

# Učestalost i antifungalna osjetljivost izolata *Candida* spp izoliranih iz kliničkih uzoraka u Kliničkom bolničkom centru Split u 2018. godini

---

Širić, Katarina

Master's thesis / Diplomski rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, School of Medicine / Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:171:474749>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-05**



Repository / Repozitorij:

[MEFST Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**MEDICINSKI FAKULTET**

**Katarina Širić**

**Učestalost i antifungalna osjetljivost izolata *Candida* spp izoliranih iz kliničkih  
uzoraka u Kliničkom bolničkom centru Split u 2018. godini**

**Diplomski rad**

**Akadska godina:**

**2019./2020.**

**Mentor:**

**doc. dr. sc. Anita Novak**

**Split, listopad 2020. godine**

**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**MEDICINSKI FAKULTET**

**Katarina Širić**

**Učestalost i antifungalna osjetljivost izolata *Candida* spp izoliranih iz kliničkih  
uzoraka u Kliničkom bolničkom centru Split u 2018. godini**

**Diplomski rad**

**Akadska godina:**

**2019./2020.**

**Mentor:**

**doc. dr. sc. Anita Novak**

**Split, listopad 2020. godine**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Medicinski fakultet i Kemijsko-tehnološki fakultet  
Integrirani preddiplomski i diplomski studij FARMACIJA  
Sveučilište u Splitu, Republika Hrvatska

<b>Znanstveno područje:</b>	Biomedicinske znanosti
<b>Znanstveno polje:</b>	Farmacija
<b>Nastavni predmet:</b>	Farmaceutska mikrobiologija
<b>Tema rada:</b>	je prihvaćena na sjednici vijeća studija Farmacija te potvrđena na sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko-tehnološkog fakulteta i sjednici Fakultetskog vijeća Medicinskog fakulteta
<b>Mentor:</b>	doc. dr. sc. Anita Novak
<b>Pomoć pri izradi:</b>	doc. dr. sc. Anita Novak

### Učestalost i antifungalna osjetljivost izolata *Candida* spp izoliranih iz kliničkih uzoraka u Kliničkom bolničkom centru Split u 2018. godini

Katarina Širić, broj indeksa 166

**Uvod:** Gljivične infekcije, uzrokovane različitim vrstama kandida, predstavljaju veliki zdravstveni problem, a njihova dijagnostika i liječenje stvara ogromne troškove i opterećenje za zdravstveni sustav. Epidemiologija invazivnih i neinvazivnih kandidijaza se značajno promijenila posljednjih desetljeća, kako u prevalenciji pojedinih vrsta kandida, tako i u razvoju rezistencije na antimikotike. Iako je *C. albicans* dugo godina bila vodeći uzročnik invazivnih kandidijaza, oko 50% današnjih infekcija uzrokuju *non-albicans* vrste.

**Cilj istraživanja:** Cilj ovog istraživanja je utvrditi distribuciju najznačajnijih vrsta kandida kojima je ispitana osjetljivost na antimikotike te odrediti učestalost rezistentnih sojeva kandida na testirane lijekove u Kliničkom bolničkom centru Split u 2018. godini.

**Materijali i metode:** U ovom retrospektivnom istraživanju korišteni su podatci arhive Kliničkog zavoda za mikrobiologiju i parazitologiju KBC Split. Prikupljeni su podatci o svim klinički značajnim sojevima kandida kojima je ispitana osjetljivost na antifungalne lijekove u periodu istraživanja. Ponavljajući ili tzv. „copy“ sojevi nisu uvršteni u analizu. Kvantitativni podatci opisani su medijanom i srednjom vrijednosti, dok su kategorijske varijable izražene apsolutnim brojevima i postocima. Razlike vrijednosti podataka u ispitivanim skupinama obrađene su koristeći hi-kvadrat test. Razina statističke značajnosti postavljena je na  $p \leq 0,05$

**Rezultati:** U razdoblju istraživanja, ispitana je osjetljivost na antimikotike ukupno 146 izolata kandida, od kojih je 79 % pripadalo *non-albicans* vrstama, što je značajno više od broja testiranih izolata *C. albicans* (21 %). Najčešće testirane vrste bile su *C. glabrata* (32 %), *C. albicans* (21 %) i *C. parapsilosis* (27 %). Rezistencija *non-albicans* vrsta na flukonazol (76 % izolata) je bila značajno viša od rezistencije *C. albicans* (33 % izolata). Rezultati ovog istraživanja pokazuju da je 25,8 % testiranih izolata *C. albicans* te 16 % testiranin *non-albicans* izolata, rezistentno na ehinokandine,

**Zaključak:** Veći broj klinički značajnih izolata *non-albicans* kandida od izolata *C. albicans* kao i zabilježena rezistencija na najčešće primjenjivane antimikotike, naglašava potrebu praćenja i redovitog testiranja izolata različitih vrsta kandida na antimikotike. Istraživanjem i analizom trendova prevalencije pojedinih vrsta kandida i frekvencija njihovih rezistencija na antimikotike, mogu se postaviti algoritmi empirijske i ciljane antifungalne terapije.

**Ključne riječi:** Candida vrste, invazivna kandidijaza, antifungalna osjetljivost

**Rad sadrži:** 59 stranica, 21 sliku, 4 tablice i 52 reference

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Sastav Povjerenstva za obranu:**

1. izv. prof. dr. sc. Vedrana Čikeš Čulić, predsjednik
2. izv. prof. dr. sc. Ivana Goić-Barišić, član
3. doc. dr. sc. Anita Novak, član-mentor

**Datum obrane:** 22. listopada 2020.

**Rad je u tiskanom i u elektroničkom obliku (pdf format) obliku pohranjen** u Knjižnici Medicinskog fakulteta Split, Šoltanska 2.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

## GRADUATE THESIS

Medical School and Faculty of Chemistry and Technology  
Integrated Undergraduate and Graduate Study of Pharmacy  
University of Split, Republic of Croatia

**Scientific area:** Biomedical Sciences  
**Scientific field:** Pharmacy  
**Teaching subject:** Pharmaceutical microbiology  
**Thesis subject:** was approved by Council of Integrated Undergraduate and Graduate Study of Pharmacy, as well as by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, Faculty Council of School of Medicine  
**Faculty of Medicine Mentor:** doc. dr. sc. Anita Novak  
**Technical assistance:** doc. dr. sc. Anita Novak

### Occurrence and antifungal susceptibility of *Candida* spp. isolated from clinical specimens in a University Hospital of Split in 2018.

Katarina Širić, indeks number 166

#### Summary:

**Background:** Fungal infections, caused by different *Candida* species, represent a great medical issue and their diagnostic and treatment creates enormous expenses and burden for the healthcare system. Epidemiology of invasive and non-invasive candidiasis has significantly changed over the last decades, as much in prevalence of individual *Candida* species, as in development of resistance to antifungal drugs. Although *C. albicans* was the leading cause of invasive candidiasis for many years, around 50 % of contemporary infections are caused by *non-albicans* species.

**Objectives:** The aim of this study was to determine the distribution of the most significant *Candida* species, that were tested for antifungal susceptibility. The aim was also to determine the frequency of *Candida* strains resistant to tested drugs in the University Hospital of Split in 2018.

**Materials and methods:** In this retrospective study, data has been used from the archive of Department of Microbiology and Parasitology, University Hospital of Split. The information about all clinically significant *Candida* strains, that were tested for antifungal susceptibility in period of the study, was collected. Repetitive or so-called "copy" strains were not included in the analysis. Quantitative data is described with median and mean value, while categorical variables are expressed with absolute numbers and percentages. The differences between values of the data in the observed species were analysed using chi-square test. The level of statistical significance was set to  $p \leq 0,05$ .

**Results:** In the period of the study, 146 *Candida* species were tested for antifungal susceptibility, out of which 79 % belonged to *non-albicans* species, which is significantly higher than the number of tested *C. albicans* isolates (21 %). Most frequently tested species were *C. glabrata* (32 %), *C. albicans* (21 %) and *C. parapsilosis* (27 %). Resistance of *non-albicans* species to fluconazole (76 %) was significantly higher than the resistance of *C. albicans* (33 %). Results of this study show that 25,8 % of all tested *C. albicans* isolates and 16% of tested *non-albicans* isolates, are resistant to echinocandins.

**Conclusion:** Higher proportion of tested *non-albicans Candida* isolates than *C. albicans* isolates, as well as recorded resistance to frequently used antifungal drugs, emphasizes the need of continuous antimicrobial surveillance and susceptibility testing of different *Candida species* to antifungal drugs. Analysing and monitoring trends of prevalence of individual *Candida* species, and their resistance to antifungal drugs, can help in establishing algorithms for empirical and final antifungal therapy.

