskih dvoran in aktivnosti v dvorani med vzorčenjem (dvorane v mirovanju in aktivne dvorane) (8, 16, 17). Mejne vrednosti so oblikovane še glede na izolate – za bakterije, plesni in obe skupini mikrobov skupaj. Prepoznali so tudi indikatorske mikroorganizme, ki morajo biti odsotni, taki so med plesnimi na primer vrste iz rodu *Aspergillus*, predvsem *A. fumigatus*, in vrste iz reda *Mucorales*, ki za bolnike predstavljajo največje tveganje (16). Enotnih mejnih vrednosti ni in se od priporočila do priporočila razlikujejo.

Nasprotniki volumetričnih metod vidijo glavno pomanjkljivost v vrtinčenju zraka med vzorčenjem, ker se s tem zmoti naravni tok zraka. Posledično naj bi dobili popačeno informacijo ocene tveganja, saj tako v oceni upoštevamo tudi mikroorganizme, ki v zraku zaradi težjega usedanja ne predstavljajo neposredne grožnje bolniku (19).

POGOSTOST VZORČENJA

Mednarodnih smernic in priporočil, ki bi predpisovala pogostost vzorčenja zraka na posameznih oddelkih, ni. Poleg strokovne in znanstvene literature obstajajo na to temo področna in državna priporočila (14, 16). Vzorčenje zraka se tako priporoča (16):

- rutinsko enkrat na šest mesecev,
- po obnovitvenih, adaptacijskih in ostalih gradbenih delih,
- po spremembah protokolov čiščenja in razkuževanja prezračevalnih sistemov,
- po daljši neuporabi prostorov in
- kadar so presežene mejne vrednosti.

ZAKLJUČEK

Plesni so pomembni povzročitelji z zdravstvom povezanih okužb, predvsem v populaciji imunsko oslabilih bolnikov. Z vzorčenjem zraka lahko prepoznamo tveganje za razvoj invazivne glivne okužbe, zato se vzorčenje priporoča v enotah intenzivne terapije, operacijskih dvoranh ter na hematoloških, transplantacijskih in neonatalnih oddelkih. Enotnih mednarodnih smernic ni priporočil, ki bi urejala področje mikološkega nadzora bolnišničnega okolja, ni, obstajajo državne smernice ter strokovna in znanstvena literatura, ki v veliki meri obravnava le okoliščine v operacijskih dvoranh in delno v bolniških sobah z nadtlačkom. Večina omenjene literature priporoča za vzorčenje zraka v čistih prostorih volumetrične metode, ki jih odlikuje visoka občutljivost. V prostorih, kjer je tveganje za glivne okužbe manjše in pričakujemo večje mikrobovno breme, so volumetrične metode načeloma enakovredne sedimentacijski metodi. Upamo, da bo v prihodnosti vzorčenje zraka standardizirano do te mere, da bo vključeno v mednarodne smernice in bomo z njim uspeli preprečiti čim več z zdravstvom povezanih glivnih okužb.

LITERATURA

1. Ökten S, Şen B, Asan A, et al. Airborne microfungi in oncology service of medical school hospital of Trakya University. *Indoor Built Environ*. 2015; 24 (6): 771–6.
2. Ökten S, Asan A. Airborne fungi and bacteria in indoor and outdoor environment of the pediatric unit of Edirne Government Hospital. *Environ Monit Assess*. 2012; 184 (3): 1739–51.
3. La Fauci V, Genovese C, Facciola A, et al. Five-year microbiological monitoring of wards and operating theatres in southern Italy. *J Prev Med Hyg*. 2017; 58 (2): E166–E172.
4. Rammaert B, Lanternier F, Zahar J-R, et al. Healthcare-associated mucormycosis. *Clin Infect Dis*. 2012; 54 (1): S44–54.
5. Weber DJ, Peppercorn A, Miller MB, et al. Preventing healthcare-associated *Aspergillus* infections: review of recent CDC/HICPAC recommendations. *Med Mycol*. 2009; 47 (1): S199–209.
6. Patterson TF, Thompson GR 3rd, Denning DW, et al. Practice guidelines for the diagnosis and management of aspergillosis: 2016 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2016; 63 (4): e1–e60.
7. Fernstrom A, Goldblatt M. Aerobiology and its role in the transmission of infectious diseases. *J pathog*. 2013; 2013: 1–13.
8. Leung M, Chan AH. Control and management of hospital indoor air quality. *Med Sci Monit*. 2006; 12 (3): SR17–23.
9. Sharma D, Dutta BK, Singh AB. Exposure to indoor fungi in different working environments: A comparative study. *Aerobiologia*. 2010; 26 (4): 327–37.
10. Bhatia L, Vishwakarma R. Hospital indoor airborne microflora in private and government owned hospitals in Sagar City, India. *World J Med*. 2010; 5 (3): 65–70.
11. Das S, Gupta-Bhattacharya S. Enumerating outdoor aeromycota in suburban West Bengal, India, with reference to respiratory allergy and meteorological factors. *Ann Agric Environ Med*. 2008; 15 (1): 105–12.
12. Irga P, Torpy F. A survey of aeromycota for urban Sydney and their relationships with environmental parameters. Australasian Mycological Society & Fungal Network of New Zealand Joint Meeting Conference. 2016.
13. Kwon-Chung KJ, Sugui JA. *Aspergillus fumigatus* what makes the species a ubiquitous human fungal pathogen? *PLoS Pathog*. 2013; 9 (12): e1003743.
14. Hoffman PN, Williams J, Stacey A, et al. Microbiological commissioning and monitoring of operating theatre suites. *J Hosp Infect*. 2002; 52 (1): 1–28.
15. Landrin A, Bissery A, Kac G. Monitoring air sampling in operating theatres: can particle counting replace microbiological sampling? *J Hosp Infect*. 2005; 61 (1): 27–9.
16. Linee guida sugli standard di sicurezza e di igiene del lavoro nel reparto operatorio. Istituto superiore per la prevenzione e la sicurezza del lavoro - Dipartimento Igiene del lavoro. [internet]. 2009. [citirano 2018 Apr 16]. Dosegljivo na: http://www.unipd-org.it/rls/Lineeguida/Rischio%20chimico%20cancerogeno/ISPESL_linee_guida_sicurezza_Sale_Operatorie.pdf
17. Napoli C, Marcotrigiano V, Montagna MT. Air sampling procedures to evaluate microbial contamination: a comparison between active and passive methods in operating theatres. *BMC Public Health*. 2012; 12: 594.
18. Napoli C, Tafuri S, Montenegro L, et al. Air sampling methods to evaluate microbial contamination in operating theatres: results of a comparative study in an orthopaedics department. *J Hosp Infect*. 2012; 80 (2): 128–32.
19. Pasquarella C, Pitzurra O, Savino A. The index of microbial air contamination. *J Hosp Infect*. 2000; 46 (4): 241–56.
20. Sehulster L, Chinn RY, Arduino M, et al. Guidelines for environmental infection control in health-care facilities. Morbidity and mortality weekly report recommendations and reports RR. Centers for Disease Control and Prevention. [internet]. 2003 [citirano 2018 Apr 16]. Dosegljivo na: [https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/rr5210a1.htm?utm_source=CureForUlcerativeColitis.com+Updates&utm_campaign=1a2a67bc8e-Update_100_Is_C.Diff._In_Your_Future%3F_02_17_15&utm_medium=email&utm_term=0_3da754d723-1a2a67bc8e-853119376ct=t\(Update_100_Is_C.Diff._In_Your_Future?_02_17_15\)&mc_cid=1a2a67bc8e&mc_eid=730a93cea3](https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/rr5210a1.htm?utm_source=CureForUlcerativeColitis.com+Updates&utm_campaign=1a2a67bc8e-Update_100_Is_C.Diff._In_Your_Future%3F_02_17_15&utm_medium=email&utm_term=0_3da754d723-1a2a67bc8e-853119376ct=t(Update_100_Is_C.Diff._In_Your_Future?_02_17_15)&mc_cid=1a2a67bc8e&mc_eid=730a93cea3)

Aleksander Mahnič¹, Aleksander Kocuvan², Maja Rupnik³

Analiza glivne združbe s pristopi sekvenciranja naslednje generacije

Analysis of Fungal Microbiota with Next Generation Sequencing Approach

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: sekvenciranje naslednje generacije, mikrobiota, glivna združba, kronične vnetne črevesne bolezni

Sekvenciranje naslednje generacije omogoča natančnejšo in hitrejšo analizo kompleksnih mikrobnih združb v primerjavi s klasičnimi gojitvenimi metodami. Čeprav večina raziskav ostaja osredotočenih na bakterijsko združbo, vse več novejših raziskav vključuje tudi analizo arhejske združbe, virusne združbe (viriom) ali glivne združbe (mikobiom). Glivne združbe so manj številčne in manj raznolike kot bakterijske, poleg tega je razlikovanje med komenzali in prehodno kolonizacijo pri njih težavno. V manjšem obsegu so bile glivne združbe opisane v spodnjih dihalih, na koži, v sečilih in spolovilih ter v največji meri v prebavilih. V glivni združbi človeka prevladujejo rodovi *Aspergillus* ter *Cladosporium* v dihalih, *Malassezia* na koži, *Candida* in *Pichia kudriavzevii* v nožnici ter *Candida*, *Malassezia*, *Cladosporium*, *Saccharomyces* in kvasovke iz družine *Dipodascaceae* v prebavilih. Pomen glivne združbe za zdravljenje različnih bolezni, njena presnovna aktivnost ter interakcije z gostiteljem in ostalimi predstavniki mikrobiote ostajajo izziv za prihodnje raziskave in predstavljajo potencial za nove diagnostične označevalce.

ABSTRACT

KEY WORDS: next generation sequencing, microbiota, mycobiota, inflammatory bowel diseases

Next generation sequencing allows a quicker and more accurate analysis of complex microbial communities. While the vast majority of research is still focused on bacterial microbiota, recent studies became more inclined to also investigate archaea, viruses (viriome), and fungi (mycobiome). Mycobiome has been studied to a smaller extent for the lower respiratory tract, skin, genitourinary tract, and more thoroughly in the gastrointestinal tract. In comparison to bacteria, fungal community exhibits lower richness and diversity. Additionally, it proved challenging to distinguish between commensals and transient colonizations. Studies on human mycobiota report the prevalence of *Aspergillus* and *Cladosporium* in the lower respiratory tract, *Malassezia* on the skin, *Candida* and *Pichia*

¹ Mag. Aleksander Mahnič, mag. mikrobiol., Oddelek za mikrobiološke raziskave, Center za medicinsko mikrobiologijo, Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Prvomajska ulica 1, 2000 Maribor; aleksander.mahnic@nlzoh.si

² Aleksander Kocuvan, prof. biol. in fiz., Medicinska fakulteta, Univerza v Mariboru, Taborska ulica 8, 2000 Maribor

³ Prof. dr. Maja Rupnik, univ. dipl. biol., Oddelek za mikrobiološke raziskave, Center za medicinsko mikrobiologijo, Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Prvomajska ulica 1, 2000 Maribor; Medicinska fakulteta, Univerza v Mariboru, Taborska ulica 8, 2000 Maribor

kudriavzevii in the genitourinary tract, and *Candida*, *Malassezia*, *Cladosporium*, *Saccharomyces* and yeast from the *Dipodascaceae* family in the gastrointestinal tract. Further investigation of the role of fungi in health and disease, metabolic activity and interactions with host and other microbiota residents presents a challenge for future research and a potential for new diagnostic markers.

ANALIZA MIKROBNIH ZDRUŽB S PRISTOPI SEKVENCIRANJA NASLEDNJE GENERACIJE

Ker številnih mikroorganizmov še vedno ni možno gojiti, je od prve tehnologije sekvenciranja po Sangerjevi metodi razvoj v smeri analize taksonomske sestave ter presnovnega potenciala mikroorganizmov potekal s pomočjo analize celokupne DNA mikrobnе združbe. Sangerjeva metoda sicer omogoča branje relativno dolgih odčitkov DNA (1.000–1.500 baznih parov) in ostaja zlati standard glede natančnosti, vendar je primerna zgolj za prepoznavo čistih izolatov ali posameznih genov (1).

Pred približno desetimi leti se je s pojavom tehnologije sekvenciranja naslednje generacije (angl. *next generation sequencing*, NGS) zgodil velik napredek na področju raziskovanja mikrobnih združb (2). Različni neodvisno razviti pristopi, med katerimi sta trenutno najbolj uporabljena sekvenciranje z ligacijo (Illumina) ter sekvenciranje z uporabo polprevodnika (Ion Torrent, Thermo Fisher Scientific), so omejeni na branje krajših odčitkov DNA (150–500 baznih parov) in pri branju v primerjavi z metodo Sanger vnašajo večjo napako (okvirno 1 %). Prednost omenjenih metod pa je, da omogočajo analizo mešanih združb, zato je celokupni izkupiček pridobljene informacije glede na časovni in denarni vložek neprimerno večji v primerjavi s predhodnimi metodami (1).

Tehnologija NGS v osnovi omogoča dva različna pristopa. Prvi vključuje pomnoževanje izbrane regije, navadno označevalskega gena, npr. gena za 16S rRNA pri bakterijah ter arhejah ali medgenske regije (angl. *internal transcribed spacer*, ITS) pri glivah. Pri

analizi zaporedja (praviloma glede na 97 % podobnost) razvrstimo v skupine, ki jih imenujemo operacijske taksonomske enote (angl. *operational taxonomic unit*, OTU). Vsaki OTU se nato glede na podobnost z referenčno bazo dodeli taksonomska pripadnost. Zaradi kratke dolžine zaporedja ter možnih napak pri odčitavanju baz je priporočena razporeditev le do taksonomskega nivoja rodu, medtem ko je določanje do vrste zahtevnejše ali v določenih primerih popolnoma odsvetovano. V primeru analize glivne združbe je sicer področje ITS dovolj raznoliko za ločevanje med vrstami, vendar težavo predstavljajo še pomanjkljive ter slabo urejene referenčne baze. Med slednjimi je trenutno najpogosteje uporabljena uporabniku prijazna nordijska ektomikorijska podatkovna baza za določanje medgenske regije (angl. *user-friendly nordic internal transcribed spacer ectomycorrhiza database*, UNITE) (3).