**Key words:** *Candida* species, invasive candidiasis, antifungal susceptibility

**Thesis contains:** 59 pages, 21 figures, 4 table, 52 references

**Original in:** Croatian

#### Defence Committee:

1. assoc. prof. Vedrana Čikeš Čulić, PhD, chair person
2. assoc. prof. dr. sc. Ivana Goić-Barišić, PhD, member
3. assis. prof. Anita Novak., PhD, member-supervisor

**Defence date:** October 22nd, 2020.

**Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in** Library of School of Medicine Split, Šoltanska 2.

*Zahvala...*

*Mojim roditeljima, sestri i bratu na svemu što su učinili za mene od mojih prvih koraka, za svako odricanje. Hvala im što su uvijek vjerovali u mene, dopustili mi da griješim, ali i bili mi podrška ma kako krivudavi, teški, tvrdoglavi i suzni moji putevi bili.*

*Hvala svim prijateljima koji su se radovali, i koji će se nastaviti radovati, sa mnom kroz ostatak naših života.*

*Na kraju, hvala mojoj mentorici, profesorici Aniti Novak na ukazanoj prilici i velikom strpljenju tijekom izrade ovoga diplomskog rada.*

*Kao i sve drugo u životu, i ovaj rad je posvećen onim neupoznatima, ali za mene jako živima.*

## **SADRŽAJ:**

<b>1. UVOD</b> .....	1
1.1. Medicinski značajni kvasci – rod <i>Candida</i> .....	2
1.1.1. Građa stanice .....	2
1.1.2. Vrste roda <i>Candida</i> .....	3
1.2. Gljivične infekcije .....	3
1.2.1. Infekcije uzrokovane vrstama roda <i>Candida</i> .....	4
1.2.2. Karakteristike patogenosti .....	4
1.3. Liječenje gljivičnih infekcija .....	5
1.3.1. Podjela antifungalnih lijekova prema kemijskim osnovama .....	5
1.3.1.1. Azoli .....	5
1.3.1.2. Polieni .....	6
1.3.1.3. Ehinokandini .....	7
1.3.1.4. Alilamini .....	7
1.3.1.5. Antimetaboliti .....	8
1.3.2. Podjela antifungika prema mehanizmima djelovanja .....	8
1.3.2.1. Azoli .....	9
1.3.2.2. Polieni .....	10
1.3.2.3. Ehinokandini .....	10
1.3.2.4. Alilamini .....	11
1.3.2.5. Antimetaboliti .....	12
1.3.3. Mehanizmi rezistencije na antifungalne lijekove .....	12
1.3.3.1. Azoli .....	12
1.3.3.2. Polieni .....	13
1.3.3.3. Ehinokandini .....	13
1.3.3.4. Alilamini .....	14
1.3.3.5. Antimetaboliti .....	14
1.4. Mikrobiološka dijagnostika kandidijaze .....	14
1.4.1. Metode testiranja osjetljivosti na antifungalne lijekove .....	17
<b>2. CILJ I HIPOTEZA ISTRAŽIVANJA</b> .....	19
<b>3. METODE</b> .....	21
<b>4. REZULTATI</b> .....	23
<b>5. RASPRAVA</b> .....	31

<b>6. ZAKLJUČCI .....</b>	<b>38</b>
<b>7. POPIS CITIRANE LITEATURE .....</b>	<b>40</b>
<b>8. SAŽETAK .....</b>	<b>46</b>
<b>9. SUMMARY .....</b>	<b>48</b>
<b>10. ŽIVOTOPIS .....</b>	<b>50</b>



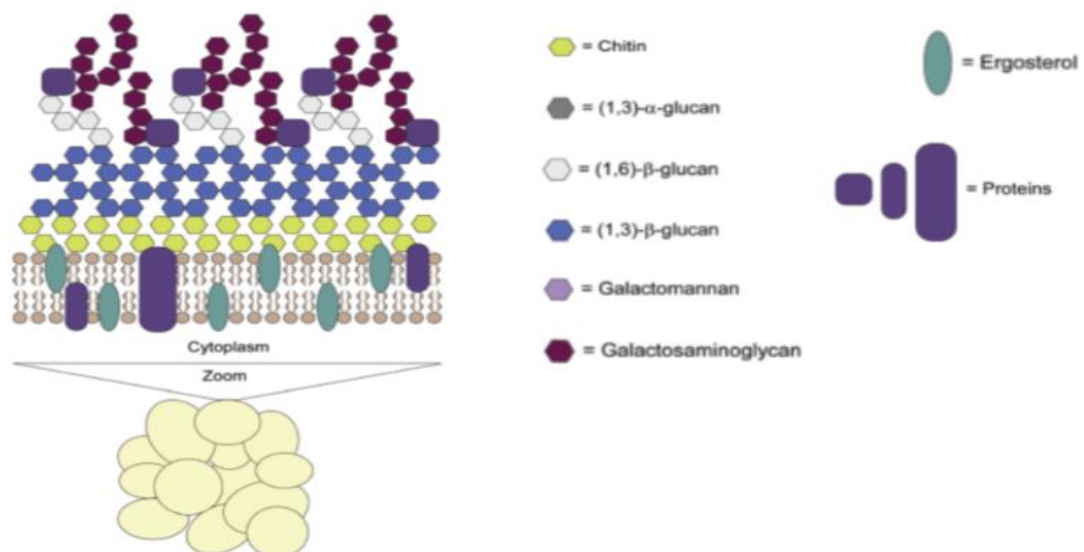
## **1. UVOD**

## 1.1. Medicinski značajni kvasci – rod *Candida*

Gljive su eukariotski organizmi. Poznato je preko 100 000 vrsta gljiva, od kojih 400 uzrokuje bolesti ljudi. Prema građi, dijele se u jednostanične (kvasce) i višestanične (plijesni). Jedan od najznačajnijih rodova kvasaca je *Candida*. Vrste roda *Candida* su jednostanični, heterotrofni, nepokretni organizmi. (1) Njihova stanica se naziva blastokonidija, a može biti različitih veličina (od 4 $\mu$ m do 6 $\mu$ m) i oblika (npr. okrugle, ovalne, u obliku suze). Neke vrste mogu stvarati pseudohife i prave hife. Hife su duguljaste, cjevaste stanice (sa ili bez poprečnih pregrada) koje su karakteristične za plijesni. Splet hifa tvori micelij, koji se dijeli na bazalni i zračni. Pseudohife nastaju procesom klijanja ili pupanja blastokonidija, kada se novonastala stanica ne odvoji u potpunosti od ishodišne stanice, nego se stanice izdužuju i slažu u lance različitih dužina. (2)

### 1.1.1. Građa stanice

Strukturno se razlikuju od ljudskih stanica prvenstveno po prisutnosti staničnog zida. On osigurava formu stanice, daje joj čvrstoću te ima zaštitnu ulogu. Primarno, stanični zid gljiva iz roda *Candida* je građen od aminopolisaharida hitina koji je uronjen u matriks beta-1,3- i beta-1,6- glukanskih lanaca. Ostatak staničnog zida izgrađen je od proteina i raznih polisaharida, poput galaktoaminoglikana i galaktomanoze. Druga bitna strukturna razlika je poseban oblik sterola koji se nalazi u staničnoj membrani. Dok ljudske stanice posjeduju kolesterol, istu funkciju u stanicama gljiva ima ergosterol. Građa staničnog zida i stanične membrane gljiva roda *Candida* prikazana je na slici 1. (3)



Slika 1. Građa staničnog zida i stanične membrane gljiva roda *Candida* (3)

### 1.1.2. Vrste roda *Candida*

Najvažnija vrsta roda *Candida* je *Candida albicans*. (4) U prošlosti su infekcije *C. albicans* bile znatno brojnije u odnosu na infekcije koje uzrokuju druge vrste, koje su sukladno tome dobile naziv *non-albicans* vrste. Danas sve više raste incidencija i prevalencija infekcija uzrokovanih *non-albicans* vrstama. (5) Neke od najpoznatijih *non-albicans* kandida su: *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. utilis*, *C. famata*, *C. kefyr*, *C. lusitaniae*, *C. dubliniensis* i *C. guilliermondii*. (4)

## 1.2. Gljivične infekcije

Infekcije koje kvasci i plijesni izazivaju u ljudi nazivamo mikoze. Možemo ih podijeliti u nekoliko osnovnih skupina: površinske, kožne, potkožne i duboke (sustavne i deseminirane). (6)

Površinske mikoze predstavljaju kolonizaciju površinskih slojeva kože, vlasista ili sluznica. Ne izazivaju imunološki odgovor domaćina i najčešće predstavljaju dermatološki (kozmetički) problem. (7)

Kožne mikoze predstavljaju infekciju svih tkiva koja sadrže keratin – koža, nokti, dlake, te dovode do podražaja imunološkog sustava domaćina. Dijelimo ih s obzirom na vrstu gljiva koja ih uzrokuje na: dermatofitoze (dermatofitne plijesni), kandidioze (vrste roda *Candida*) i dermatomikoze (dermatomikotične plijesni). (8)

Potkožne mikoze su kronične infekcije nastale inokulacijom gljivičnih konidija (dijelovi zračnog micelija) u potkožne dijelove. Obično su ograničene na vezivno potkožno tkivo, no može doći i do širenja u okolno koštano ili mišićno tkivo. (9)

Sustavna mikoza je infekcija koja zahvaća isključivo jedan organski sustav, najčešće pluća (zbog udisanja konidija iz zraka). Težim oblicima infekcije najčešće su podložni imunokomprimitirani bolesnici u kojih infekcija lako može prijeći u diseminirani oblik. Česti uzročnici ovih infekcija su dimorfne gljive iz rodova: *Histoplasma*, *Coccidioides*, *Blastomyces* i *Paracoccidioides*. (10)

Diseminirani oblik najčešće je posljedica prodora gljiva u krvotok, koje se hematogenim putem šire u druge organske sustave. Klinička slika nalikuje bakterijskoj sepsi, iako se ponekad radi o miješanoj infekciji gljivama (najčešće kandidom) i bakterijama ili bakterijska sepsa prethodi gljivičnoj infekciji. (11)

### 1.2.1. Infekcije uzrokovane vrstama roda *Candida*

Kandidijaza je svaka infekcija uzrokovana kandidom. (12) Invazivna kandidijaza uključuje kandidemiju (prodor kandidate u krv) i diseminiranu kandidijazu raznih unutarnjih organa (npr. endokarditis ili meningitis). (13)

Infekcije gljivama koje se pojavljuju na koži (npr. *tinea manuum*, *tinea pedis*) ili na noktima (onihomikoze) najčešće su gljivične infekcije ljudi te rijetko mogu uzrokovati klinički značajne komplikacije. S druge strane, invazivne gljivične infekcije predstavljaju po život opasno stanje s visokom stopom smrtnosti. (14) Prema učestalosti, prevladavaju infekcije uzrokovane vrstama roda *Candida*, s preko 750 000 slučajeva invazivnih kandidijaza godišnje te stopom mortaliteta od oko 40 %. (15) Kandidate uzrokuju 15 % svih sepsi te 50-70 % svih sistemskih gljivičnih infekcija. (4)

Kvasci roda *Candida* su dio mikrobioma ljudi i nisu obligatni već oportunistički patogeni. (4) Oni neće izazvati infekciju imunokompetentnih ljudi, ali mogu djelovati patogeno u okolnostima smanjenog odgovora organizma na infekciju. Neka od stanja koja su podložnija invazivnim kandidijazama su: infekcija virusom humane imunodeficijencije (HIV), cistična fibroza, transplantacija organa, *diabetes mellitus*, tuberkuloza, tumori, opekotine koje zahvaćaju veliki dio kože, kateterizacija te dugotrajna uporaba antibiotičkih, kortikosteroidnih ili antineoplastičnih lijekova. (16)

### 1.2.2. Karakteristike patogenosti

Najznačajnija i najviše istražena vrsta roda *Candida* je *Candida albicans*. Ona je dio mikrobioma ljudi, može se naći na koži te probavnom i spolnom sustavu. U normalnim uvjetima, živi u harmoniji s različitim bakterijama i ne izaziva bolest. Međutim, sadrži brojne faktore virulencije koje najčešće ispoljava u uvjetima neadekvatnog imunološkog odgovora i narušenog fiziološkog mikrookoliša. (17)

Jedna od značajnijih karakteristika patogenosti *C.albicans* je sposobnost formiranja dvoslojnog biofilma. Sojevi koji su mutacijom izgubili tu sposobnost pokazuju značajno manju virulentnost. Druge vrste kandida poput *C. parapsilosis*, *C. glabrata* i *C. tropicalis*, stvaraju manju količinu biofilma, koji ima i nešto jednostavniju strukturu od biofilma *C. albicans*. (18)

Sve vrste roda *Candida*, osim *C. glabrata*, imaju sposobnost promjene oblika (morfogeneze) u višestanični, micelijski oblik koji im omogućuje prodiranje u tkiva. Kada se nalazi u fazi mirovanja, *C. albicans* se nalazi u obliku blastokonidija, a kada nastanu povoljni

uvjeti za prelazak kolonizacije u infekciju, blastokonidije prelaze u oblik pseudohifa ili pravih hifa koje su agresivan, invazivni oblik kandidate. Uz to, morfogeneza je jedan od bitnih faktora za stvaranje biofilma. (18)

Još jedan značajan faktor patogenosti kvasaca je izlučivanje raznih enzima (npr. proteinaze, esteraze) u prostor izvan stanice. Osim olakšanog hranjenja, to im omogućuje prodiranje u tkiva i inhibiciju imunološkog odgovora domaćina. (18)

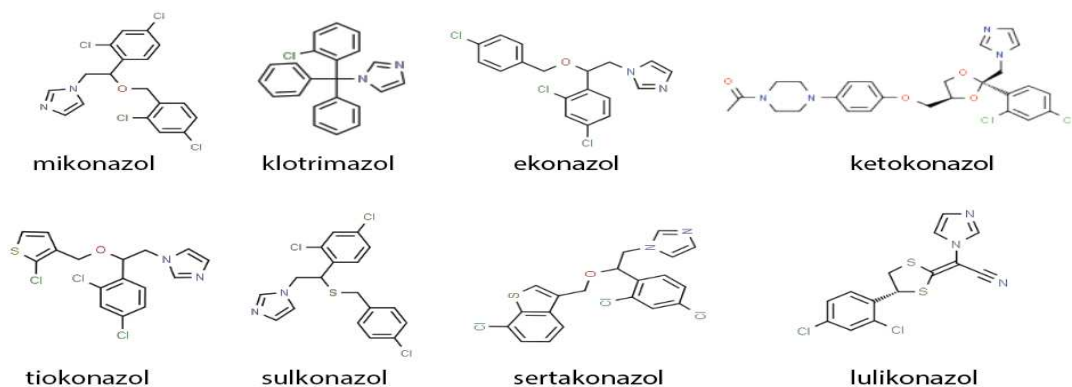
### 1.3. Liječenje gljivičnih infekcija

#### 1.3.1. Podjela antifungalnih lijekova prema kemijskim osnovama

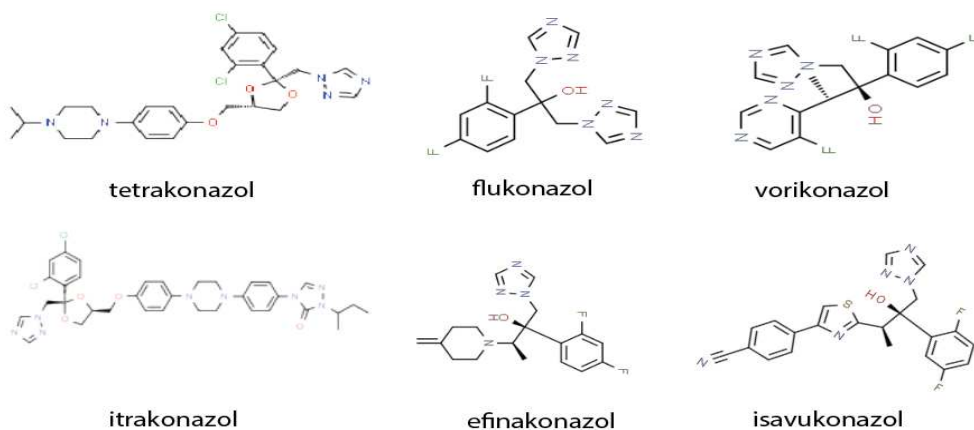
Trenutno postoji pet vrsta antifungalnih lijekova odobrenih za liječenje ljudi: azoli, polieni, ehinokandini, alilamini i antimetaboliti. (4)

##### 1.3.1.1. Azoli

Azoli su male molekule koje se sastoje od imidazolinskog ili triazolnog prstena spojene na kvarterni dušikov atom. Azoli prve generacije su se na tržištu pojavili sedamdesetih godina prošlog stoljeća. U tu skupinu spadaju: mikonazol, klotrimazol, ekonazol, ketokonazol, tiokonazol i sulkonazol. Naknadno su odobreni i sertakonazol te lulikonazol. Kemijske strukture azolnih antifungika prve generacije prikazane su na slici 2. Devedesetih godina, otkriveni su azoli druge generacije, koji umjesto imidazolskog prstena, u osnovi svoje strukture imaju triazolni prsten. Toj skupini lijekova pripadaju: terkonazol, flukonazol, itrakonazol, vorikonazol, posakonazol, efinakonazol, isavukonazol. Kemijske strukture azolnih antifungika prve generacije prikazane su na slici 3. Ono što daje superiornost skupini lijekova s triazolnim prstenom jest jače vezanje za gljivične enzime citokromatskih p450 enzima. U fazi kliničkih istraživanja su i lijekovi koji u strukturi posjeduju tetrazolni prsten s još jednim dodatnim atomom dušika, koji bi omogućio još veću specifičnost za gljivične enzime citokroma p450. (3)



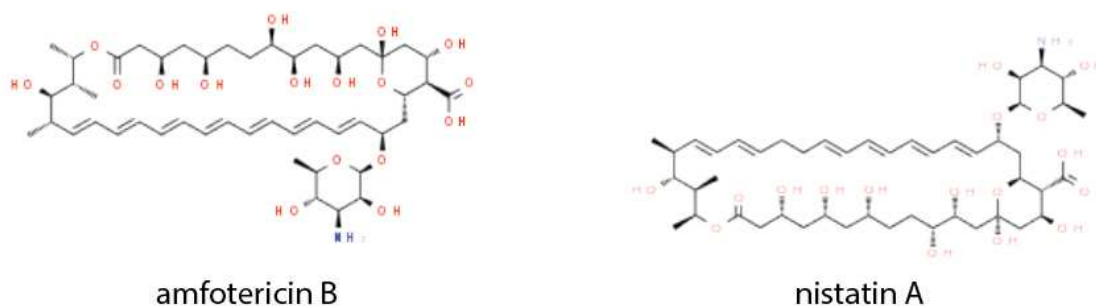
Slika 2. Prva generacija antifungalnih lijekova iz skupine azola (19)



Slika 3. Druga generacija antifungalnih lijekova iz skupine azola (19)