Drugi pristop tehnologije NGS vključuje branje celokupne DNA iz izbranega vzorca. Uporablja se pri sekvenciranju celotnega genoma ter za analizo taksonomske sestave ter celokupnega presnovnega potenciala v primeru mešanih združb, pri čemer lahko hkrati zaznamo vse prisotne organizme ter viruse (4). Izbor ustreznega pristopa tehnologije NGS je tako odvisen od raziskovalnega vprašanja ter denarnega dometa raziskave.

Trenutno se na tržišču uveljavljajo prve oblike tretje generacije sekvenciranja, ki omogočajo branje izredno dolgih odčitkov (PacBio, MinION – Oxford Nanopore), najdaljši trenutno poročani tudi do 50.000 baznih parov. Omenjena tehnologija zaradi

relativno nizke natančnosti branja ter nezanesljivosti trenutno še ni primerna za rutinsko uporabo (5).

GLIVNA ZDRUŽBA PRI ČLOVEKU

Čeprav v človekovi mikrobioti prevladujejo bakterije, najdemo na različnih anatomskih predelih tudi glive. Raziskave, ki opisujejo glive v zdravi populaciji ter pri različnih bolezenskih stanjih, so v primerjavi z raziskavami o bakterijah manj številčne, posledično je tudi razumevanje glivne združbe temu primerno še precej omejeno (6). Glivne združbe so bile v manjšem obsegu opisane v spodnjih dihalih, na koži, v sečilih in spolovilih ter v največji meri v prebavilih (7–11).

V preteklosti je vladalo prepričanje, da je spodnja dihalna pot sterilna, vendar so s tehnologijo NGS pokazali prisotnost pestre glivne združbe. Pri zdravi populaciji gre navadno za vdihane okoljske glive iz rodov *Aspergillus* ter *Cladosporium*, ki pa so prisotne v nizkem številu in se ob pravilnem delovanju imunskega sistema hitro odstranijo (7). Pri otrocih je kožna mikrobiota pestra in vključuje glive iz rodov *Malassezia*, *Aspergillus*, *Epicoccum* in *Phoma*, pri odraslih pa zaradi fizioloških sprememb izrazito prevladuje gliva *Malassezia* spp. (8, 9). Ta je povezana s pozitivnimi učinki, in sicer s tvorbo ligandov za aril-hidrokarbonske receptorje, ki pozitivno učinkujejo na zdravljenje epitelija ter na ta način posredno ščitijo pred UV-sevanjem (10). Raziskave s področja sečil in spolovila so v povezavi z glivami trenutno maloštevilne. Drell in sodelavci so preučevali bris nožnice ter pokazali prisotnost glive *Candida albicans* (34,1 %), *Pichia kudriavzevii* (2,3 %) ter *Candida parapsilosis* (0,3 %) (11).

ČREVESNA MIKROBIOTA IN GLIVE

Črevesna mikrobiota je obsežna združba mikroorganizmov, katerih številčnost ter sestava se vzdolž prebavil spreminjata. Igra

pomembno vlogo pri razgrajevanju raznovrstnih substratov, izgradnji bioaktivnih snovi, obrambi pred patogenimi organizmi ter ohranjanju pravilnega delovanja imunskega sistema in drugih organskih sistemov. Bakterije so kot najštevilčnejši predstavnik do sedaj najbolj preučen del črevesne mikrobiote (12, 13). Vse več pozornosti se namenja tudi ostalim predstavnikom, predvsem arhejam, virusom ter glivam (14–17).

Glive so drugo najštevilčnejše kraljestvo v črevesni mikrobioti, pri čemer se koncentracija celic med posamezniki izrazito razlikuje, in sicer 0–10⁹ CFU/g blata (bakterijskih kolonijskih enot, angl. *colony-forming units*, CFU) (18). Do sedaj je bilo v prebavilih opisanih že preko 200 glivnih rodov, vendar se večina opisanih vrst pojavi v samo enem ali nekaj vzorcih na raziskavo (19, 20). To je povezano s hrano kot pomembnim virom gliv v prebavilih, zato je sestava glivne združbe v veliki meri odvisna od kratkoročne diete in je ločevanje med pravimi komezali ter prehodnimi kolonizatorji izredno težavno. Merilo, ki ga v raziskavah največkrat uporabljajo za določitev komezalnih gliv, je njihova sposobnost rasti pri 37 °C. Glede na to merilo v črevesni mikrobioti najpogosteje zaznamo glive iz rodov *Candida*, *Malassezia*, *Cladosporium* ter kvasovke iz družine *Dipodascaceae* (19). Kvasovka *Saccharomyces cerevisiae* je sicer v mikrobioti redno med najpogosteje zastopanimi glivami, vendar se dokazano ne ohrani v prebavilih in je posledično ne uvrščamo med komezale (21). Ker pa je zaradi vnosa s hrano redno prisotna v visokem številu, sklepamo, da aktivno vpliva na črevesno okolje. Glivna združba v svetlini prebavil se v primerjavi z bakterijsko bolj spreminja v času, medtem ko so Luan in sodelavci pokazali, da je glivna združba na sluznici bolj stabilna in se manj spreminja v času (22).

Glive izkazujejo mnoge interakcije z bakterijsko združbo, pri čemer je bilo pokazano, da uravnavanje ene (glivne ali bakterijske) združbe s probiotiki ali protimikrobnimi

zdravili vodi v značilne spremembe v sestavi druge združbe (23–25). Prav tako so glivne povezane z delovanjem imunskega sistema, kar je podrobneje opisano v preglednem članku Wheelerja in sodelavcev (26).

ČREVESNA MIKROBIOTA V POVEZAVI Z BOLEZNIMI PREBAVIL

Spremembe v glivni združbi so bile opisane v povezavi z različnimi boleznimi, kot so kronična vnetna črevesna bolezen (KVČB), Crohnova bolezen, sindrom razdražljivega črevesja, peptična razjeda, z antibiotiki povezana driska ter hepatitis B (27–32). Največje tveganje za razvoj glivnih okužb predstavljajo imunsko oslabei posamezniki. Spremembe v glivni združbi so najbolje raziskane pri obolelih za hepatitisom B ter pri bolnikih s KVČB.

Sokol in sodelavci so pokazali značilne razlike v glivni združbi med bolniki s KVČB ter zdravimi prostovoljci. Pri vseh bolnikih s KVČB je bila povišana zastopanost *C. albicans* ter znižana zastopanost *S. cerevisiae*, pri bolnikih s Crohnovo boleznijo pa so dodatno pokazali še povišano razmerje *Basidiomycota/Ascomycota* ter povečano glivno raznolikost (27). O primerljivih izsledkih po analizi s sluznico povezane glivne združbe poročajo tudi Liguori in sodelavci (28). Ugotovili so povečano zastopanost rodu *Candida* ter na splošno višje glivno breme pri bolnikih s Crohnovo boleznijo v primerjavi s kontrolno skupino zdravih prostovoljcev.

Chen in sodelavci so v raziskavi z bolniki s hepatitisom B z gojitvenimi ter molekularnimi metodami pokazali, da se bogatost glivne združbe viša s stopnjo bolezni. Najnižja je pri zdravih prostovoljcih, sledijo asimptomatski nosilci virusa, najvišjo pestrost pa imajo bolniki s kroničnim hepatitisom B ter s hepatitisom B povezano cirozo (32).

PREGLED NAŠIH RAZISKAV ČREVESNE GLIVNE ZDRUŽBE

Analize glivne združbe so vključene v različne raziskave, ki potekajo v okviru našega raziskovalnega programa Črevesna mikrobiota – vloga v zdravju in pri boleznih. Za analizo uporabljamo sekvenciranje medgenske regije ITS2 s sistemom MiSeq (Illumina) na osnovi tehnologije NGS. V nadaljevanju podajamo kratek povzetek rezultatov dveh raziskav, in sicer raziskave na skupini zdravih prostovoljcev ter raziskave na skupini bolnikov, zdravljenih na Oddelku za gastroenterologijo Univerzitetnega kliničnega centra Maribor.

V raziskavo na zdravih prostovoljcih je bilo vključenih 186 zdravih posameznikov iz Maribora in širše okolice. Sodelujoči so oddali vzorec blata in izpolnili vprašalnik, ki je vključeval splošne podatke (spol, starost, teža, višina ter kraj stalnega bivališča) ter vprašanja glede dejavnikov, ki mogoče vplivajo na sestavo črevesne mikrobiote (prehranske navade, alergije na hrano, telesna aktivnost, kajenje, uživanje antibiotikov, probiotikov in prebiotikov, operacija slepega črevesa ali žolčnih kamnov, bolnišnično zdravljenje v preteklih treh mesecih, pretekla okužba z bakterijo *Clostridium difficile*, kronične črevesne bolezni, hitrost prebave ter stopnja stresa v zadnjem obdobju). Ugotovili smo, da v glivni združbi izrazito prevladuje deblo *Ascomycota* (slika 1A), pri čemer sta najvišje zastopani glivi *S. cerevisiae* (zaznana v 99 % vzorcev) ter *C. albicans* (zaznana v 62 % vzorcev). Skupaj smo dokazali prisotnost 257 OTU, ki so se uvrstile v 195 različnih rodov, pri čemer so se številne OTU pojavile samo pri enem ali nekaj prostovoljcih, kar se ujema s preteklimi raziskavami na tem področju (19). Na vzorec smo v povprečju dokazali 7,5 glivnih OTU, kar je veliko manj v primerjavi s povprečno 121,2 bakterijskimi OTU v isti kohorti. S statistično metodo permutacijske analize variance smo preverili, v kolikšni meri lahko raznolikost v bakterijski ter glivni

združbi obrazložimo s podatki, ki smo jih pridobili z vprašalnikom, pri tem pa smo uporabili vrednost za stopnjo zaupanja $< 0,05$ (rezultati niso prikazani). Edina dokazana statistično značilna povezava je bila med pestrostjo glivne združbe in časom, ki ga zdravi prostovoljec nameni rekreaciji ter športu (več časa kot ga zdravi prostovoljec nameni rekreaciji ter športu, večja je pestrost glivne združbe). Nasprotno je delež kvasovke *S. cerevisiae* v združbi pri prostovoljcih, ki se ukvarjajo s športom, manjši.

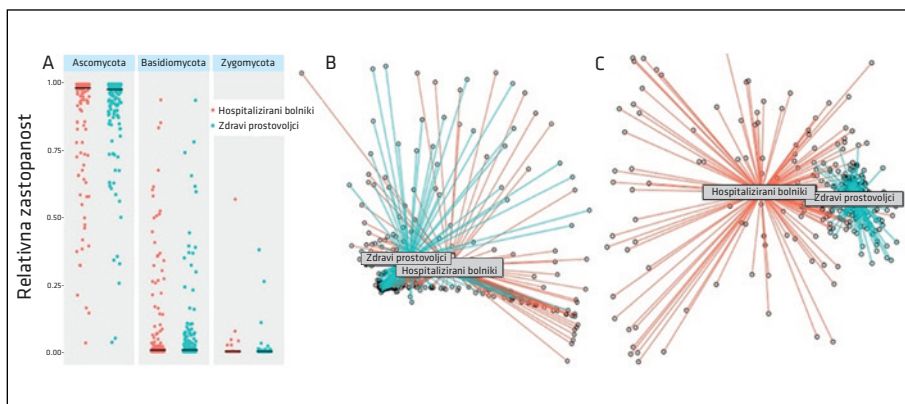
Zaradi visokega razmerja med prehodnimi glivami ter komezali smo se kot že druge raziskovalne skupine pred nami srečali s težavami pri iskanju povezav med demografskimi ter okoljskimi dejavniki in sestavo črevesne glivne združbe. Strati in sodelavci so edini, ki so v raziskavi na zdravi kohorti pokazali s starostjo ter spolom povezane vzorce v glivni združbi, medtem ko smo mi tovrstne povezave zaznali samo v bakterijski združbi (rezultati niso prikazani) (33).

V okviru raziskave smo v sodelovanju z Oddelkom za gastroenterologijo Univerzitetnega kliničnega centra Maribor pridobili 121 vzorcev bolnišnično zdravljenih bolnikov, pri katerih smo bakterijsko ter

glivno združbo analizirali v povezavi s postavljenimi diagnozo ter primerjali z zgoraj opisano skupino zdravih prostovoljcev. Pokazali smo, da je bakterijska združba v primerjavi z glivno združbo boljše napovednik bolezenskega stanja (slika 1B in 1C), pri čemer večinski del populacije bolnišnično zdravljenih bolnikov kaže večjo raznolikost ter znižano pestrost in bogatost bakterijske združbe znotraj vsakega posameznika. Glivna združba je v primerjavi z zdravo populacijo in ostalimi bolnišnično zdravljenimi bolniki najbolj spremenjena pri bolnikih s KVČB. Glede na informativnost pri napovedovanju zdravstvenega stanja posameznika so med glivami pomembne predvsem *C. albicans*, *S. cerevisiae* ter nevrščena gliva iz rodu *Dabaryomyces* (rezultati niso prikazani).

ZAKLJUČKI

Znanje o glivni združbi, še posebej v primerjavi z bakterijsko, je trenutno pomanjkljivo. Število raziskav, predvsem o povezavi med vzorci v mikrobioti ter različnimi bolezenskimi stanji, se v zadnjem času povečuje. S pristopi NGS lahko glivno združbo analiziramo na podoben način kot bakterijsko, le da so referenčne baze za glivna področja ITS



Slika 1. Primerjava glivne ter bakterijske združbe med skupinama zdravih prostovoljcev (modra) ter bolnišnično zdravljenih bolnikov na Oddelku za gastroenterologijo v Univerzitetnem kliničnem centru Maribor (rdeča). Relativne zastopanosti taksonomskega nivoja glivnih debel (A). Grafični prikaz na osnovi distančne matrike Bray-Curtis za glivno (B) ter bakterijsko mikrobno združbo (C).

v primerjavi z dostopnimi bazami za bakterijski gen za 16S rRNA še nedodelane. Glivna združba je v primerjavi z bakterijsko manj pestra, zato je ločevanje med komenzali ter prehodno kolonizacijo gliv, ki so bile zaužite s hrano, težavno. Ker pa so tudi glivne združbe presnovno visoko aktivne in v gostitelju pogosto prisotne v velikem številu, lahko tudi te vplivajo na presnovo in zdravje gostitelja.