### 1.3.1.2. Polieni

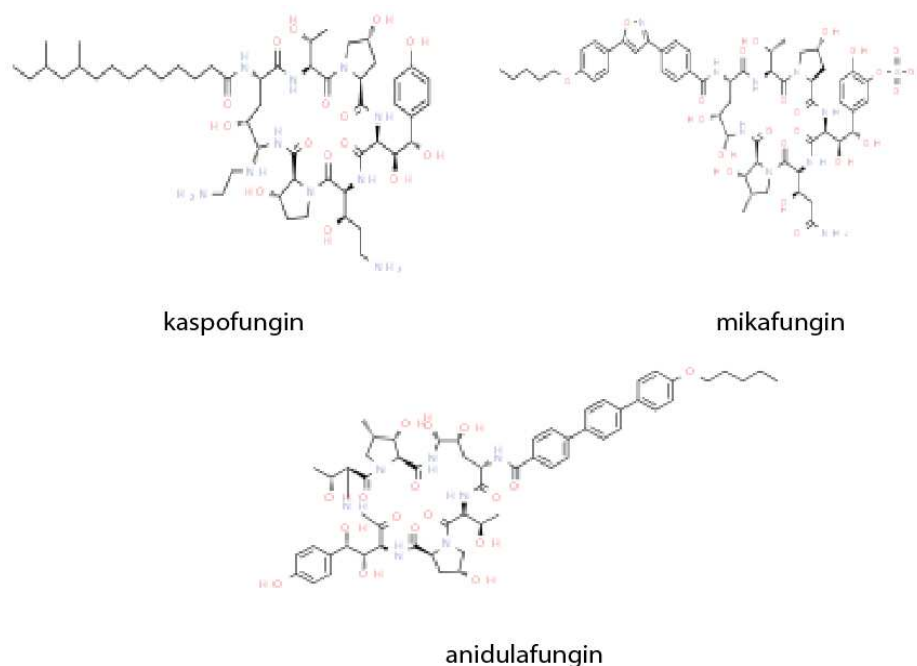
Polieni, u odnosu na druge sintetski ili polusintetski proizvedene antimikotične lijekove, nastaju kao produkt obrane Gram pozitivnih bakterija iz roda *Streptomyces*. Antifungalni polieni se sastoje od 25 do 35 ugljikovih atoma, u obliku nezasićenog makrolaktonskog prstena, povezanih na mikozaminski saharid. U ovu skupinu pripadaju amfotericin B koji u svojoj strukturi ima sedam nezasićenih veza (heptaen) te nistatin A s četiri nezasićene veze (tetraen). (3) Njihove kemijske strukture prikazane su na slici 4. Amfotericin B ima širok antifungalni spektar, ali pokazuje i značajnu nefrotoksičnost. Posljednjih 20-ak godina, standardni oblik, amfotericin B deoksikolat, zamijenio je liposomalni amfotericin B. Ova formula zadržala je spektar antifungalnog djelovanja, a značajno smanjila nefrotoksični učinak. (20)



Slika 4. Polienski antifungalni lijekovi (19)

### 1.3.1.3. Ehinokandini

Ehinokandini su polusintetska skupina antifungalnih lijekova, koji potječu od nusprodukata filamentoznih gljiva koji su modificirani u laboratoriju. Strukturu im čini jezgra od heksapeptida na koju su pričvršćeni hidrofobni, lipidni lanci. Varijabilnost u bočnim lancima omogućuje razvoj novih vrsta ehinokandina. Predstavnici ove skupine su: kaspofungin, mikafungin i anidulafungin, a njihove kemijske strukture prikazane su na slici 5. (3)



Slika 5. Antifungalni lijekovi iz skupine ehinokandina (19)

### 1.3.1.4. Alilamini

Skupinu alilamina čine tri antimikotika: terbinafin, naftifin i butenafin. Sva tri lijeka sadrže tercijski dušikov atom na kojeg su vezane različite alilne skupine. Kemijske strukture alilamina prikazane su na slici 6. (3)



Slika 6. Antifungalni lijekovi iz skupine alilamina (19)

### 1.3.1.5. Antimetaboliti

Antimetaboliti su lijekovi koji su strukturno slični molekulama koje su normalno prisutne u stanicima, a služe inhibiranju određenog staničnog procesa. (21) Pirimidinski antimetabolit koji se koristi u svrhu liječenja gljivičnih infekcija jest flucitozin. Kemijska struktura flucitozina prikazana je na slici 7. (3)

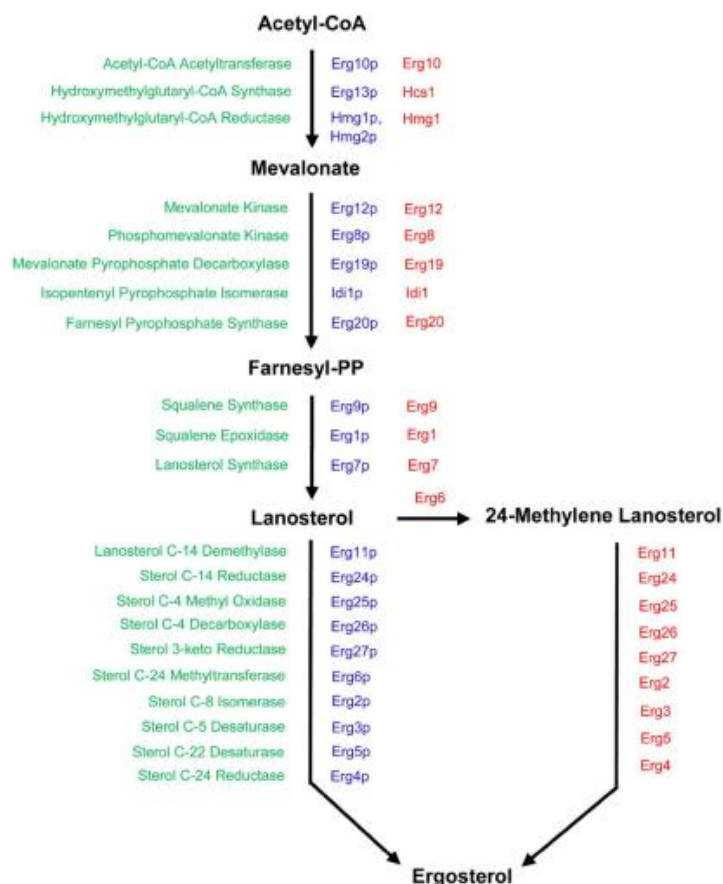


Slika 7. Flucitozin (20)

### 1.3.2. Podjela antifungika prema mehanizmima djelovanja

Budući su gljive eukariotski organizmi, brojni stanični i molekularni procesi gljiva odvijaju se na isti način kao u ljudi. (1) Stoga je vrlo teško odabrati prikladno ciljno mjesto djelovanja antifungika. Dobar antifungik treba biti selektivan, tj. takav da djeluje isključivo na gljive, a ima minimalan ili nikakav učinak na ljudske stanice. (22) Jedna od osnovnih strukturnih komponenti koje razlikuju ljudske stanice od gljivičnih jest ergosterol, analog humanog kolesterola. Ergosterol je bitan faktor očuvanja integriteta stanične membrane. (23) Njegova sinteza započinje s dvije molekule acetil-koenzima A, koje se kroz jedanaest koraka fosforilacije, dekarboksilacije i redukcije, prevode do skvalena. Skvalen se pomoću enzima skvalen epoksidaze prevodi u skvalen epoksid koji uz enzim lanosterol sintazu prelazi u lanosterol. Prvi enzim u slijedećem nizu od 11 koraka sinteze ergosterola iz lanosterola jest lanosterol 14-alfa-demetilaza. Biosinteza ergosterola prikazana je na slici 8. (24)

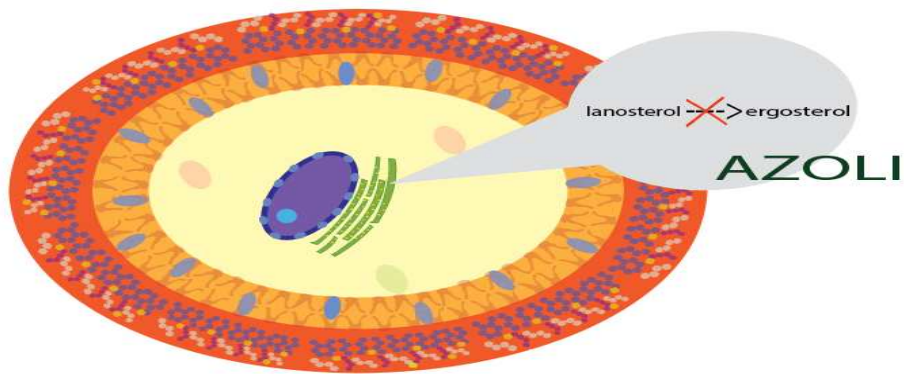




Slika 8. Biosinteza ergosterola (24)

### 1.3.2.1. Azoli

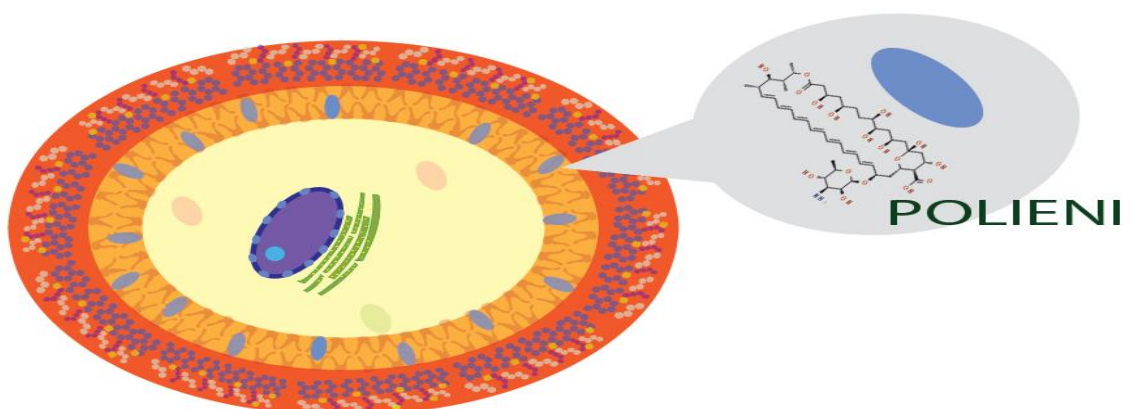
Azoli, imidazoli (npr. ketokonazol) i triazoli (npr. flukonazol, vorikonazol) inhibiraju sintezu ergosterola. Mehanizam djelovanja azola temelji se na inhibiciji enzima lanosterol 14-alfa-demetilaze, što ima dvostruki učinak; nakupljanje toksičnog spoja (14-alfa-metil-2,6-diola) i narušavanje integriteta stanične membrane. (4) Lošija kvaliteta i smanjena čvrstoća, čine membranu podložnom dodatnim oštećenjima te utječu na aktivnost enzima ključnih za transport nutrijenata, sintezu hitina, rast i proliferaciju stanica. Mehanizam djelovanja azola grafički je prikazan na slici 9. (22)



Slika 9. Mehanizam djelovanja antifungalnih lijekova iz skupine azola

### 1.3.2.2. Polieni

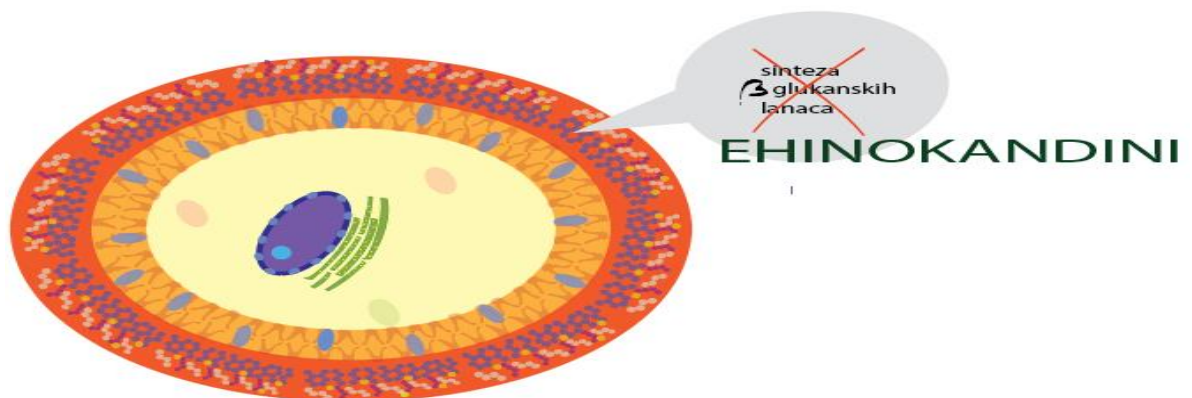
Polieni (npr. amfotericin B) stvaraju komplekse sa sterolima (ergosterolom u staničnoj membrani gljiva i kolesterolom u staničnoj membrani sisavaca.). Kompleks se ostvaruje vodikovim vezama, a afinitet vezanja je veći za ergosterol nego za ljudski kolesterol. To omogućuju Van der Waalsove veze alkanskog lanca kolesterola, odnosno alkenskog lanca ergosterola, i višestrukih nezasićenih veza poliena. Vežanjem za sterole, polieni mijenjaju strukturu stanične membrane, uzrokuju depolarizaciju, povećanu propusnost, curenje citoplazmatskog sadržaja te posljedično staničnu smrt. Polieni uzrokuju i oksidacijsko oštećenje stanice što pridonosi njihovom fungicidnom učinku. Mehanizam djelovanja poliena grafički je prikazan na slici 10. (25)



Slika 10. Mehanizam djelovanja antifungalnih lijekova iz skupine poliena

### 1.3.2.3. Ehinokandini

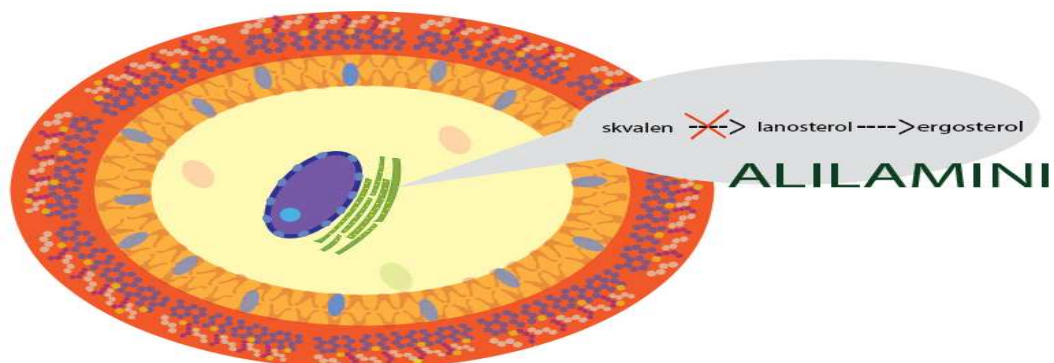
Mehanizam djelovanja ehinokandina (npr. kaspofungina, mikafungina i anidulafungina) temelji se na inhibiciji enzima UDP-glukoza beta-(1,3)-glukan-beta-(3)-glukoziltransferaze preko *FKSI* gena što dovodi do inhibicije sinteze 1,3-beta-glukanskih lanaca u staničnoj membrani gljiva. (26) Smanjena koncentracija glukanskih polimernih lanaca čini membranu osjetljivijom na osmotski stres. Stanična membrana ljudskih stanica ne sadrži beta-glukane pa su ovi lijekovi vrlo sigurni za primjenu u ljudi. Mehanizam djelovanja ehinokandina grafički je prikazan na slici 11. (4)



Slika 11. Mehanizam djelovanja antifungalnih lijekova iz skupine ehinokandina

### 1.3.2.4. Alilamini

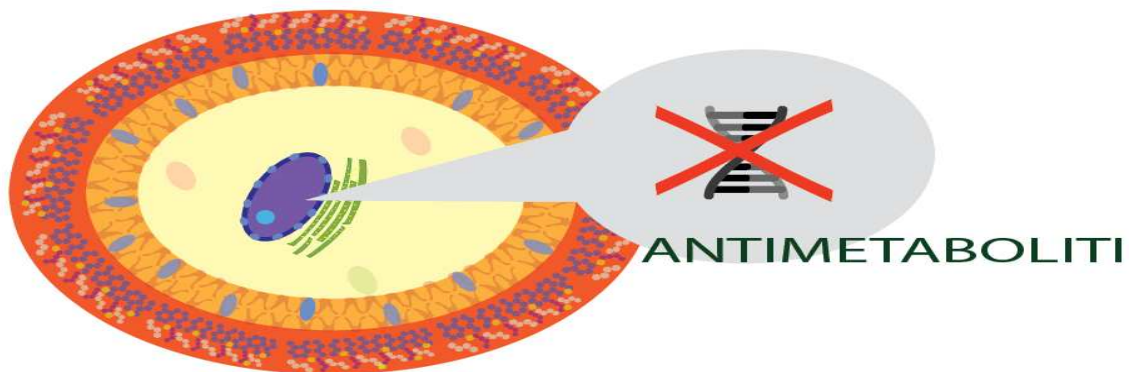
Alilamini (npr. terbinafin) su snažni, reverzibilni, nekompetitivni inhibitori enzima skvalen epoksidaze, što rezultira inhibicijom sinteze ergosterola te nakupljanjem skvalena. (4) Iako nije poznat točan mehanizam djelovanja, smatra se da skvalen djeluje toksično na gljivične stanice. Za razliku od azola, koji su fungistatici, alilamini imaju fungicidni učinak. (27) Mehanizam djelovanja alilamina grafički je prikazan na slici 12.



Slika 12. Mehanizam djelovanja antifungalnih lijekova iz skupine alilamina

### 1.3.2.5. Antimetaboliti

Antimetabolit pirimidinskog karaktera, flucitozin, sam po sebi nema antifungalnu aktivnost, već njegov metabolit, 5-fluorouracil. Flucitozin u stanicu ulazi pomoću enzima citozin permeaze, koji je transporter adenina, hipoksantina i citozina pa su zbog toga oni kompetitivni antagonisti. Odmah po ulasku u stanicu, flucitozin se metabolizira u 5-fluorouracil uz pomoć enzima citozin deaminaze. Dva su mehanizma antifungalnog djelovanja 5-fluorouracila. Prvi je djelovanje na RNK, gdje se 5-fluorouracil metabolizira do 5-fluorouridin trifosfata, koji se inkorporira u strukturu RNK umjesto uracila, što dovodi do pogreški u translaciji enzima ključnih za preživljavanje stanice. Drugi mehanizam je djelovanje na DNK, gdje metabolit 5-fluordeoskiuridin monofosfat inhibira enzim timidilat sintetazu. Timidilat sintetaza je ključni enzim u nastajanju timidina te samim time i sinteze DNK molekule. (28) Mehanizam djelovanja antimetabolita grafički je prikazan ja slici 13.