Z našimi raziskavami smo pokazali, da je bakterijska združba pestrejša od glivne, medtem ko v glivni združbi z izjemo najvišje zastopanih rodov zaznamo predvsem kontaminacije iz hrane, ki se med posamezniki zelo razlikujejo. Pri skupini zdravih prostovoljcev smo prvi opazili, da so nekateri vzorci v glivni združbi odvisni od časa, ki ga prostovoljec posveti športu ter rekrea-

tivnim dejavnostim. V primeru bolnišnično zdravljenih bolnikov pa so se največje spremembe v glivni združbi pokazale pri obolelih za kroničnimi črevesnimi boleznimi, vendar je celokupno bakterijska združba veliko boljše kot glivna odražala bolezensko stanje ter razlike med bolnišnično zdravljenimi bolniki ter zdravo populacijo.

Z metodami, ki so trenutno na voljo za raziskovanje kompleksnih mikrobnih združb, je razlikovanje med vzročnimi in posledičnimi spremembami v mikrobioti pri različnih boleznih težavno. Glede na ujemanja v številnih raziskavah glivne združbe pri boleznih prebavil, predvsem pri kroničnih vnetnih črevesnih obolenjih, pa bi se lahko v prihodnosti izkazale kot učinkovit diagnostični označevalec.

LITERATURA

1. Shendure J, Balasubramanian S, Church GM, et al. DNA sequencing at 40: past, present and future. *Nature*. 2017; 550 (7676): 345–53.
2. Goodwin S, McPherson JD, McCombie WR. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nat Rev Genet*. 2016; 17 (6): 333–51.
3. Kõljalg U, Nilsson RH, Abarenkov K, et al. Towards a unified paradigm for sequence-based identification of fungi. *Mol Ecol*. 2013; 22 (21): 5271–7.
4. Zhou J, He Z, Yang Y, et al. High-throughput metagenomic technologies for complex microbial community analysis: open and closed formats. *mBio*. 2015; 6 (1): e02288-14.
5. Bleidorn C. Third generation sequencing: technology and its potential impact on evolutionary biodiversity research. *Syst Biodivers*. 2016; 14 (1): 1–8.
6. Limon JJ, Skalski JH, Underhill DM. Commensal fungi in health and disease. *Cell Host Microbe*. 2017; 22 (2): 156–65.
7. Van Woerden HC, Gregory C, Brown R, et al. Differences in fungi present in induced sputum samples from asthma patients and non-atopic controls: a community based case control study. *BMC Infect Dis*. 2013; 13: 69.
8. Jo J-H, Deming C, Kennedy EA, et al. Diverse human skin fungal communities in children converge in adulthood. *J Invest Dermatol*. 2016; 136 (12): 2356–63.
9. Gaitanis G, Magiatis P, Hantschke M, et al. The *Malassezia* genus in skin and systemic diseases. *Clin Microbiol Rev*. 2012; 25 (1): 106–41.
10. Velegraki A, Cafarchia C, Gaitanis G, et al. *Malassezia* infections in humans and animals: pathophysiology, detection, and treatment. *PLoS Pathog* [internet]. 2015 [citirano 2018 Apr 12]; 11 (1). Dosegljivo na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4287564/>
11. Drell T, Lillsaar T, Tummeleht L, et al. Characterization of the vaginal micro- and mycobiome in asymptomatic reproductive-age estonian women. *PLOS One*. 2013; 8 (1): e54379.
12. Donaldson GP, Lee SM, Mazmanian SK. Gut biogeography of the bacterial microbiota. *Nat Rev Microbiol*. 2016; 14 (1): 20–32.
13. Lynch SV, Pedersen O. The human intestinal microbiome in health and disease. Phimister EG, editor. *N Engl J Med*. 2016; 375 (24): 2369–79.
14. Norman JM, Handley SA, Baldridge MT, et al. Disease-specific alterations in the enteric virome in inflammatory bowel disease. *Cell*. 2015; 160 (3): 447–60.
15. Kernbauer E, Ding Y, Cadwell K. An enteric virus can replace the beneficial function of commensal bacteria. *Nature*. 2014; 516 (7529): 94–8.
16. Lewis JD, Chen EZ, Baldassano RN, et al. Inflammation, antibiotics, and diet as environmental stressors of the gut microbiome in pediatric Crohn's disease. *Cell Host Microbe*. 2015; 18 (4): 489–500.
17. Chehoud C, Dryga A, Hwang Y, et al. Transfer of viral communities between human individuals during fecal microbiota transplantation. *mBio*. 2016; 7 (2): e00322-16.
18. Huseyin CE, Rubio RC, O'Sullivan O, et al. The fungal frontier: A comparative analysis of methods used in the study of the human gut mycobiome. *Front Microbiol* [internet]. 2017 [citirano 2017 Nov 29]; 8. Dosegljivo na: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2017.01432/full>
19. Hallen-Adams HE, Suhr MJ. Fungi in the healthy human gastrointestinal tract. *Virulence*. 2016; 8 (3): 352–8.
20. Nash AK, Auchtung TA, Wong MC, et al. The gut mycobiome of the Human Microbiome Project healthy cohort. *Microbiome* [internet]. 2017 [citirano 2017 Dec 15]; 5. Dosegljivo na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5702186/>
21. Elmer GW, McFarland LV, Surawicz CM, et al. Behaviour of *Saccharomyces boulardii* in recurrent *Clostridium difficile* disease patients. *Aliment Pharmacol Ther*. 1999; 13 (12): 1663–8.
22. Luan C, Xie L, Yang X, et al. Dysbiosis of fungal microbiota in the intestinal mucosa of patients with colorectal adenomas. *Sci Rep* [internet]. 2015 [citirano 2018 Apr 12]; 5. Dosegljivo na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4648387/>
23. Kühbacher T, Ott SJ, Helwig U, et al. Bacterial and fungal microbiota in relation to probiotic therapy (VSL#3) in pouchitis. *Gut*. 2006; 55 (6): 833–41.
24. Dollive S, Chen Y-Y, Grunberg S, et al. Fungi of the murine gut: episodic variation and proliferation during antibiotic treatment. *PLoS One* [internet]. 2013 [cited 2018 Mar 5]; 8 (8). Dosegljivo na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3747063/>

25. Wheeler ML, Limon JJ, Bar AS, et al. Immunological consequences of intestinal fungal dysbiosis. *Cell Host Microbe*. 2016; 19 (6): 865–73.
26. Wheeler ML, Limon JJ, Underhill DM. Immunity to commensal fungi: detente and disease. *Annu Rev Pathol Mech Dis*. 2017; 12: 359–385.
27. Sokol H, Leducq V, Aschard H, et al. Fungal microbiota dysbiosis in IBD. *Gut*. 2016 Feb 3; gutjnl-2015-310746.
28. Liguori G, Lamas B, Richard ML, et al. Fungal dysbiosis in mucosa-associated microbiota of Crohn's disease patients. *J Crohns Colitis*. 2016; 10 (3): 296–305.
29. Botschuijver S, Roeselers G, Levin E, et al. Intestinal fungal dysbiosis is associated with visceral hypersensitivity in patients with irritable bowel syndrome and rats. *Gastroenterology*. 2017; 153 (4): 1026–39.
30. Ramaswamy K, Correa M, Koshy A. Non-healing gastric ulcer associated with *Candida* infection. *Indian J Med Microbiol*. 2007; 25 (1): 57–8.
31. Krause R, Reisinger EC. *Candida* and antibiotic-associated diarrhoea. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis*. 2005; 11 (1): 1–2.
32. Chen Y, Chen Z, Guo R, et al. Correlation between gastrointestinal fungi and varying degrees of chronic hepatitis B virus infection. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2011 Aug; 70 (4): 492–8.
33. Strati F, Di Paola M, Stefanini I, et al. Age and gender affect the composition of fungal population of the human gastrointestinal tract. *Front Microbiol* [internet]. 2016 [citirano 2017 Nov 29]; 7. Dosegljivo na: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fmicb.2016.01227/abstract>

Prispelo 20. 4. 2018

Vladan Rajič¹, Janez Jazbec², Simona Lucija Avčin³, Lidija Kitanovski⁴

Intestinalna mukormikoza – prikaz dveh primerov

Intestinal Mucormycosis – A Report of Two Cases

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: intestinalna mukormikoza, levkemija

Intestinalna mukormikoza je izredno redka izraženost bolezn pri pediatričnih onkoloških bolnikih. Diagnoza bolezn je zahtevna zaradi neznačilnih simptomov in znakov. Stanje bolnika pogosto otežuje invazivne diagnostične postopke. Zdravljenje mora biti večmodalno (ustrezno sistemsko protiglivno in kirurško zdravljenje). Na nadzor bolezn vpliva tudi vrednost nevtrofilcev pri bolniku. Predstavili smo naša bolnika, ki sta imela v osnovi hematološko maligno bolezen (ponovitev akutne mieloblastne levkemije in akutne limfoblastne levkemije visokega tveganja). Oba sta zbolela za intestinalno mukormikozo, povzročeno z *Rhizopus oryzae*. Kljub ustreznemu zdravljenju obeh bolnikov je bil izid različen.

ABSTRACT

KEY WORDS: intestinal mucormycosis, leukemia

Intestinal involvement is an extremely rare presentation of mucormycosis in children with malignancy. Due to non-specific symptoms, establishing a diagnosis is very often difficult. Invasive diagnostic procedures are similarly challenging. Early multimodal treatment (appropriate systemic antifungal therapy and early surgery) are essential for success. Rising neutrophils aid in disease control. We presented two patients with an underlying hematological malignancy (relapse of acute myeloblastic leukemia and high risk acute lymphoblastic leukemia). Both of them had intestinal mucormycosis caused by *Rhizopus oryzae*. Despite the appropriate treatment of both patients, the outcome differed.

¹ Asist. dr. Vladan Rajič, dr. med., Klinični oddelek za otroško hematologijo in onkologijo, Pediatrična klinika, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Bohoričeva ulica 20, 1000 Ljubljana; vladan.rajic@kclj.si

² Izr. prof. dr. Janez Jazbec, dr. med., Klinični oddelek za otroško hematologijo in onkologijo, Pediatrična klinika, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Bohoričeva ulica 20, 1000 Ljubljana

³ Asist. Simona Lucija Avčin, dr. med., Klinični oddelek za otroško hematologijo in onkologijo, Pediatrična klinika, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Bohoričeva ulica 20, 1000 Ljubljana

⁴ Dr. Lidija Kitanovski, dr. med., Klinični oddelek za otroško hematologijo in onkologijo, Pediatrična klinika, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Bohoričeva ulica 20, 1000 Ljubljana

UVOD

Mukormikoze so agresivno potekajoče glivne okužbe, povezane z visoko smrtnostjo, ki jih povzročajo plesni iz reda *Mucorales*. Med skupinami gliv, ki povzročajo okužbe pri ljudeh, so po pogostosti na tretjem mestu, za glivami iz rodov *Candida* in *Aspergillus* (1). Plesni iz reda *Mucorales* so ubikvitarno prisotne in zelo razširjene. Razmnožujejo se hitro in obilno s sporangiosporami. Okužbe najpogosteje povzročajo vrste iz rodov *Rhizopus*, *Mucor*, *Lichtheimia* (predhodno znan kot *Absidia*), *Cunninghamella*, *Rhizomucor*, *Apophysomyces* in *Saksenaea* (2).

Dejavniki tveganja

Mukormikoze načeloma izkazujejo nizko stopnjo virulence, zato se okužbe pojavljajo le pri imunsko oslabeledi populaciji. Čeprav je imunska pomanjkljivost dejavnik tveganja za invazivno bolezen, je pojavnost mukormikoz pri bolnikih z imunsko pomanjkljivostjo manjša v primerjavi z invazivno aspergilozo. Pomembni dejavniki tveganja so hematološka maligna bolezen, presaditev matičnih celic hematopoeze (MCH), presaditev čvrstih organov in prisotnost boleznih presadka proti gostitelju (3). Med dejavnike tveganja sodi tudi sladkorna bolezen s pojavnostjo mukormikoz pri 9–36 % primerov (4). Preobremenitev z železom, zdravljenje z deferoksaminom, intravenozno dajanje zdravil in ledvična odpoved so zlasti pri otrocih manj pogosti, vendar dobro znani dejavniki tveganja. S kožno mukormikozo so še posebej povezane opekline in travmatske rane. Nedonošenost je glavni dejavnik tveganja za pojav gastrointestinalne in kožne mukormikoze pri novorojenčkih (3–5).

Klinična slika

Najpogostejše oblike boleznih so rino-orbito-cerebralna, pljučna, kožna in gastrointestinalna mukormikoza. Razsejana bolezen ugotavljamo pri 32–38 % pediatričnih bolnikov in pri več kot polovici novorojenčkov, obolelih za mukormikozo (5, 6). Porazdeli-

tev pojavnosti določene oblike boleznih je odvisna od osnovnega dejavnika tveganja za pojav mukormikoze. Tako so rino-orbito-cerebralno obliko boleznih s pričetkom v maksilarnem sinusu ugotavljali pri do 66 % bolnikov s sladkorno boleznijo (7). Okužba se začne v nosni votlini in se z žilno invazijo širi v orbito, obnosne votline, lobanjske kote in možgane. Bolezen se kaže z vročinskim stanjem in napredujočim vnetjem obnosnih votlin, glavobolom, izcedkom iz nosu in bolečinami. Slednje so lahko zelo hude tudi zaradi ishemije tkiv ob glavni žilni invaziji. Prisotna je nekroza tkiva, ki se širi (v obliki črne eshare) z zajetjem sluznice nosu, neba, pripadajoče kože obraza, orbit in možganov (3).

Pljučna mukormikoza prizadene večino hudo imunsko oslabeledi bolnike (bolnike s hematološko maligno boleznijo, po presaditvi MCH z boleznijo presadka proti gostitelju ali brez nje). Zaradi žilne invazije lahko pride do tromboze, infarkta in nekroze okuženega tkiva. Klinično ugotavljamo pri bolniku z vročinskim stanjem bolečine v prsnem košu in hemoptize ob radiološko napredujoči pljučnici, pogosto s hemoragičnim plevralnim izlivom. Smrtnost ob pljučni mukormikози je zelo visoka, do 80 % (3). Če pride do razsejane oblike boleznih, je smrtnost še večja, do 96 % (3, 7, 8).