Slika 13. Mehanizam djelovanja flucitozina

### 1.3.3. Mehanizmi rezistencije na antifungalne lijekove

Rezistencija ili otpornost gljiva na djelovanje antifungalnih lijekova može biti prirođena i stečena. Prirođena (intrinzična) rezistencija je ona koju posjeduju svi sojevi neke vrste i nije posljedica prethodne primjene antimikotika. Sekundarna ili stečena rezistencija je ona koja nastaje nakon izlaganja određenom lijeku, a njezin učinak može biti povratan (reverzibilan) ili nepovratan. (4)

#### 1.3.3.1. Azoli

Opisano je nekoliko različitih mehanizama rezistencije gljiva na azole. Jedan od njih se odvija putem refleksih pumpi, koje aktivno izbacuju lijek i tako učinkovito smanjuju njegovu

koncentraciju u stanici. Postoje dvije vrste aktivnih transportera u stanicama *Candida* vrsta. Prvi su kodirani *CDR1* i *CDR2* genima (engl. *Candida drug resistance* geni). One pripadaju ATP-vezujućim kazetnim transporterima (ABC, eng. *ATP-binding cassette transporters*) i uzrokuju rezistenciju na sve azolne antimikotike. Druga vrsta pumpi kodirana je *MDR1* genom (engl. *multi-drug resistance* gen) koji pripada MFS (eng. *Major Facilitator Superfamily*) porodici pumpi. Ova vrsta pumpi uzrokuje rezistenciju na flukonazol. (4, 29)

Drugi mehanizam rezistencije je posljedica mutacija na genu *ERG11*, koji kodira enzim lanosterol 14-alfa-demetilazu, što sprječava vezanje azola na mjesto djelovanja. (4)

Treći mehanizam rezistencije povezan je sa zamjenom ergosterola nekim drugim sterolom. Mutacije u *ERG3* genu sprječavaju pretvorbu 14-alfa-metilfekosterola u 14-alfa-metil-3,6-diol čime ovi lijekovi gube ciljno mjesto djelovanja. (4)

### **1.3.3.2. Polieni**

Pretpostavljeni mehanizam rezistencije na polienske lijekove jest zamjena ergosterola njegovim prekursorom ili općenito smanjenje koncentracije ergosterola u staničnoj membrani. Enzim  $\Delta_{5,6}$ -desaturaza (kodirana genom *ERG3*) i enzim C-8 sterol izomeraza (kodirana genom *ERG2*) sudjeluju u biosintezi ergosterola i najčešće su povezani s mutacijama koje uzrokuju rezistenciju na amfotericin B. Mutacije utječu na sadržaj sterola te dovode do smanjene količine ergosterola koja nije dovoljna za potpuni učinak amfotericina B. Mutirani enzim  $\Delta_{5,6}$ -desaturaza prevodi fekosterol u episterol, za kojeg amfotericin B ima slab afinitet vezanja. (4)

Drugi mehanizam rezistencije poliena je povećanje katalitičke aktivnosti stanice, koja smanjuje oksidativni stres uzrokovan lijekovima. (30)

### **1.3.3.3. Ehinokandini**

Prvi mehanizam rezistencije kojeg povezujemo s ehinokandinima posljedica je točkaste mutacije *FKSI* gena, koji kodira veliku podjedinicu enzima glukana sintaze. Ova mutacija uzrokuje rezistenciju na sve ehinokandine i učestala je kod svih vrsta kandida.

Drugi mehanizam rezistencije na ehinokandine povezuje se sa staničnim odgovorom na stres. Kada se stanica nađe u situaciji u kojoj joj nedostaje jedan od osnovnih gradivnih elemenata staničnog zida, beta-glukanski lanac, reagira tako da poveća sintezu drugih gradivnih elemenata. Mnoge vrste kandida reagiraju povećavajući koncentraciju hitina u staničnom zidu. (4)

Zbog toga, neki izolati kandida pokazuju paradoksalni učinak pojačanog rasta pri visokim koncentracijama ehinokandina. Ovaj efekt zapažen je kod vrsta *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* i *C. krusei*, dok ga *C. glabrata* ne pokazuje. (4)

#### **1.3.3.4. Alilamini**

Rezistencija na alilamine je vrlo rijetka, a posljedica je mutacije gena koji kodira skvalen epoksidazu. Radi se o stečenoj rezistenciji nakon uporabe terbinafina u kliničkoj praksi i često se radi o križnoj rezistenciji s azolima. (27)

#### **1.3.3.5. Antimetaboliti**

Primarni mehanizam rezistencije na flucitozin je preko citozin permeaze (kodirana *FCY2* genom) što posljedično smanjuje koncentraciju lijeka u stanici. Također, kao odgovor stanice pojavljuje se povećana sinteza pirimidina koji su kompetitivni antagonisti flucitozina jer koriste isti transporter za ulazak u stanicu. (27)

Sekundarni mehanizam rezistencije uključuje promjenu na enzimu citozin deaminazi (kodirana *FCY1* genom) koja se javlja kod *non-albicans* vrsta. Drugi enzim koji je često modificiran je uridin monofosfat fosforilaza. (27)

#### **1.3.3.6. Stvaranje biofilma**

Biofilm je gusti sloj mikroorganizama okružen ekstracelularnim polimernim matriksom, koji mikroorganizme štiti od stresnog okruženja (obrambenih mehanizama domaćina ili antimikrobnih lijekova) što rezultira terapijskim neuspjehom i pojačanom rezistencijom na lijekove. (31, 32)

### **1.4. Mikrobiološka dijagnostika kandidijaze**

Za postavljanje dijagnoze kandidijaze mogu se koristiti različite metode direktne i indirektne mikrobiološke dijagnostike, a koja će metoda biti odabrana, ovisi o vrsti kliničkog uzorka. Iznimno je važno pravilno odabrati i uzorkovati klinički materijal, kojeg treba biti u dovoljnoj količini i svakako uzet prije početka antifungalne terapije. Prema mjestu infekcije i prisutnosti fiziološkog mikrobioma, sve kliničke uzorke možemo podijeliti na primarno sterilne (npr. krv i likvor) i primarno nesterilne (npr. koža i probavni sustav). Razlikovanje kolonizacije od infekcije je otežano ako se radi o primarno nesterilnim uzorcima, gdje su pojedine vrste kandida, zajedno s bakterijama, dio mikrobioma. (33)

Prva metoda direktne dijagnostike kandidijaze je mikroskopska analiza. Gljive imaju karakteristične morfološke strukture koje se mogu dokazati mikroskopskom pretragom nativnih ili obojenih preparata. Nativnim preparatima može se dodati otopina kalijevog hidroksida (5-10 % KOH), ako se radi o uzorcima koji sadrže keratin (npr. nokti ili vlas kose), kako bi se gljive lakše vizualizirale. Metodom bojanja po Gramu možemo vidjeti različite gljivične oblike poput hifa, pseudohifa i blastokonidija, a metodom bojanja Giemsa-Romanowsky možemo vidjeti karakteristične strukture gljivične građe, poput staničnog zida. (33)

Druga metoda direktne dijagnostike je detekcija dijelova stanice ili njenih metabolita, poput antigena staničnog zida, beta-glukana i raznih enzima. Ovaj oblik dijagnostike posebice je važan kod invazivnih kandidijaza zbog kratkog vremena potrebnog za dobivanje rezultata. Primjer dokazivanja biomarkera je test određivanja beta-1,3-D-glukana (BDG) u serumu pacijenata. Ovdje spadaju i molekularne metode koje brzo i jednostavno identificiraju uzročnike gljivičnih infekcija, na temelju dokaza njihovih nukleinskih kiselina u kliničkim uzorcima, metodom lančane reakcije polimeraze (PCR). (33) To je metoda visoke specifičnosti i osjetljivosti te je prikladna za rutinski rad u mikrobiološkom laboratoriju. Princip lančane reakcije polimeraze temelji se na mogućnosti enzima polimeraze da sintetizira novi lanac DNK. Pomoću ove metode mali identifikacijski dio DNK možemo umnožiti nekoliko stotina tisuća puta što olakšava njegovu identifikaciju. (37)

Treći oblik direktne dijagnostike je kultivacija. Različiti klinički uzorci (primarno sterilni i nesterilni) se mogu inokulirati na selektivne i neselektivne hranjive podloge jer kvasci nemaju posebnih hranidbenih zahtjeva i mogu rasti u različitim uvjetima.

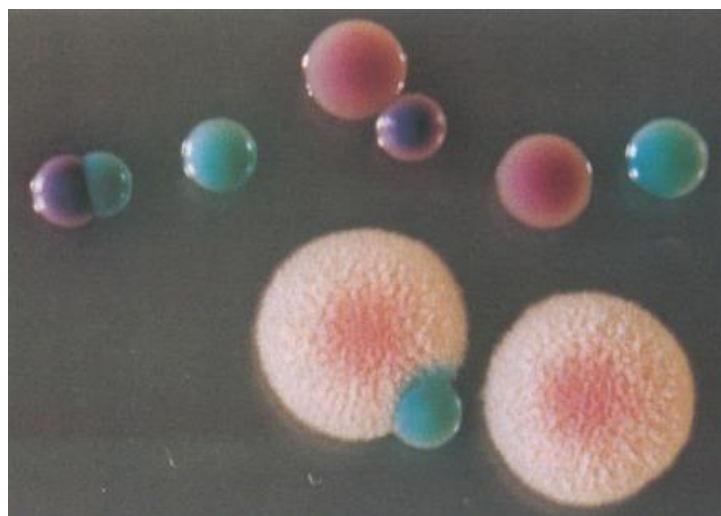
Najčešće korištena podloga je Sabouraud hranjiva podloga. Može biti u tekućem ili krutom stanju, pH joj je nešto niži od 6 (kako bi se inhibirao rast većine bakterija), a još sadrži glukozu, pepton i agar-agar. Ostali sastojci, kao što su antibiotici, dugolančane masne kiseline i cikloheksamid, dodaju se ovisno o specifičnom uzorku koji se inokulira i vrsti gljiva koja se očekuje. Uzorak krvi se inokulira u aerobne bifazne sustave za hemokulturu. Nasijane hranjive podloge je potrebno inkubirati u aerobnim uvjetima, na temperaturi od 25 do 30°C ako se radi o primarno nesterilnim uzorcima te temperaturi 35-37°C, ako se radi o primarno sterilnim uzorcima. Većina kolonija kvasaca naraste u roku 3 do 7 dana od nasijavanja. Nakon što su kolonije porasle, gljive se mogu identificirati na osnovu opisa morfologije kolonija (veličine, oblika, površine i ruba) i biokemijskih testova. Na Sabouraud podlozi, kvasci obično stvaraju kolonije promjera 2-3mm, imaju sjajnu površinu i pravilan rub. Na temelju izgleda poraslih

kolonija, ne može se sa sigurnošću reći o kojem se kvascu radi, iako neke vrste kandida pokazuju određene osobitosti. Tako npr. *C. glabrata* ima hrapavu i mat površinu, a *C. parapsilosis* obično ima nepravilno izbrazdanu površinu. Kulture *C. albicans* i *C. parapsilosis* na Sabouraud hranjivoj podlozi prikazane su na slici 14. (33)