Kožna mukormikoza, ki predstavlja do 19 % vseh mukormikoz oz. do 27 % mukormikoz pri pediatričnih bolnikih, se klinično kaže z vnetnimi znaki okužene kože in podkožja, ki napreduje do nekroze oz. eshare (9). V neonatalnem obdobju pogosteje ugotavljamo gastrointestinalno (54 %) in kožno (36 %) obliko boleznih v primerjavi z ostalo pediatrično populacijo. Gastrointestinalna mukormikoza se kaže pri novorojenčkih kot nekrozantni enterokolitis in ima visoko smrtnost (78 %) (9).

PREDSTAVITEV PRIMEROV

Predstavljamo dva bolnika z gastrointestinalno mukormikozo, ki se je pojavila v po-

teku zdravljenja hematološke maligne bolezni.

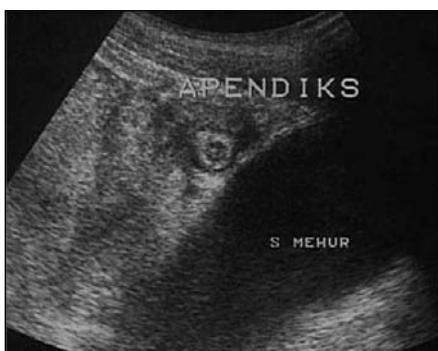
Prvi klinični primer

Štirinajstletnega bolnika smo zdravili zaradi akutne mieloične levkemije, podtip M2 (AML-M2) po protokolu AML-BFM 98. Med indukcijsko kemoterapijo smo pri bolniku ugotovili pljučno-žilno invazivno aspergilozo. Bolnik je imel sistemsko alergijsko reakcijo tako na klasično kot tudi na liposomalno obliko amfotericina B (L-AmB), zato smo ga zdravili z vorikonazolom, najprej parenteralno, nato peroralno. Po zaključku šestmesečnega intenzivnega zdravljenja je nadaljeval z vzdrževalno kemoterapijo. Slednja naj bi trajala 12 mesecev. Po šestih mesecih vzdrževalnega zdravljenja smo pri bolniku ugotovili osamljeno ponovitev AML v kostnem mozgu. Bolnik je prejel nato prvi petdnevni blok za zdravljenje ponovitve po shemi FLAG (protokol AML BFM REZ), v sestavi: fludarabin, citarabin v visokem odmerku intravensko in citarabin intratekalno. Po zaključku slednjega je pričel s prejemanjem rekombinantnega rastnega dejavnika za granulocite (filgrastim dnevno, subkutano). Prejemal je tudi zaščito s trimetoprim-sulfometoksazolom in flukonazolom peroralno. Dvanajsti dan po zaključku kemoterapije FLAG je bil sprejet v bolnišnico zaradi povišane telesne temperature ob težki nevtropeniji (absolutno

število nevtrofilcev je bilo $< 500/\text{mm}^3$) in bolečin v desni polovici trebuha. Težave naj bi se pojavile nenadoma, dve uri pred sprejemom. Ob sprejemu so bili prisotni klinični znaki akutnega abdomna. UZ trebuha je pokazal znake akutnega vnetja slepiča (slika 1).

Bolnika smo takoj pričeli zdraviti s parenteralnimi antibiotiki (ceftriakson, gentamicin, metronidazol). Narejena je bila tudi kirurška odstranitev gangrenoznega slepiča, slepega črevesa in končnega dela ileuma. Po odstranitvi je bila narejena ileocekalna anastomoza. Bolnik je nadaljeval z antibiotičnim zdravljenjem. Hemokulture, odvzete ob sprejemu in pred uvedbo antibiotičnega zdravljenja, so ostale negativne. Dva dni po operaciji je prišlo do spontanega razprtja kirurške rane s hkratnim pojavom gangrenoznih sprememb predela rane ter okolnega tkiva (slika 2).

Iz brisov znotraj trebušne votline in kirurške rane je bil osamljen *Rhizopus oryzae*. Parenteralno smo uvedli vorikonazol. Četrty dan po prvi operaciji so se ponovno pojavili klinični znaki akutnega abdomna. Postavljen je bil sum na predrtje črevesja, zato je bil bolnik ponovno operiran. Ugotovljeno je bilo napredovanje gangrene ileuma, narejena je bila dodatna odstranitev črevesja ter ileostoma. Istočasno smo ugotavljali izboljšanje krvne slike s ponovnim pojavom levkemičnih celic v periferni krvi. Kljub omenjenim ukrepom se je bolnikovo



Slika 1. UZ akutnega vnetja slepiča.



Slika 2. Gangrenozne spremembe predela kirurške rane.

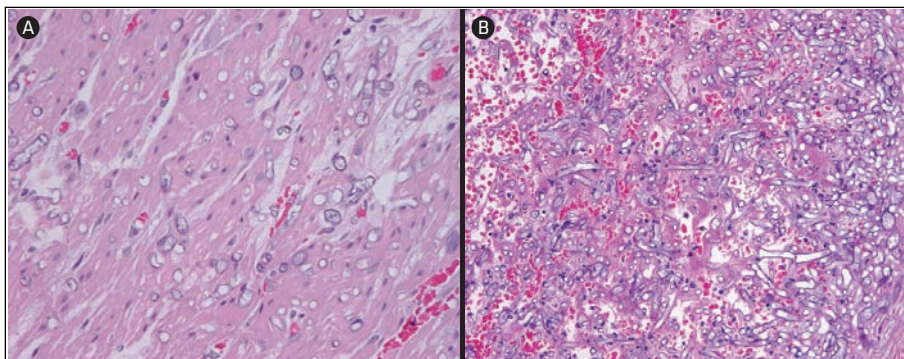
stanje naglo slabšalo, napredovale so gangrenozne spremembe črevesja in tudi trebušne stene. Prišlo je do smrtnega izhoda.

Patohistološka preiskava odstranjene črevesja je pokazala glivno invazijo tkiva in žilja (slika 3).

Drugi klinični primer

Pri enajstletnem bolniku smo diagnosticirali običajno (angl. *common*) B-celično akutno limfoblastno levkemijo (ALL) s translokacijo t(9;22)(q34;q11) *BCR/ABL1* (Philadelphia kromosom), kar je razvrstilo bolnika v skupino visokega tveganja. Pregled možgansko-hrbtenjačne tekočine ob diagnozi je potrdil infiltracijo osrednjega živčnega sistema z limfoblasti. Bolnika smo zdravili po ustreznem protokolu (ALL IC-BFM 2009) po shemi za skupino visokega tveganja. Poleg kombiniranega zdravljenja s kemoterapijo je od 15. dneva zdravljenja dalje prejemal imatinib mesilat (inhibitor tirozin kinaze). Bolnika smo predčasno sprejeli v bolnišnico v 18. dnevu indukcijskega zdravljenja zaradi slabega počutja, slabosti in bolečin v trebuhu. V laboratorijskih izvidih smo ob pancitopeniji ugotavljali povišane vrednosti bilirubina, znižano vrednost serumskega albumina, blago hiponatriemijo in hipokaliemijo. Vnetni parametri so ostali nizki. Po odvzemu kužnin smo pričeli z izkustvenim antibiotičnim zdravljenjem s kombinacijo piperacilin/tazobaktam

(PIP/TAZO) in z vankomicinom. Z UZ trebuha smo že ob sprejemu ugotovili nekaj proste tekočine v trebuhu, jetra so bila mejno povečana. Vidni so bili znaki parenhimske okvare jeter, portalna vena je bila prehodna. Prisotna je bila tudi difuzno zadebeljena črevesna stena v sklopu nevtropeničnega kolitisa. Hemokulture so bile negativne. Bolečine v trebuhu so vztrajale in se nekoliko stopnjevale. Bolnik je odvajal mehkejšo blato, prehodno tudi s primesjo krvi. Zaradi motenega strjevanja krvi po kemoterapiji je prejel parenteralno vitamin K, kasneje še koncentrat fibrinogena. Zaradi slike nevtropeničnega kolitisa je prehodno prejemal tudi vankomicin peroralno. Ob prvem izboljšanju stanja smo se odločili za nadaljevanje kemoterapevtskega zdravljenja. Pregled kostnega mozga je pokazal zadovoljivo remisijo 33. dan indukcijskega kemoterapevtskega zdravljenja. Istega dne je kontrolni UZ trebuha pokazal manj proste tekočine kot ob predhodnih pregledih, večja jetra in črevesne vijuge normalnega videza. Zaradi vztrajanja vročinskega stanja in težke nevtropenije smo PIP/TAZO izkustveno zamenjali za meropenem. Slednjega smo ukinili po 72 urah ob tem, ko so hemokulture ostale negativne. Ezofagogastroskopijska je pokazala le erozije požiralnika. Barvanje odvzetih vzorcev sluznice požiralnika na herpes virus in virus citomegalije je bilo negativno. V 38. dnevu zdravljenja je prišlo



Slika 3. Patohistološka slika glivne invazije (*Rhizopus oryzae*) tkiva in žil (A, B).

do poslabšanja stanja bolnika z močnejšimi bolečinami v trebuhu, s poslabšanjem vročinskega stanja in slabšim splošnim počutjem. Iz takrat odvzetih hemokultur smo osamili *Pseudomonas aeruginosa*. Bolnika smo zdravili s PIP/TAZO, z vankomicinom in prehodno gentamicinom. Slika kolitisa se je v času izzvenenja nevtropenije poslabšala, z znaki vnetja slepega črevesa in nato pankolitisa. Zaradi bolečin v trebuhu smo uvedli analgetično mešanico in ob poslabšanju spremenili antibiotično zdravljenje (prejemal je vankomicin, ceftazidim in metronidazol). Ves čas zdravljenja je bolnik prejemal parenteralno zaščito z mikafunginom. Iz vzorca blata, odvzetega 44. dne zdravljenja, smo osamili glivi *Candida parapsilosis* in *R. oryzae*. Ob tem sta bili dve vrednosti serumskega (1,3)- β -D glukana jasno pozitivni (452,0 pg/ml in 325 pg/ml). Z UZ in s CT smo potrdili absces v desnem spodnjem delu trebuha in perkutano vstavili dren v abscesno votlino. Po drenih je pričela pritekati črevesna vsebina, iz tekočine abscesa smo osamili *P. aeruginosa* in *R. oryzae*. Pričeli smo zdravljenje z L-AmB v odmerku 5 mg/kg telesne teže na dan. Z UZ smo ugotavljali ponovno nabiranje tekočine ob slepem črevesu, zato smo se odločili za operativni poseg. Opravljena je bila laparoskopija, ki so jo spremenili v medialno laparotomijo, odstranili so slepo črevo, ki je bilo na več mestih predrto, in sicer normalen slepič ter vstavili dva drena. Iz vzorcev tkiva iz trebušne votline so osamili *P. aeruginosa* in *R. oryzae*, s konice trebušnega drena pa le *P. aeruginosa*. Bolnik je nadaljeval s prejetjem antibiotičnega zdravljenja (gentamicin in metronidazol) še 14 dni po operativnem zdravljenju. Intenzivno zdravljenje z L-AmB v omenjenem odmerku je trajalo šest tednov. Bolnik je nadaljeval tudi s predvidenim zdravljenjem s kemoterapijo. Ves čas je prejemal zaščito z L-AmB v odmerku 3,5 mg/kg telesne teže, tri dni v tednu. Štiri mesece po opisanem dogodku smo bolnika zdravili z alogeno presaditvijo kostne-

ga mozga skladnega sorodnega dajalca. Bolnik je prejemal omenjeno zaščito z L-AmB tudi v času priprave na presaditev ter aplazije kostnega mozga, vse do ugnezditve presadka. Po ugnezditvi presadka je imel bolnik bolezen presadka proti gostitelju na nivoju kože (gradus II–III), ki se je dobro odzvala na sistemsko zdravljenje s kortikosteroidi. Med zdravljenjem s kortikosteroidi je bil bolnik na že omenjeni protiglivni zaščiti. V večkrat ponovljenem vzorčenju blata za preiskavo na mukormikozo slednje v nadaljnjem poteku zdravljenja nismo več zaznali. Bolnik je v remisiji osnovne hematološke maligne bolezni.

RAZPRAVA IN ZAKLJUČEK

Intestinalna mukormikozna je redek zaplet zdravljenja raka pri otrocih in mladostnikih. Ugotavljanje prizadetosti črevesja in povzročitelja je zahtevno, še posebej v luči nevtropenije, povzročene s kemoterapijo, in vnetja slepega črevesa (10). Radhakrishnan in sodelavci opisujejo 12 primerov pediatričnih onkoloških bolnikov z intestinalno mukormikozo (11). Pri pediatrični populaciji je najpogosteje prizadet želodec, sledita mu debelo in tanko črevo (12). Pri pediatričnih onkoloških bolnikih je bilo tanko črevo prizadeto z okužbo v devetih od 12 primerov (11). Pri večini bolnikov se intestinalna mukormikozna kaže z neznčilnimi simptomi in znaki: povišano telesno temperaturo, bolečinami v trebuhu in drisko. Na izid zdravljenja vplivajo pravočasna, zgodnja diagnoza, ustrezno sistemsko protiglivno zdravljenje in kirurška odstranitev nekrotičnega tkiva. Kljub navedenim ukrepom ostaja smrtnost zaradi intestinalne mukormikoze visoka, več kot 40%. Pri bolnikih s hematološko maligno boleznijo in po presaditvi MCH smrtnost dosega celo 65–90% (13, 14). V raziskavi Radhakrishnana in sodelavcev je pri pediatričnih onkoloških bolnikih z intestinalno mukormikozo ugotovljena 58% smrtnost (11).

Za diagnozo bolezní je pomembna potrditev prisotnosti povzročitelja v vzorcu prizadetega tkiva ali v kulturi oz. na gojišču. Pogosto je pridobitev vzorca prizadetega tkiva zahteven poseg pri onkoloških bolnikih, ki so v mielosupresiji. Klinična slika in radiološke preiskave lahko posnemajo okužbo z *Aspergillus fumigatus* (12, 13). V odsotnosti zanesljive neinvazivne diagnostične metode je pričetek zdravljenja mukormikoze pogosto pozen. L-AmB je učinkovito zdravilo za zdravljenje mukormikoz in doseže dobro koncentracijo v možganih in retikuloendotelijskem sistemu. Zato ostaja zdravilo prve izbire za zdravljenje mukormikoz s poudarkom na pomenu istočasnega večmodalnega zdravljenja (ustrezno sistemsko protiglivno zdravljenje, kirurško in zdravljenje osnovne bolezni) tudi po smernicah ECIL-6 (15, 16). Poleg amfotericina B je *in vitro* dokazano, da sta tudi posakonazol in isavukonazol učinkovito zdravila za zdrav-

ljenje mukormikoz (17). Pričetek zdravljenja s sistemskim protiglivnim zdravljenjem znotraj šestih dni od diagnoze pomembno vpliva na izid (18).

Okrevanje iz nevtropenije ostaja poglaviti dejavnik, ki vpliva na nadzor bolezni. Oba naša bolnika sta bila ob pojavu intestinalne mukormikoze v hudi nevtropeniji. Tudi stanje osnovne bolezni (aktivna onkološka bolezen ali remisija) pomembno vpliva na nadzor bolezni (11, 13).

Intestinalna mukormikoza je izredno redek izraz bolezni pri pediatričnih onkoloških bolnikih. Diagnoza bolezni je zahtevna zaradi neznačilnih simptomov in znakov, stanje bolnika pa pogosto otežuje invazivne diagnostične postopke. Zdravljenje mora biti večmodalno (ustrezno sistemsko protiglivno in kirurško zdravljenje). Na nadzor bolezni vpliva tudi število nevtrofilcev pri bolnikih, njihova sposobnost okrevanja in nadzor maligne bolezni.

LITERATURA

1. Kriengkauykiat J, Ito JI, Dadwal SS. Epidemiology and treatment approaches in management of invasive fungal infections. *Clin Epidemiol*. 2011; 3: 175–91.
2. Pongas GN, Lewis RE, Samonis G, et al. Voriconazole-associated zygomycosis: a significant consequence of evolving antifungal prophylaxis and immunosuppression practices? *Clin Microbiol Infect*. 2009; 15 Suppl 5: 93–7.
3. Petrikkos G, Skiada A, Lortholary O, et al. Epidemiology and clinical manifestations of mucormycosis. *Clin Infect Dis*. 2012; 54 Suppl 1: S23–34.
4. Skiada A, Pagano L, Groll A et al. European confederation of medical mycology working group on zygomycosis. Zygomycosis in Europe: analysis of 230 cases accrued by the registry of the European confederation of medical mycology (ECMM) working group on zygomycosis between 2005 and 2007. *Clin Microbiol Infect*. 2011; 17 (12): 1859–67.
5. Morace G, Borghi E. Invasive mold infections: virulence and pathogenesis of mucorales. *Int J Microbiol*. 2012; 2012: 349278.
6. Pana ZD, Seidel D, Skiada et al. Collaborators of Zygomycosis.net and/or FungiScope Registries. Invasive mucormycosis in children: an epidemiologic study in European and non-European countries based on two registries. *BMC Infect Dis*. 2016; 16 (1): 667.
7. Roden MM, Zaoutis TE, Buchanan WL et al. Epidemiology and outcome of zygomycosis: a review of 929 reported cases. *Clin Infect Dis*. 2005; 41 (5): 634–53.
8. Tacke D, Koehler P, Markiefka B et al. Our 2014 approach to mucormycosis. *Mycoses*. 2014; 57 (9): 519–24.
9. Roilides E, Zaoutis TE, Walsh TJ. Invasive zygomycosis in neonates and children. *Clin Microbiol Infect*. 2009; 15 Suppl 5: 50–4.
10. Karanth M, Taniere P, Barraclough et al. A rare presentation of zygomycosis (mucormycosis) and review of the literature. *J Clin Pathol*. 2005; 58 (8): 879–81.
11. Radhakrishnan N, Yadav SP, Oberoi J. Intestinal mucormycosis: a rare entity in pediatric oncology. *Pediatr Hematol Oncol*. 2013; 30 (3): 178–83.
12. Zaoutis TE, Roilides E, Chiou CC et al. Zygomycosis in children: a systematic review and analysis of reported cases. *Pediatr Infect Dis J*. 2007; 26 (8): 723–7.
13. Pagano L, Offini M, Fianchi L et al. Mucormycosis in hematologic patients. *Haematologica*. 2004; 89 (2): 207–14.
14. Spellberg B, Ibrahim AS. Recent advances in the treatment of mucormycosis. *Curr Infect Dis Rep*. 2010; 12 (6): 423–29.
15. Adler-Moore J, Proffi RT. Effect of tissue penetration on AmBisome efficacy. *Curr Opin Investig Drugs*. 2003; 4 (2): 179–85.
16. Tissot F, Agrawal S, Pagano L, et al. ECIL-6 guidelines for the treatment of invasive candidiasis, aspergillosis and mucormycosis in leukemia and hematopoietic stem cell transplant patients. *Haematologica*. 2017; 102 (3): 433–44.
17. Skiada A, Lass-Floerl C, Klimko N, et al. Challenges in the diagnosis and treatment of mucormycosis. *Med Mycol*. 2018; 56 Suppl 1: 93–101.
18. Chamilos G, Lewis RE, Kontoyiannis DP. Delaying amphotericin B-based frontline therapy significantly increases mortality among patients with hematologic malignancy who have zygomycosis. *Clin Infect Dis*. 2008; 47 (4): 503–9.

Matej Kokalj¹, Tadeja Matos²

***Scedosporium apiospermum* kot vzrok glivnega endoftalmitisa**

Fungal Endophthalmitis Caused by Scedosporium apiospermum

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: endoftalmitis, glive, endogeni endoftalmitis, eksogeni endoftalmitis, *Scedosporium apiospermum*

Glivni endoftalmitis je huda okužba očesa, ki lahko povzroči stalno slabšanje ali izgubo vida. Je nujno stanje, za ohranitev vida sta potrebni hitra diagnostika in hitra uvedba ustreznega protiglivnega zdravila. Nezmožnost ločevanja med bakterijskimi in glivnimi povzročitelji glede na klinično sliko in široko paleto možnih glivnih povzročiteljev z različnimi intrinzičnimi občutljivostmi na protiglivna zdravila še dodatno zapletejo zdravljenje endoftalmitisa. V prispevku bomo opisali klinični primer eksogenega glivnega endoftalmitisa, povzročenega z glivo *Scedosporium apiospermum* po poškodbi očesa z žičnato ograjo, ter značilnosti te dokaj redke glive. Poleg eksogenega endoftalmitisa, ki največkrat nastane po poškodbi ali operaciji, bomo opisali tudi endogeni endoftalmitis, pri katerem je okužba posledica krvnega razsoja patogenih organizmov. Omenili bomo tudi zdravljenje in diagnostične metode.

ABSTRACT

KEY WORDS: endophthalmitis, fungi, endogenous endophthalmitis, exogenous endophthalmitis, *Scedosporium apiospermum*

Fungal endophthalmitis is a severe eye infection that can cause permanent defect or loss of vision. It is an urgent condition, rapid diagnosis and rapid application of appropriate antifungal drugs are necessary for conservation of vision. The inability to differentiate between bacterial and fungal pathogens based on clinical features of the infection and a wide spectrum of possible fungal pathogens with different intrinsic resistances to antifungal drugs bring additional problems to the management of fungal endophthalmitis. In this contribution, we describe a case of exogenous fungal endophthalmitis caused by *Scedosporium apiospermum* after a traumatic injury of the eye with a barbed wire fence, and the characteristics of this relatively rare fungus. In addition to exogenous fungal endophthalmitis, which in most cases arises from trauma or surgical procedures of the eye, we also describe endogenous fungal endophthalmitis, which in contrast arises from hematogenous spread of the causative organism. Treatment and diagnostic methods will be briefly discussed.

¹ Matej Kokalj, dr. med., Splošna bolnišnica Slovenj Gradec, Oddelek za mikrobiologijo, Gosposvetska cesta 1, 2380 Slovenj Gradec; matej.kokalj@sb-sg.si

² Doc. dr. Tadeja Matos, dr. med., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana

UVOD

Glivni endoftalmitis je huda okužba očesa, ki lahko povzroči stalno slabšanje ali izgubo vida ter v najhujših primerih tudi smrt. Je nujno stanje, za ohranitev vida sta potrebni hitra diagnostika in hitra uvedba ustreznega protiglivnega zdravila. Izraz endoftalmitis uporabljamo, ko govorimo o okužbi notranjih struktur očesa, kot sta steklovina in prekatna vodka. Do okužbe očesa lahko pride endogeno, ko povzročitelj v oko vstopi preko krvnega obtoka, ali eksogeno ob poškodbi ali operaciji. Namen prispevka je predstaviti klinični primer endoftalmitisa, povzročenega s *Scedosporium apiospermum*, opisati najpogostejše vzroke ter povzročitelje glivnega endoftalmitisa, na kratko pojasniti mikološko diagnostiko očesnih okužb in izpostaviti glavne težave, s katerimi se soočamo v praksi.

KLINIČNI PRIMER

Zdravemu moškemu brez kroničnih bolezni, staremu 68 let, se je ob delu na prostem v levo oko zapičil del žičnate ograje iz kovinske žice. Bil je ustrezno oskrbljen, uvedeno je bilo antibiotično zdravljenje, stanje pa se je temu navkljub slabšalo. Enajsti dan po poškodbi so z UZ ugotovili odstop žilnice in hematovitreus. Gospoda so zato sprejeli v bolnišnico na Očesni kliniki Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana. Na levem očesu je bila opravljena vitrektomija pars plana, odvzeta steklovina pa je bila poslana na Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani. Opravljene so bile preiskave za patogene bakterije, uvedeno je bilo intravitrealno antibiotično zdravljenje. Klinično stanje se je navkljub vsem ukrepom še naprej slabšalo, mikrobiološke preiskave so ostale negativne, zato je bil en teden po vitrektomiji opravljen ponovni operativni poseg. Kužnine (nerazredčena in razredčena steklovina, biopsijski vzorec prednjega prekata) so bile poslana na mikrobiološke preiskave za patogene bakterije in glive. Po treh

dneh inkubacije so na Sabouraud agarju iz razredčene in nerazredčene steklovine porasle plesni v količini pet bakterijskih kolonijskih enot (angl. *colony-forming unit*, CFU) in en CFU. Identifikacija plesni z metodo ionizacije v matriksu z desorpcijo z laserjem in masnim analizatorjem na čas preleta ionov (angl. *matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry*, MALDI-TOF MS) je v obeh gojiščih pokazala, da gre za *S. apiospermum*; tudi kasneje opravljeno sekveniranje medgenskih regij (angl. *internal transcribed spacer*, ITS) je potrdilo identifikacijo, ista gliva je prav tako porasla iz biopsijskega vzorca očesa. Antimikogram je pokazal občutljivost na vorikonazol in odpornost na amfotericin B. Glede na mikrobiološke izvide je bil takoj uveden vorikonazol, vendar je bila po štirih dneh zaradi nadaljnjega slabšanja stanja potrebna odstranitev levega očesa. V domačo oskrbo je bil gospod odpuščen dva tedna po odstranitvi, nadaljeval je zdravljenje z vorikonazolom.

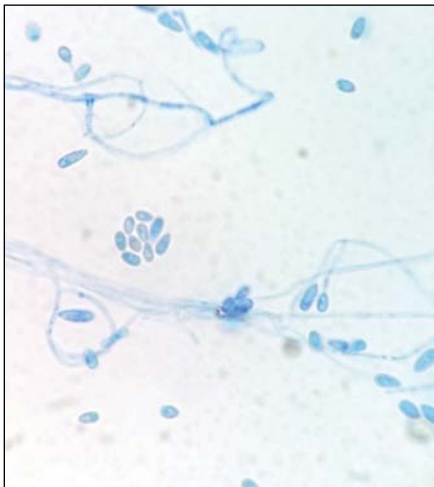
Povzročitelj

S. apiospermum je predstavnik filamentoznih gliv in je termalno monomorfná plesen, ki spada v skupino temno pigmentiranih gliv. Ima dokaj zapleteno taksonomijo, saj ima tri različna imena glede na obliko, v kateri se nahaja.

Teleomorf oz. spolna oblika glive se imenuje *Pseudallescheria apiosperma*. Zanj je značilna tvorba kleistotecijev, značilnih tridih granul, velikih 100–300 µm, ki počijo in v okolico sprostijo ovalne askospore. To obliko srečamo redko, največkrat po dolgotrajni inkubaciji na prehransko revnih gojiščih.

Anamorf, nespolna oblika glive, se imenuje *S. apiospermum* in je najpogostejša oblika te glive (slika 1). Zanj so značilne septirane hialine cilindrične hife premera 2–4 µm in ovalni konidiji velikosti 4–9 × 6–10 µm, ki se nahajajo posamezno ali v skupkih.

Sinanomorf, še ena nespolna oblika te glive, se imenuje *Graphium* spp. (slika 2). Za-



Slika 1. *Scedosporium apiospermum*, ovalni konidiji posamezno in v skupkih.



Slika 2. *Graphium* spp., pokončni skupki hif s ščetkastim robom.

njo so značilni pokončni, trdni skupki hif s ščetkastim robom in terminalni konidiji ovalne oblike (1).

Gojenje in diagnostika

S. apiospermum je hitro rastoča gliva pri 25 °C, največkrat poraste že po nekajdnevni inkubaciji. Za rast prenaša temperature do 42 °C, lahko uspeva tudi v anaerobnih pogojih. Raste na vseh standardnih mikoloških gojiščih, za sinanomorfno obliko značilne spolne strukture kleistoteke pa lahko tvori samo na gojiščih z malo hranili, kot sta koruzni ali krompirjev agar. Kolonije so kosmičaste, na začetku gojenja so belkaste, s časom postanejo sive ali rjave barve (slika 3). V diagnostične namene se uporablja ta direktna mikroskopija in MALDI-TOF MS, kot pomožne ali potrditvene metode pa se lahko uporabljajo tudi molekularne metode, kot je npr. sekveniranje ITS (1).