Slika 14. Kulture *C. albicans* i *C. parapsilosis* na Sabouraud hranjivoj podlozi (34)

Često korištena podloga za diferencijaciju vrsta roda *Candida* je kromogena podloga koja sadrži određene indikatore zbog kojih će neke vrste kandida porasti u različitim bojama. Većina tih podloga omogućava razlikovanje *C. albicans* te još nekoliko *non-albicans* vrsta (obično *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* i *C. krusei*) što je prikazano na slici 15. (33)



Slika 15. Kulture različitih vrsta na kromogenoj podlozi (35)



Konačna identifikacija kvasaca zasniva se na biokemijskim testovima asimilacije i fermentacije šećera koji se mogu izvesti klasičnim ili poluautomatskim i automatskim metodama s ugrađenim bazama podataka (npr. Vitek 2, BioMerieux). (38, 39) Najnovija i najbrža metoda identifikacije kandida vrsta je MALDI-TOF MS (eng. *Matrix-assisted laser desorption-time of flight mass spectrometry*). (38)

#### **1.4.1. Metode testiranja osjetljivosti na antifungalne lijekove**

Testiranje osjetljivosti na antifungalne lijekove radi se prvenstveno iz primarno sterilnih uzoraka (npr. krv ili likvor) i to standardiziranim protokolom prema američkim ili europskim smjernicama. (33) Američki institut, The Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) i europski odbor, The European Committee and Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), razvili su metode za testiranje osjetljivosti kvasaca na antifungalne lijekove – AFST test (eng. *Microdilution-broth based antifungal susceptibility testing*). Metoda se temelji na određivanju minimalnih inhibitornih koncentracija (MIK) za svaki pojedini antifungalni lijek, metodom dilucije u bujonu. (31)

Princip testa se zasniva na ispitivanju sposobnosti rasta izoliranog soja kvasca pri određenim koncentracijama antifungalnog lijeka. Primarno, napravi se serija razrjeđenja antifungalnog lijeka u mediju točno određenog sadržaja, s obično neutralno reguliranim pH. Raspon koncentracija lijeka ovisi o organizmu i antifungalnom lijeku koji se testira. Raspon koncentracija trebao bi obuhvatiti krajnje točke koje određuju interpretaciju rezultata i očekivane vrijednosti. Svaka standardizirana otopina inokulirana je s točno određenim brojem organizama koji se ispituju. Broj organizama izražava se preko CFU/ml (eng. *Colony-forming unit*). Suspenzija za inokulaciju priprema se otapanjem pet reprezentativnih kolonija, inkubiranih 18-24 sata u destiliranoj vodi i neselektivnom agaru. Serija otopina ostavi se u inkubaciji 24 sata na temperaturi od 32 do 35°C. Rezultati se očitavaju mjereći absorbanciju pri određenim valnim duljinama (530nm, 405nm, 450nm). Gradijent strip test je jednostavnija varijanta ove metode, prikladnija je za rutinski rad u dijagnostičkom laboratoriju, a rezultati su reproducibilni i pouzdani. (36)

Minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) jest najmanja koncentracija antifungalnog lijeka koja inhibira rast gljiva. (31)

MIK<sub>50</sub> je koncentracija antifungalnog lijeka pri kojoj je inhibiran rast 50% testiranih izolata. MIK<sub>90</sub> je koncentracija antifungalnog lijeka pri kojoj je inhibiran rast 90% testiranih izolata. (31)

Interpretacija osjetljivosti kvasaca na antifungalne lijekove određuje se prema tkz. graničnim vrijednostima (engl. *clinical breakpoints*) MIK-ova. CLSI i EUCAST su postavili vrijednosti graničnih MIK-ova za točno određene vrste kandida i antimikotika. Granične vrijednosti mogu dati i informaciju o osjetljivosti metode u otkrivanju rezistencije izolata povezanih sa strečenim ili genetski-modificiranim mehanizmima rezistencije. Prema vrijednosti MIK-a, izolat se može svrstati u nekoliko različitih kategorija osjetljivosti na antifungik: osjetljiv (S), osjetljiv ovisno o dozi (SDD), umjereno osjetljiv (I) i rezistentan (R).  
(31)

## **2. CILJ I HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA**

**Cilj** ovoga istraživanja je utvrditi učestalost klinički značajnih vrsta roda *Candida* izoliranih iz kliničkih uzoraka pacijenata u Kliničkom bolničkom centru Split u 2018. godini te ispitati njihovu osjetljivost na antifungalne lijekove.

**Hipoteze:**

1. Učestalost klinički značajnih izolata *non-albicans* kandida u kliničkim uzorcima je veća od učestalosti izolata *C. albicans*.

2. Izolati *non-albicans* kandida su rezistentniji na antifungalne lijekove u odnosu na izolate *C. albicans*.

### **3. METODE**

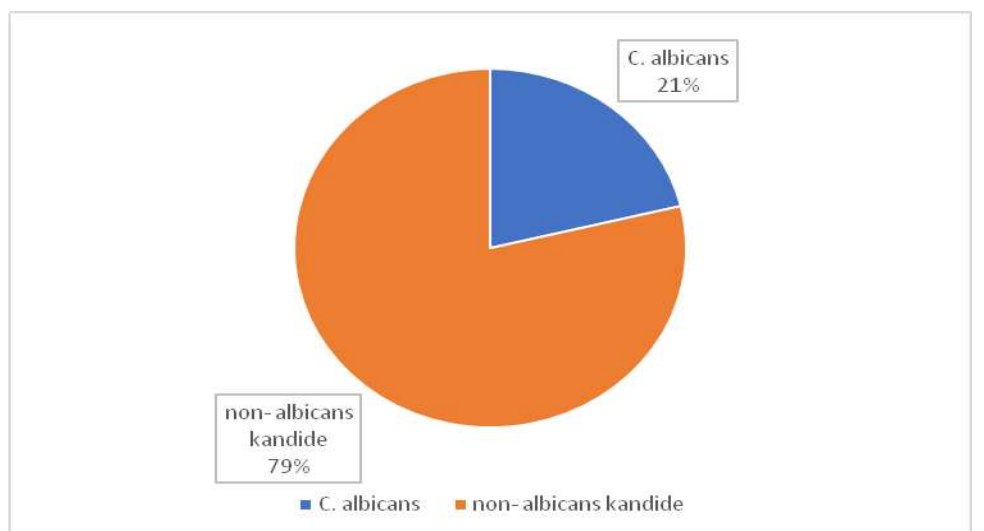
Provedeno je retrospektivno istraživanje u kojemu su analizirani podaci prikupljeni iz arhive Kliničkog zavoda za mikrobiologiju i parazitologiju KBC-a Split.

U istraživanje su konsekutivno uključeni svi klinički izolati kandida (izuzev ponavljajućih, tkz. „copy“ sojeva) kojima je ispitana osjetljivost na antifungike u Kliničkom zavodu za mikrobiologiju i parazitologiju u razdoblju od 1. siječnja 2018. godine do 31. prosinca 2018. godine.

Podaci su uneseni u programski paket Microsoft Office Excel za izradu tabličnog prikaza. Kvantitativni podaci opisani su medijanom i srednjom vrijednosti, dok su kategorijske varijable izražene apsolutnim brojevima i postotcima. Razlike vrijednosti podataka u ispitivanim skupinama obrađene su koristeći hi-kvadrat test u statističkom programu MedCalc za Windows (MedCalc Software, Ostend, Belgija). Razina statističke značajnosti postavljena je na  $p \leq 0,05$ .

#### **4. RESULTATI**

U razdoblju od 1. siječnja 2018. do 31. prosinca 2018. godine u Kliničnom bolničkom centru Split, obrađeno je ukupno 146 izolata iz roda *Candida* kojima je ispitana osjetljivost na antifungike. Njih 31 činili su izolati vrste *Candida albicans*, a njih 115 su bili izolati *non-albicans* vrsta što je prikazano na slici 16. Izolati kojima nije ispitivana osjetljivost nisu uključeni u ovo istraživanje.