Epidemiologija

Gliva *S. apiospermum* je ubikvitarno prisotna v prsti, kanalizaciji in vodah. Pogostejša je v zmernem pasu. Zaradi odpornosti na višje koncentracije soli (do 5 %), fakultativne anaerobnosti in s sposobnostjo preživet-

ja pri povišanih temperaturah pa je vezana tudi na onesnažena področja. Je redek povzročitelj okužb pri človeku, vendar lahko okuži tako imunsko zdrave kot imunsko oslabele posameznike. Štejemo jo v skupino porajajočih patogenov. V Sloveniji zasedimo približno en primer letno (lastni podatki, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani) (1, 2).

Okužbe

Do okužbe s *S. apiospermum* najpogosteje pride po travmatski inokulaciji, vendar se lahko okužimo tudi z vdihavanjem. Prehod-



Slika 3. Izgled kolonij *Scedosporium apiospermum* po tritedenski inkubaciji na koruznem agarju.

na kolonizacija z glivo lahko pripelje do vztrajajoče kolonizacije, ki kasneje napreduje v globoko okužbo. Pri človeku povzroča okužbe različnih tkiv in organov:

- Pljučna oblika – z vdihavanjem kužnih delcev ob prisotnih dejavnikih za zvečano dovzetnost za okužbo v dihalih, kot so npr. bronhiektazije, lahko povzroča podobno klinično sliko kot aspergilom.
- Kožne okužbe – papule, noduli, ulkusi, plaki.
- Podkožne okužbe:
 - Micetom – je najpogostejša oblika. Gre za kronično, počasi rastočo, nebolečo destruktivno mikozo. Najpogosteje se pojavi po travmatski inokulaciji, predvsem po rokah in nogah.
 - Podkožni noduli.
- Globoke okužbe – feohifomikoze:
 - Sinopulmonalna oblika – pride do invazije hif v tkiva in nekrotizirajoče pljučnice.
 - Ekstrapulmonalna oblika – osteomielitis, artritis, okužbe mehkih tkiv, endoftalmitis, keratitis, meningitis, peritonitis, endokarditis itd.
- Razsejana oblika se pojavlja predvsem pri imunsko oslabilih posameznikih.

Okužbe očesa

S. apiospermum povzroča širok spekter okužb tudi v očesu. Keratitis se najpogosteje pojavi po eroziji roženice, medtem ko je okužbeni skleritis najpogostejši po operacijah. Endoftalmitis ločimo na endogenega in eksogenega. Endogeni oftalmitis je posledica razsoja glive po krvnem obtoku. Pri tej obliki okužbe je prisotnih več očesnih abscesov, pojavlja pa se predvsem pri imunsko oslabilih posameznikih. Eksogeni endoftalmitis je najpogostejši po travmatski inokulaciji glive, lahko se pojavi tudi po očesnih operacijah. Ta oblika je najpogostejša pri imunsko kompetentnih posameznikih, ob zapoznili identifikaciji oz. zdravljenju je pogosto potrebna odstranitev prizadetega očesa. Povzročata lahko tudi

druge, redkejšje oblike okužb očesa, kot so ulceracije in micetomi roženice, keratouveitis, retinitis in okužbe orbite (1, 2).

Zdravljenje

Zdravljenje je težavno, saj sta potrebna tako lokalno kot tudi sistemsko zdravljenje. Kadar je izvedljivo, je priporočeno kirurško zdravljenje, vendar so kljub temu za dokončno ozdravitev pogosto potrebne ponovne operacije in amputacije. *S. apiospermum* je intrinzično odporna na mnoga protiglivična zdravila; amfotericin B, ehinokandini, flukonazol in itraconazol so neučinkoviti za zdravljenje. Za zdravljenje je zato najprimernejši vorikonazol, aktiven je tudi posakonazol. Smrtnost je pri določenih bolezenskih stanjih zelo visoka, npr. pri meningitisu je večja od 75 %, pri razsejani obliki lahko tudi več kot 90 % (2, 3).

GLIVNI ENDOFTALMITIS

Glede na izvor okužbe delimo glivni endoftalmitis na endogenega in eksogenega.

Endogeni glivni endoftalmitis

Endogeni glivni endoftalmitis povzročijo glive, ki v oko pridejo preko krvnega obtoka. Najpogostejši povzročitelj so kvasovke, endogene okužbe očesa s plesnimi so redkejšje. Glavni predstavnik kvasovk je *Candida* spp. – večino okužb očesa povzroča *C. albicans*, vendar ga lahko okužijo tudi ostale vrste. Dejavniki tveganja so enaki kot za kandidemijo, torej prisotnost osrednjega venskega katetra, totalna parenteralna prehrana, zdravljenje s širokospektralnimi antibiotiki, nedavne abdominalne operacije, nevtropenija ter zdravljenje z glukokortikoidi. Okužba očesa s *Candida* spp. je dolgo časa klinično nema, simptomi se pojavijo pozno v poteku bolezni. Bolniki s kandidemijo so največkrat tudi hujše bolni, zato je prizadetost vidnega sistema opažena pozno. Zaradi teh razlogov je pri vseh bolnikih z dokazano kandidemijo za izključitev okužbe potreben pregled očesnega ozadja (4).

Endogene okužbe s plesnimi so manj pogoste, večinoma jih najdemo pri močnejše imunsko oslabeledih bolnikih s krvnimi boleznimi, bolnikih s transplantacijami, prejemnikih citotoksičnega ali glukokortikoidnega zdravljenja ter pri intravenskih uživalcih drog. Najpogosteje izolirana gliva v tej skupini je *Aspergillus* spp., ki je hkrati tudi drugi najpomembnejši povzročitelj endogenih glivnih endoftalmitisov. Največkrat sta izolirana *Aspergillus fumigatus* in *Aspergillus flavus*, sledijo jima *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus glaucus* in *Aspergillus versicolor*. Pomemben predstavnik plesni je tudi *Fusarium* spp., večkrat najdemo tudi *Scedosporium* spp. Endoftalmitis lahko povzroči širok spekter oportunističnih gliv (4, 5).

Endogene okužbe očesa povzročajo tudi primarno patogene oz. dimorfne glive (*Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Paracoccidioides brasiliensis*). Večino okužb povzročajo pri imunsko zdravih posameznikih, ki z njimi pridejo v stik na omejenih endemskih področjih, značilnih za posamezno glivo. Pri imunsko oslabeledih posameznikih lahko povzročajo hude okužbe (5).

Čeprav je to redek povzročitelj očesnih okužb, je pri bolnikih z aidsom pomembno pomisliti tudi na *Cryptococcus neoformans*, ki v telo vstopa preko pljuč in z razsojem po krvi lahko okuži tudi oko (5).

Eksogeni glivni endoftalmitis

Eksogeni glivni endoftalmitis povzročajo glive, ki v oko pridejo iz zunanega okolja. Lahko je posledica poškodbe, očesne operacije ali neposrednega širjenja iz okolice – npr. napredovanje obstoječega keratitisa. Za razliko od endogenega endoftalmitisa okrnjenost imunskega sistema ni potreben pogoj za eksogeno okužbo. Večkrat je okužba očesa po poškodbi lahko zakasnela, nekateri bolniki razvijejo klinično sliko v prvih dveh tednih po poškodbi, medtem ko drugi pokažejo prve simptome tudi več tednov

kasneje (5). Wykoff in sodelavci so opazovali povzročitelje in vzroke eksogenih glivnih endoftalmitisov – po njihovih podatkih prevladujejo plesni s 85 % vseh okužb, kvasovke pa so odgovorne za preostalih 15 % (6). Med plesnimi je najpogostejši predstavnik *Fusarium* spp. (32 %), sledi *Aspergillus* spp. (15 %), *Paecilomyces* spp. (7 %) in *Acremonium* spp. (5 %) (6). Eksogene endoftalmitise so v 44 % pripisali prej obstoječemu keratitisu, 32 % pooperativnim zapletom in 24 % penetracijskim poškodbam (6). Zaradi majhnega števila primerov in različne geografske porazdelitve gliv se delež povzročiteljev v raziskavah med seboj razlikuje, predvsem *Aspergillus* spp. se pojavlja v dosti večjem deležu (do 91 %). Prav tako se močno razlikuje incidenca, ki kaže pozitivno povezavo s toplejšim podnebjem (6).

Zdravljenje

Za zdravljenje horioretinitisa brez prizadetosti rumene pege zadostuje sistemsko dajanje amfotericina B ali vorikonazola, ob prizadetosti rumene pege ali endoftalmitisu pa je poleg sistemske potrebna tudi intravitrealna uporaba, večkrat je potrebna tudi odstranitev dela ali celotne steklovine (3). Okužbe s plesnimi zdravimo sistemsko s protiglivnimi zdravili in intravitrealno uporabo amfotericina B ali vorikonazola in vitrektomijo. Ehinokandini za zdravljenje endoftalmitisa niso primerni, saj ne dosežejo dovolj visokih koncentracij v mrežnici in steklovini (3, 4).

DIAGNOSTIKA GLIVNEGA ENDOFTALMITISA

Pri diagnostiki glivnega endoftalmitisa je tako kot pri ostalih mikrobioloških preiskavah pomembna zadostna količina ustreznno odvzetega, hranjenega in prenašanega vzorca ter izbira ustreznih metod gojenja in identifikacije.

Vzorec

Najprimernejša kužnina za diagnostiko glivnega endoftalmitisa je steklovina, pridobljena

z vitrektomijo. Paracenteza steklovine ali prekatne vodke sta slabše občutljivi metodi. Lingappan in sodelavci so za endogene oftalmitise opisali 92 % občutljivost za vzorce, pridobljene z vitrektomijo, 44 % za paracentezo steklovine in 7 % za paracentezo prekatne vodke (7). Brisi očesnih tekočin niso primerni vzorci, prav tako ne izsušeni koščki tkiva (8).

Mikroskopija

Direktna mikroskopija je hitra in poceni metoda, zato je še vedno uporabna v diagnostiki glivnih okužb. Preparat lahko pobarvamo z različnimi glivnimi barvili, kot npr. kalkofluor belo, in nato pod fluorescentnim mikroskopom iščemo značilne glivne strukture. Pomaga nam pri določitvi najustrežnejših gojitvenih metod in vrednotenju rezultatov gojenja (8).

Gojenje

Standardno gojenje je pomembno za identifikacijo glive in nujno za določitev občutljivosti za protiglivna zdravila. Še vedno je zlati standard, kljub temu da je dolgotrajna in relativno neobčutljiva metoda z do 30 % lažno negativnih rezultatov (5). Načeloma je potrebnih več različnih gojišč, ki morajo biti inkubirana primerno dolgo časovno obdobje (8). Na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani se očesne vzorce za glive nacepi v tioglikolatni bujon, Sabouraud bujon ter na Sabouraud agar in kromogeno gojišče CHROM-C. Inkubacija traja 7–21 dni, pri temperaturi 37 oz. 30 °C.

Identifikacija

Za identifikacijo gliv se poslužujemo različnih metod – od fenotipskih, mikroskopskih, biokemičnih do molekularnih metod. V zadnjih letih se je MALDI-TOF MS izkazal za zelo hitro in natančno diagnostično

metodo ter s tem močno skrajšal delovni proces v glivnem laboratoriju. Z rastjo različnih glivnih podatkovnih baz in knjižnic, večjo standardizacijo procesov obdelave vzorca in vedno večjo razširjenostjo te tehnologije lahko pričakujemo, da bo njegova vloga v glivni diagnostiki še naprej rasla (1, 9).

Molekularne metode

Zgodnja določitev povzročiteljev endoftalmitisa je zelo pomembna za ugoden izid zdravljenja, zato se v zadnjih letih vedno več truda vlaga v razvoj primernih molekularnih metod. Verižna reakcija s polimerazo (angl. *polymerase chain reaction*, PCR) z ITS se je izkazala za zelo občutljivo in specifično metodo, vendar pomanjkanje standardizacije, prisotnost zaviralcev PCR v kužninah in možnost lažno pozitivne reakcije omejujejo klinično uporabnost (5). Molekularno testiranje očesnih kužnin je koristno, predvsem pri primerih, pri katerih ni rasti na standardnih mikoloških gojiščih in kadar imamo na voljo zadostno količino kliničnega vzorca, saj premajhna količina poveča delež lažno negativnih rezultatov. Priporočeno je, da uporabljamo molekularne metode dopolnilno s standardnimi postopki izolacije in identifikacije povzročiteljev (1, 4).

ZAKLJUČEK

Glivni endoftalmitis je stanje, ki ob neustreznem ukrepanju hitro vodi do stalne prizadetosti ali izgube vida. Zahteven odvzem vzorcev in neznačilna klinična slika s širokim naborom možnih povzročiteljev z različnimi intrinzičnimi občutljivostmi na protiglivna zdravila še dodatno zapletejo izkustveno zdravljenje. Zaradi tega sta dobro komuniciranje in hitra mikrobiološka določitev povzročitelja zelo pomemben del celotnega procesa zdravljenja endoftalmitisa.

LITERATURA

1. Jorgensen JH, Pfaller MA, Carroll KC, et al. Manual of clinical microbiology. Washington DC: ASM press; 2015. p. 1932–2220.
2. Cortez KJ, Roilides E, Quiroz-Telles F, et al. Infections caused by *Scedosporium* spp., Clin Microbiol Rev. 2008; 21 (1): 157–97.
3. Pappas GP, Kauffman CA, Andes RA, et al. Clinical practice guideline for the management of candidiasis: 2016 Update by the Infectious diseases society of America. Clin Infect Dis. 2016; 62 (4): 1–50.
4. Durand ML. Bacterial and fungal endophthalmitis. Clin Microbiol Rev. 2017; 30 (3): 597–613.
5. Vilela RC, Vilela L, Vilela P. Etiological agents of fungal endophthalmitis: diagnosis and management. Int Ophthalmol. 2014; 34 (3): 707–21.
6. Wykoff CC, Flynn HW Jr, Miller D, et al. Exogenous fungal endophthalmitis: microbiology and clinical outcomes. Ophthalmology. 2008; 115 (9): 1501–7.
7. Lingappan A, Wykoff CC, Albini TA, et al. Endogenous fungal endophthalmitis: causative organisms, management strategies, and visual acuity outcomes. Am J Ophthalmol. 2012; 153 (1): 162–6.
8. Kalkanci A, Ozdek S. Ocular fungal infections. Curr Eye Res. 2011; 36 (3): 179–89.
9. Sanguinetti M, Posteraro B. Identification of molds by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. J Clin Microbiol. 2017; 55 (2): 369–79.

Prispelo 17. 4. 2018

Ivana Velimirovič¹, Rok Tomazin², Tadeja Matos³, Janez Tomažič⁴

Kriptokokni celulitis: prikaz primera

Cryptococcal Cellulitis: Case Report

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: *Cryptococcus neoformans*, celulitis

Okužba s kriptokoki ali kriptokokoza je tretja najpogostejša invazivna glivna okužba pri prejemnikih čvrstih organov in je povezana z visoko smrtnostjo. Osebe z razsejano obliko kriptokokoze imajo običajno klinično sliko meningoencefalitisa in/ali pljučnice. Prikazetost kože je redka, a pomembna oblika kriptokokoze, pogosto s slabim izidom bolezni, predvsem zaradi pozne diagnoze in posledično neustreznega zdravljenja. Preden se prepozna pravo diagnozo, se bolnike pogosto izkustveno zdravi z različnimi antibiotiki. Prikazujemo bolnika, ki je imel presajeno ledvico in je prejemal imunosupresivno zdravljenje. Zbolel je za kožno kriptokokoza, ki je bila prepoznana pozno in je posledično napredovala v meningitis.

ABSTRACT

KEY WORDS: *Cryptococcus neoformans*, cellulitis

Cryptococcus neoformans infection is the third most commonly occurring invasive fungal infection in solid organ transplant recipients and is associated with high mortality. Immunocompromised patients with disseminated cryptococcosis usually present with either pulmonary or central nervous system involvement. Cutaneous involvement is a rare but important feature of disseminated cryptococcosis with a poor outcome if misdiagnosed. Patients are often treated with antibiotics before the definitive diagnosis is reached, delaying appropriate therapy. We report a case of cryptococcal cellulitis complicated by cryptococcal meningitis in a patient with a kidney transplant who has received long-term immunosuppressive therapy.

¹ Ivana Velimirovič, dr. med., Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Prvomajska ulica 1, 2000 Maribor; iv.velimirovic@gmail.com

² Asist. Rok Tomazin, univ. dipl. mikrobiol., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana

³ Doc. dr. Tadeja Matos, dr. med., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana

⁴ Prof. dr. Janez Tomažič, dr. med., Klinika za infekcijske bolezni in vročinska stanja, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Japljeva ulica 2, 1525 Ljubljana

UVOD

Kriptokokoza je invazivna glivna okužba, ki jo povzročajo kriptokoki – z ovojnico zamejene kvasovke iz rodu *Cryptococcus*. Pri ljudeh okužbo povzročata kompleksa vrst *Cryptococcus neoformans* in *Cryptococcus gattii* (1). Za razliko od *C. gattii*, ki bolezen pri imunsko kompetentnih osebah povzroča v 70–80 % primerov, je *C. neoformans* oportunistično patogena gliva, ki okužbe povzroča predvsem pri osebah z imunsko motnjo (IM) (2, 3). Najbolj ogroženi so bolniki, ki so okuženi s HIV, se zdravijo z imunosupresivnimi zdravili, so na dolgotrajnem zdravljenju z glukokortikoidi, po presaditvi čvrstih organov ali krvotvornih matičnih celic ali pa imajo rakave bolezni (4). Z uvedbo učinkovitega protiretrovirusnega zdravljenja leta 1997 se je pojavnost kriptokoknih okužb pri osebah, okuženih s HIV, v državah z višjim standardom močno zmanjšala (5). Kljub temu se tveganje za okužbo s kriptokoki povečuje pri prejemnikih čvrstih organov, pri katerih je kriptokokoza tretja najpogostejša invazivna glivna bolezen z incidenco 2,8 % (0,2–5 %) in visoko smrtnostjo (33–42 %) (1, 3, 6–9). Kriptokokoza se najpogosteje kaže s klinično sliko meningoencefalitisa ali pljučnice, medtem ko so okužbe kože redkejša in prizadenejo le 8,1 % bolnikov s kriptokokoza (6, 8, 9). Znaki prizadetosti kože so lahko prvi znanilec okužbe in se navadno pojavijo dva do osem mesecev pred diagnozo razsejane okužbe, zato je pravočasna diagnoza ključnega pomena za preprečitev razsejane okužbe (10). Kriptokokni celulitis se lahko zamenja z drugimi, neprimerno pogostejšimi (bakterijskimi) celulitisi, in to je glavni vzrok visoke smrtnosti, saj je zaradi pozno postavljene diagnoze optimalno protiglavno zdravljenje zamaknjeno (11–16).

OPIS PRIMERA

Predstavljamo primer 51-letnega bolnika, ki je imel pred 15 leti presaditev ledvice. Zdravljen je bil še zaradi kronične ledvične

bolezni tretje stopnje, povišanega arterijskega krvnega tlaka, zmanjšanega delovanja ščitnice in sladkorne bolezni. Njegovo imunosupresivno zdravljenje je vključevalo metilprednizolon, mikofenolno kislino in kalcinevrinski zaviralec takrolimus. V zadnjem letu je preboleval reaktivacijo okužbe z virusom varicella zoster in urosepso, povzročeno z bakterijo *Escherichia coli*.

Pred sprejemom na Kliniko za infektivne bolezni in vročinska stanja Univerzitetnega kliničnega centra v Ljubljani je bil bolnik v času september–december 2016 večkrat sprejet v eno od regionalnih bolnišnic. Pri svoji osebni zdravnici se je prvič oglasil v začetku septembra 2016 zaradi slabega počutja in izpuščaja na desni goleni. Zdravnica je med pregledom ugotovila, da je imel gospod vročino, in ga napotila v bolnišnico. V kliničnem statusu ob sprejemu je izstopala pordela koža desne spodnje okončine z nekaj drobnimi papulami brez otekline. V laboratorijskih izvidih so bili blago zvišani levkociti ($10,14 \times 10^9/l$) in blago zvišana C-reaktivna beljakovina (24 g/l). Zaradi suma na bakterijski celulitis je bil gospod deset dni zdravljen z amoksicilinom s klavulansko kislino.

Nekaj dni za tem je gospod opravil kontrolni pregled v transplantacijski ambulanti Kliničnega oddelka za nefrologijo v Univerzitetnem kliničnem centru v Ljubljani, kjer je povedal, da tri tedne opaža rdeč izpuščaj na desni goleni ter da čez dan golen postane vroča, otekla in je občasno boleča. Zdravnica je opazila, da navedeni izpuščaj nima značilnega videza šena. Gospoda je napotila na pregled k dermatologu, prosila za histološko in mikrobiološko preiskavo biopsijskega vzorca kože in dala napotnico za UZ spodnjih okončin, česar pa gospod ni opravil, ker je bil tri dni za tem že drugič sprejet v regionalno bolnišnico.

Ponovno je v kliničnem statusu izstopala pordela desna golen s prisotnimi mehurčki in krastami, ki je bila toplejša v predelu sprememb. Ob ponovnem sumu

na šen spodnje okončine je gospod skupno 12 dni parenteralno prejemal kristalni penicilin, pri čemer naj bi se njegovo stanje postopoma izboljšalo, enako tudi sprememba na desni goleni. Deset dni po odpustu je bil gospod tretjič sprejet v bolnišnico, tokrat zaradi nejasnega vročinskega stanja in suma na pljučnico. Med bivanjem v bolnišnici pljučnica ni bila potrjena z radiološkimi preiskavami, prav tako so bili vnetni parametri ves čas v mejah normale, gospod pa je bil ves čas brez vročine. Kljub temu je bil zdravljen z antibiotiki in po petih dneh odpuščen domov.

Dva dni pred zadnjim (četrtem) sprejemom v bolnišnico je bil gospod febrilen z mrzlico in suhim kašljem. Ob sprejemu je imel vročino 38,2 °C. Koža desne goleni je bila hiperpigmentirana, prisotne so bile kraste. Ponovno so ugotavljali klinične znake začetnega šena leve noge in uvedli zdravljenje s kristalnim penicilinom. Ob tem je imel bolnik ves čas zvišano telesno temperaturo, prišlo je do spremembe zavesti, postal je zmeden, dezorientiran in splošno prizadet. Narejena je bila lumbalna punkcija. V možgansko-hrbtenjačni tekočini je bila koncentracija glukoze znižana (0,8 mmol/l), beljakovin pa zvišana (1,33 g/l), prisotna je bila pleocitoza ($341 \times 10^6/l$) z limfocitno predominanco ($213 \times 10^6/l$). Možgansko-hrbtenjačno tekočino so poslali na mikrobiološke preiskave in dan zatem prejeli izvid, da je kriptokokni antigen pozitiven (1 : 15,48 titer ELISA).

Za zdravljenje in nadaljnjo obravnavo so gospoda napotili na Kliniko za infekcijske bolezni in vročinska stanja Univerzitetnega kliničnega centra v Ljubljani. Glede na mikrobiološke izvide so gospoda še enkrat lumbalno punkturali in uvedli protiglavno zdravljenje z liposomalnim amfotericinom B in flukonazolom ter dodatno protivirusno zdravljenje z intravenskim ganciklovirovom zaradi ponovne aktivacije citomegalovirusne okužbe. Istočasno so mu odvzeli še bris in biopsijski vzorec kožne spremembe na

nogi. Iz vseh treh kužnin smo osamili *C. neoformans*. Opravljen je bil MRI glave, kjer niso ugotovili znakov encefalitisa, lezij možganovine ali kriptokokomov.

Zaradi součinkovanja takrolimusa in flukonazola je deveti dan zdravljenja prišlo do pojava patoloških testov za oceno delovanja jeter, ki so se po ukinitvi flukonazola normalizirali. Kontrolna lumbalna punkcija je bila po dveh tednih zdravljenja mikrobiološko negativna. Kontrolni izvid virusnega bremena citomegalovirusa v plazmi je bil dvakrat zaporedoma ugoden (< 137 IU/ml) – ganciklovir je bil ukinjen po 15 dneh zdravljenja. Bolnik je še naprej prejemal monoterapijo z amfotericinom B, ob kateri se je klinična slika izboljšala, spremembe na goleni so izginile in gospod je po 42 dneh zaključil zdravljenje.

RAZPRAVA

Imunosupresivna zdravila, ki se uporabljajo po presaditvi organov in tkiv, so močni zaviralci imunskega odziva celic T, zato so prejemniki dovzetnejši za številne okužbe, med drugim tudi za manj virulentne, t. i. oportunistične mikrobo, kamor spada *C. neoformans* (8). Bolnik je že približno 15 let brez zapletov z okužbami prejemal imunosupresivna zdravila zaradi presaditve ledvice; vse do zadnjega leta, ko je prebolel pasovec in sepsa, povzročeno z *E. coli*. Enako kot pri našem bolniku se, glede na podatke iz literature, kriptokokoza pojavlja v poznem obdobju po presaditvi. Povprečni čas za nastanek kriptokokoze je 575 dni po presaditvi ledvice, kar je manj kot v primerih presaditve pljuč, srca ali jeter (8). Opisani so tudi primeri razvoja kriptokokoze v prvem mesecu po presaditvi, ko je do prenosa okužbe prišlo s presajenimi organi (17).

Okužba s kriptokoki lahko predstavlja ponovno aktivacijo latentne okužbe ali aktivacijo na novo pridobljene okužbe. V eni od raziskav so pri bolnikih s kriptokokozo (razvita bolezen) po presaditvi v 52 % primerov pred pojavom bolezni serološko

dokazali latentno kriptokokno okužbo (11). Prejemniki presadka, pri katerih je prišlo do ponovne aktivacije latentne okužbe, so kriptokokozo razvili v povprečju 5,6 meseca po presaditvi, torej prej kot prejemniki, ki so se okužili *de novo* (v povprečju 40,6 meseca po presaditvi) (11). Pri našem bolniku je prišlo do razvoja okužbe šele po 15 letih. Že pred pojavom kriptokokoze je zbolel za pasovcem in sepso, ki sta bila verjetno glasnika poslabšanja imunosti, kar je bila podlaga za razvoj kriptokokoze. Ali je pri opisanem bolniku prišlo do ponovne aktivacije latentne okužbe ali do nove okužbe, lahko le ugotovimo.

Povzročitelj kriptokokoze, kompleks vrst *C. neoformans*, je ubikvitarno prisotna gliva, ki jo najdemo zlasti tam, kjer se zadržujejo mestni golobi, in v tleh, ki vsebujejo veliko ptičjih iztrebkov in razpadajoče organske snovi (18). Danes kompleks vrst *C. neoformans* vključuje vrste *C. neoformans* (serotip A) in *Cryptococcus deneoformans* (serotip D) ter njun hibrid *C. neoformans C. deneoformans* (serotip AD) (19).

Človek se s kriptokoki večinoma okuži z vdihovanjem aerosolov, ki so verjetno okuženi z bazidiosporami. V spodnjih dihalih sprožijo nespecifično vnetno reakcijo, ki je pri imunsko kompetentnih osebah večinoma klinično nema. V primeru IM lahko povzroči bolezen, najpogosteje pljučnico, ali pa se zaradi izraženega nevrotropizma razširi v osrednje živčevje, kjer povzroči meningitis ali meningoencefalitis (20). V sklopu (hematogeno) razsejane okužbe pride v približno 15 % primerov do prizadetosti kože (polimorfne eflorescence); okužba kože je lahko tudi posledica neposrednega vnosa povzročitelja v kožo, še posebej, če je koža poškodovana (10).

Razsejana kriptokokozna se na koži izraža različno. Pri osebah s HIV so še najbolj značilne umbilicirane, moluskam podobne lezije, pri prejemnikih presadkov pa so na koži nespecifične spremembe, kot so papule, pustule, ulkusi, podkožni vozlički ali pa so spre-

membe podobne bakterijskemu celulitisu in obeh entitet boleznih ne moremo ločiti (10–16). Pri 94 % bolnikov s presadki se kožna kriptokokozna sprva pojavi na zgornjih ali spodnjih okončinah (2). Pri našem bolniku so bile lezije omejene na medialno stran leve goleni – na mesto, izpostavljeno okolju, ki bi lahko bilo vir okužbe. Gospod je poškodbo tega predela ali izpostavljenost ptičjim iztrebkom sicer zanikal.

Celulitis kot izražanje boleznih na koži je redko znak razsejane kriptokokne okužbe, saj običajno bolezen na tej stopnji že vključuje prizadetost pljuč ali osrednjega živčevja (12–16). Na začetku boleznih, ko je prejemal antibiotike za domnevni bakterijski celulitis, ni imel kliničnih simptomov ali znakov, ki bi bili v prid pljučni kriptokokozni ali prizadetosti osrednjega živčevja. Dva meseca pozneje je prišlo do meningoencefalitisa (glavobol, slabost, zmedenost). Diagnoza je bila postavljena na temelju pozitivnega kriptokoknega antigena iz možgansko-hrbtenjačne tekočine.

Diagnoza kriptokokoze temelji na bolezenskih simptomih in znakih ter izvidih mikrobioloških in histopatoloških preiskav. Za potrditev kriptokokoze moramo kriptokoke dokazati v normalno sterilnem vzorcu, za diagnozo razsejane kriptokokoze pa v vsaj dveh različnih vzorcih ali hemokulturi. Najbolj specifična diagnostična metoda je osamitev kriptokokov na običajnih mikoloških gojiščih. Slaba stran gojitvenih metod je njihova dolgotrajnost, saj v najboljšem primeru kriptokoki porastejo v treh do petih dneh.

Ob sumu na kriptokokni meningitis se lahko odločimo za hiter mikroskopski pregled možgansko-hrbtenjačne tekočine, porbarvane z indijskim črnolom (18). Za hitro diagnostiko je izrednega pomena tudi zaznavanje kriptokoknega antigena, ki ga lahko dokazujemo v serumu, možgansko-hrbtenjačni tekočini, urinu ali bronhoalveolarnem izpirku. Antigenski testi so visoko specifični in ob razsejani boleznih tudi zelo

občutljivi (> 90 %) (7). Kriptokokni antigen je lahko pozitiven tudi v primerih pred pojavom simptomov, saj je za razvoj okužbe značilen počasen potek, kot je bilo tudi pri našem bolniku. V primeru našega bolnika je bil kriptokokni antigen potrjen v možgansko-hrbtenjačni tekočini, ko je že prišlo do razsejane kriptokokoze. Diagnoza je bila potrjena tudi z osamitvijo glive iz možgansko-hrbtenjačne tekočine. Tudi iz brisov razjede in biopsijskega koščka kože so porasli kriptokoki in tako smo dokazali, da pri gospodu ni šlo za bakterijski celulitis.

Večino primerov kožne kriptokokoze (80 %) povzroča vrsta *C. deneoformans*, serotip D, ki ima izrazitejši dermatotropizem in višjo odpornost na temperaturo kot ostali serotipi (21, 22).

Ameriško združenje za nalezljive bolezni (Infectious Diseases Society of America, IDSA) je izdalo priporočila za obravnavo in zdravljenje kriptokokoze pri različnih skupinah bolnikov. V smernicah IDSA priporočajo odvzem in pregled možgansko-hrbtenjačne tekočine in jemanje hemokultur za izključitev razsejane bolezni pri vseh bolnikih, ki imajo pozitiven test kriptokoknega antigena iz krvi ter pljučno ali kožno obliko kriptokokoze (23).

Zdravljenje je odvisno od bolnikovega imunskega stanja, mesta okužbe in razširjenosti bolezni. Pri pljučni kriptokokozi in izvenpljučni obliki bolezni brez prizadetosti osrednjega živčevja priporočajo tri- do šestmesečno zdravljenje s flukonazolom v odmerku 200–400 mg/dan. V primeru, da je prizadeto tudi osrednje živčevje, pa je potrebno dvotedensko kombinirano zdravljenje z amfotericinom B in flucitozinom ali štiri- do šesttedenska monoterapija z amfotericinom B, čemur sledi vsaj desettedensko zdravljenje s flukonazolom v odmerku 400 mg/dan in nato še šest- do dvanajstmesečno vzdrževalno zdravljenje s flukonazolom v odmerku 200 mg (23).

Zaradi možnega součinkovanja zdravil (flukonazol) je potrebno merjenje koncentracij imunosupresivnih zdravil v krvi (tudi spreminjanje odmerkov, če je potrebno), zaradi toksičnosti pa je treba meriti še koncentracijo flucitozina in ga po potrebi prilagajati (ledvice, kostni mozeg).

Vrsta imunosupresivnega zdravljenja po presaditvi organa lahko vpliva na klinično izražanje kriptokokoze. Bolniki, ki prejema jo kalcinevrijske zaviralce (npr. takrolimus), redkeje zbolijo za meningitisom, pogostejša pa je prizadetost kože, mehkih tkiv ali skleпов in kosti (24).

ZAKLJUČEK

Kriptokokoza se lahko izraža tudi samo s kožno kriptokokozo. Ta je lahko nevarna za razsoj in nastanek meningitisa, ki je najbolj nevarna oblika kriptokokoze. Ob kožni kriptokokozi je lahko že prišlo do razsoja, ki se klinično še ni izrazila (9, 25). Zaradi teh razlogov je ob kožni kriptokokozi vedno treba preveriti tudi prisotnost kriptokokov v krvi, možgansko-hrbtenjačni tekočini in urinu ter napraviti test za kriptokokni antigen v krvi in možgansko-hrbtenjačni tekočini, ki jo pobarvamo tudi z indijskim črnilom. Bolniki pogosto prejmejo empirično antibiotično zdravljenje za bakterijski celulitis, na katero kot v primeru našega bolnika ni odziva. Pri vseh osebah z IM z neznačilnim potekom bolezni in neznačilnimi kožnimi spremembami je treba napraviti biopsijo in mikrobiološki pregled kožnih sprememb. Pri našem bolniku bi z minimalno invazivnimi postopki okužbo lahko pravočasno etiološko opredelili, uvedli ustrezno protiglivično zdravljenje in preprečili razvoj okužbe do meningitisa, zaradi katerega je bilo potrebno dolgotrajno in drago bolnišnično zdravljenje.

LITERATURA

1. Heitman J, Koziel TR, Kwon-Chung J, et al. *Cryptococcus*: from human pathogen to model yeast. Washington, DC: ASM Press; 2011; 507–12.
2. Husain C, Wagener MM, Singh N. *Cryptococcus neoformans* infection in organ transplant recipients: variables influencing clinical characteristics and outcome. *Emerg Infect Dis*. 2001; 7: 375–81.
3. Pappas PG, Perfect JR, Cloud GA, et al. Cryptococcosis in human immunodeficiency virus-negative patients in the era of effective azole therapy. *Clin Infect Dis*. 2001; 33: 690–9.
4. Lin YY, Shiau S, Fang CT. Risk factors for invasive *Cryptococcus neoformans* diseases: a case-control study. *PLoS One*. 2015; 10 (3): 1–13.
5. Lortholary O, Poizat G, Zeller V, et al. Long-term outcome of AIDS-associated cryptococcosis in the era of combination antiretroviral therapy. *AIDS*. 2006; 20: 2183–91.
6. Kontoyiannis DP, Marr KA, Park BJ, et al. Prospective surveillance of invasive fungal infections in hematopoietic stem cell transplant recipients, 2001–2006: overview of the Transplant-Associated Infection Surveillance Network (TRANSNET) database. *Clin Infect Dis*. 2010; 50: 1091–100.
7. Baddley JW, Forrest GN. AST Infectious Diseases Community of Practice. Cryptococcosis in solid organ transplantation. *Am J Transplant*. 2013; 13 (Suppl 4): 242–9.
8. Pappas PG. Cryptococcal infections in non-HIV-infected patients. *Trans Am Clin Climatol Assoc*. 2013; 124: 61–79.
9. Pappas PG, Alexander BD, Andes DR, et al. Invasive fungal infections among organ transplant recipients: results of the Transplant Associated Infection Surveillance Network (TRANSNET). *Clin Infect Dis*. 2010; 50: 1101–11.
10. Neuville S, Dromer F, Morin O, et al. Primary cutaneous cryptococcosis: a distinct clinical entity. *Clin Infect Dis*. 2003; 36 (3): 337–47.
11. Saha D, Goldman D, Shao X, et al. Serologic evidence for reactivation of cryptococcosis in solid-organ transplant recipients. *Clin Vaccine Immunol*. 2007; 14 (12): 1550–4.
12. Srivastava GN, Tilak R, Yadav J, et al. Cutaneous *Cryptococcus*: marker for disseminated infection. *BMJ Case Rep*. 2015; 21: 2015–7.
13. Probst C, Pongratz G, Capellino S, et al. Cryptococcosis mimicking cutaneous cellulitis in a patient suffering from rheumatoid arthritis: a case report. *BMC Infect Dis*. 2010; 10: 239–43.
14. Singh N, Rihs J, Gayowski T, et al. Cutaneous cryptococcosis mimicking bacterial cellulitis in a liver transplant recipient: case report and review in solid organ transplant recipients. *Clin Transpl*. 1994; 8 (4): 365–8.
15. Chaya R, Padmanabhan S, Anandaswamy V, et al. Disseminated cryptococcosis presenting as cellulitis in a renal transplant recipient. *J Infect Dev Ctries*. 2013; 7 (1): 60.
16. Anderson D, Schmidt C, Goodman J, et al. Cryptococcal disease presenting as cellulitis. *Clin Infect Dis*. 1992; 14 (3): 666–72.
17. Sun HY, Alexander BD, Lortholary O, et al. Unrecognized plant and donor-derived cryptococcal disease in organ transplant recipients. *Clin Infect Dis*. 2010; 51 (9): 1062–9.
18. Matos T. 2014. Mikologija. V: Praktikum iz mikrobiologije in imunologije za študente medicine. Kotnik V. (eds.). Ljubljana, Medicinska fakulteta, Katedra za mikrobiologijo in imunologijo, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo: 195–201.
19. Hagen F, Khayhan K, Theelen B, et al. Recognition of seven species in the *Cryptococcus gattii*/*Cryptococcus neoformans* species complex. *Fungal Genetics and Biology*. 2015; 78: 16–48.
20. Bogovič P. 2015. Kriptokokozna. V: Infekcijske bolezni. Tomažič J., Strle F. (eds.). Ljubljana, Slovensko zdravniško društvo, Združenje za infektologijo: 548–50.
21. Desnos-Ollivier M, Patel S, Raoux-Barbot D, et al. Cryptococcosis serotypes impact outcome and provide evidence of *Cryptococcus neoformans* speciation. *MBio*. 2015; 6 (3): e00311–5.
22. Martinez LR, Garcia-Rivera J, Casadevall A. *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (serotype D) strains are more susceptible to heat than *C. neoformans* var. *grubii* (serotype A) strains. *J Clin Microbiol*. 2001; 39 (9): 3365–7.
23. Perfect J, Dismukes W, Dromer F, et al. Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease: 2010 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2010; 50: 291–322.
24. Singh N, Alexander B, Lortholary O, et al. *Cryptococcus neoformans* in organ transplant recipients: impact of calcineurin-inhibitor agents on mortality. *J Infect Dis*. 2007; 195 (5): 756–64.
25. Singh N, Dromer F, Perfect J, et al. Immunocompromised hosts: cryptococcosis in solid organ transplant recipients: current state of the science. *Clin Infect Dis*. 2008; 47 (10): 1321–7.



8. LIKARJEV SIMPOZIJ: Mikologija – od mikrobiologije do klinike

- 3 Candidaemia: the National Epidemiologic Study, 2013-2017 – *Andrej Golle, Mateja Pirš, Rok Tomazin, Zmago Novak, Urša Košir, Andrej Rojnik, Irena Grmek Košnik, Izток Štrumbelj, Tatjana Harlander, Anamarija Jurjaševič Dodič, Irena Piltaver Vajdec, Jerneja Fišer, Tadeja Matos*
- 17 Cryptococcal Infections in Slovenia: Characteristics of Isolates – *Rok Tomazin, Tadeja Matos*
- 27 Azole Resistance in *Aspergillus fumigatus* – *Tadeja Matos, Rok Tomazin*
- 37 *Pneumocystis jirovecii* as Hospital-Acquired Fungi – *Miha Skvarč*
- 43 The Role of Fungal Antigens in Oncological Patients – *Milena Kerin Povšič, Saša Simčič*
- 53 Fungal Infections in Cystic Fibrosis – *Marina Praprotnik, Ana Kotnik Pirš, Aleksandra Zver, Malena Aldeco, Dušana Lepej, Uroš Krivec*
- 59 Endemic Mycoses Yesterday, Today and Tomorrow – *Tadeja Kotar, Jasna Černoša*
- 65 Dermatophytoses: Diagnostics, Epidemiology and Therapy – *Andrej Golle, Tadeja Matos, Rok Tomazin, Pij Bogomir Marko, Urša Košir, Marica Lugovski, Urška Dermota, Anamarija Jurjaševič Dodič, Zdenka Horvat Šardi, Tatjana Harlander, Ingrid Berce*
- 75 Strategies for Treatment of Invasive Fungal Infections and Antifungal Use in Slovenia and Europe – *Bojana Beović*
- 81 Rationality and the Standardization Problem of Mycological Surveillance of the Air of Hospital Environment – *Rok Tomazin*
- 87 Analysis of Fungal Microbiota with Next Generation Sequencing Approach – *Aleksander Mahnič, Aleksander Kocuvan, Maja Rupnik*
- 95 Intestinal Mucormycosis – A Report of Two Cases – *Vladan Rajič, Janez Jazbec, Simona Lucija Avčin, Lidija Kitanovski*
- 103 Fungal Endophthalmitis Caused by *Scedosporium apiospermum* – *Matej Kokalj, Tadeja Matos*
- 111 Cryptococcal Cellulitis: Case Report – *Ivana Velimirovič, Rok Tomazin, Tadeja Matos, Janez Tomažič*