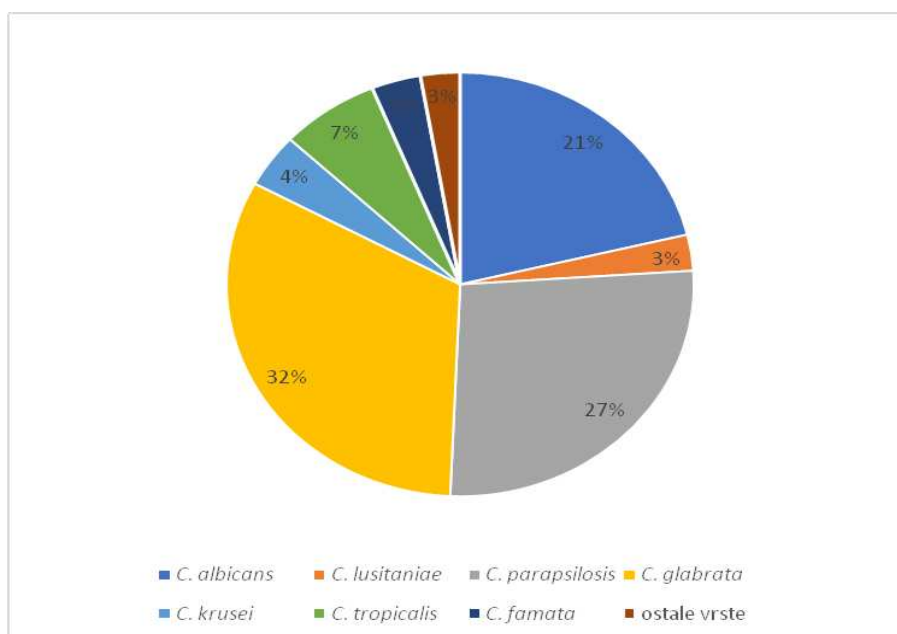
Slika 16. Raspodjela svih testiranih izolata kandida na *C. albicans* i tkz. *non-albicans* vrste.

Raspodjela učestalosti testiranih vrsta kandida prikazana je u tablici 1. i grafički na slici 17.

Tablica 1. Raspodjela izolata prema vrstama

Vrsta	N	%
<i>C. albicans</i>	31	21
<i>C. lusitaniae</i>	4	3
<i>C. parapsilosis</i>	39	27
<i>C. glabrata</i>	47	32
<i>C. krusei</i>	6	4
<i>C. tropicalis</i>	10	7
<i>C. famata</i>	5	3
Ostale vrste	4	3



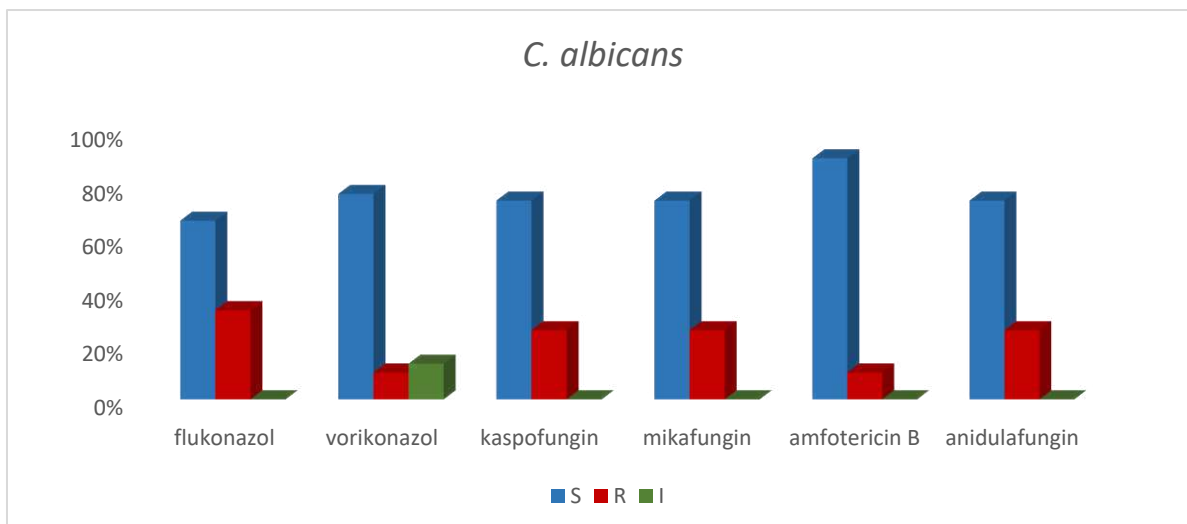


Slika 17. Raspodjela izolata prema vrstama

Po jedan soj *C. utilis*, *C. dubliniensis*, *C. guilliermondii* i *C. kefyr* je bio klinički značajan i testirana im je osjetljivost na antifungike. Zbog malog broja, ovdje su prikazani skupno kao „ostale vrste“.

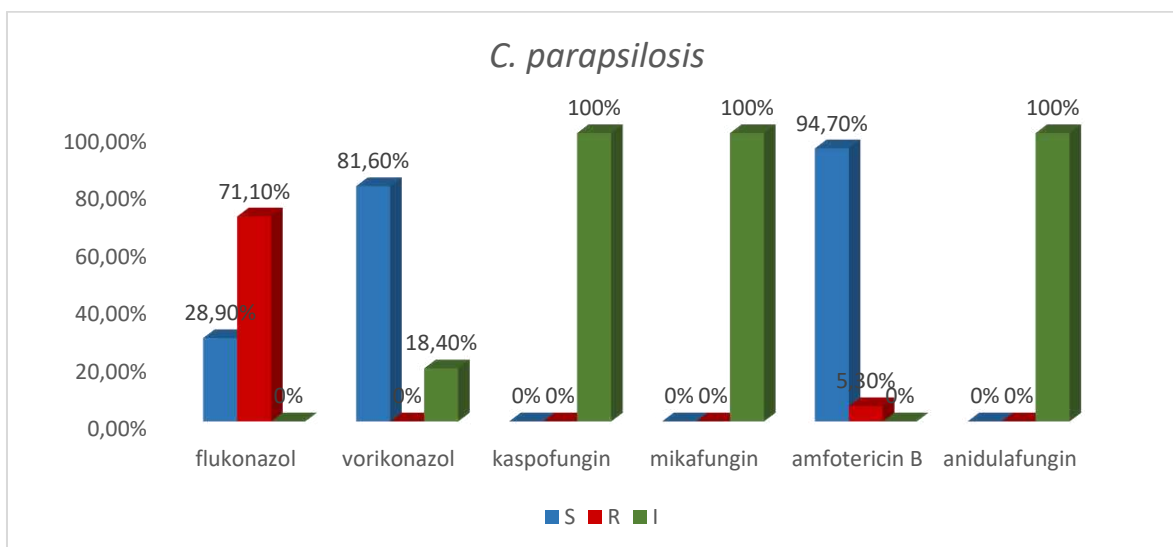
Izolatima je određena osjetljivost na 6 antifungalnih lijekova: flukonazol, vorikonazol, kaspofungin, mikafungin, anidulafungin i amfotericin B.

Na slici 18. prikazana je osjetljivost izolata *C. albicans* na različite antifungalne lijekove. Najviše rezistentnih izolata bilo je na flukonazol (33 %), dok je 25,8 % izolata bilo rezistentno na ehinokandine (kaspofungin, mikafungin i anidulafungin). *In vitro* rezistenciju na vorikonazol je ispoljilo 10 %, a na amfotericin B 10 % izolata.



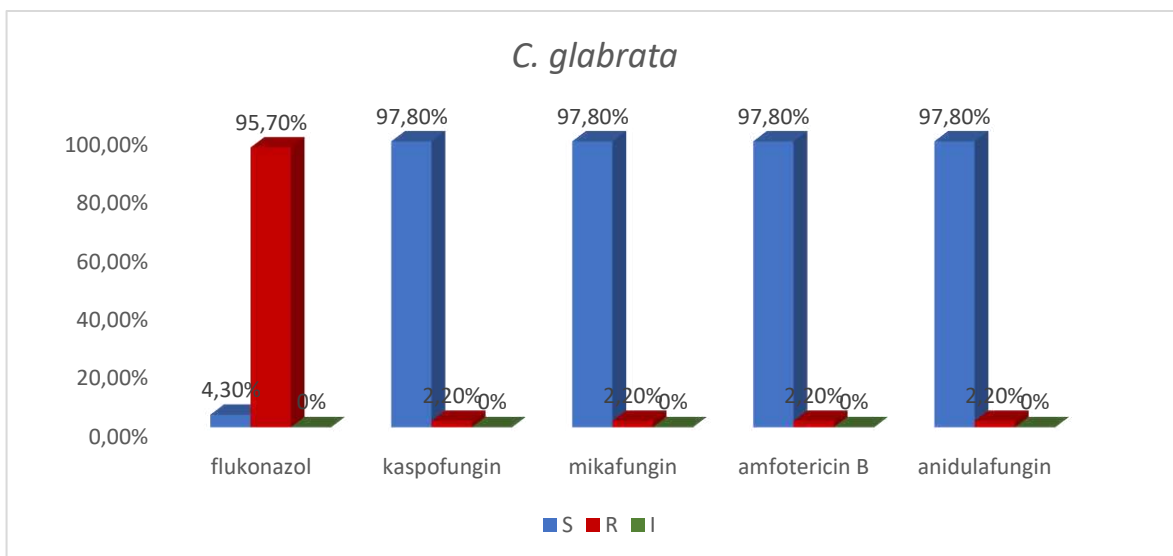
Slika 18. Osjetljivost izolata *C. albicans* na antifungalne lijekove

Osjetljivost izolata *C. parapsilosis* na antimikotike prikazana je na slici 19. Rezistenciju na flukonazol imalo je 71,1 % izolata, a na amfotericin B 5,8 %. Svi ispitani sojevi su bili su umjereno osjetljivi na kaspofungin, mikafungin i anidulafungin, a 18,4% ispitivanih izolata pokazalo je smanjenu osjetljivost na vorikonazol.



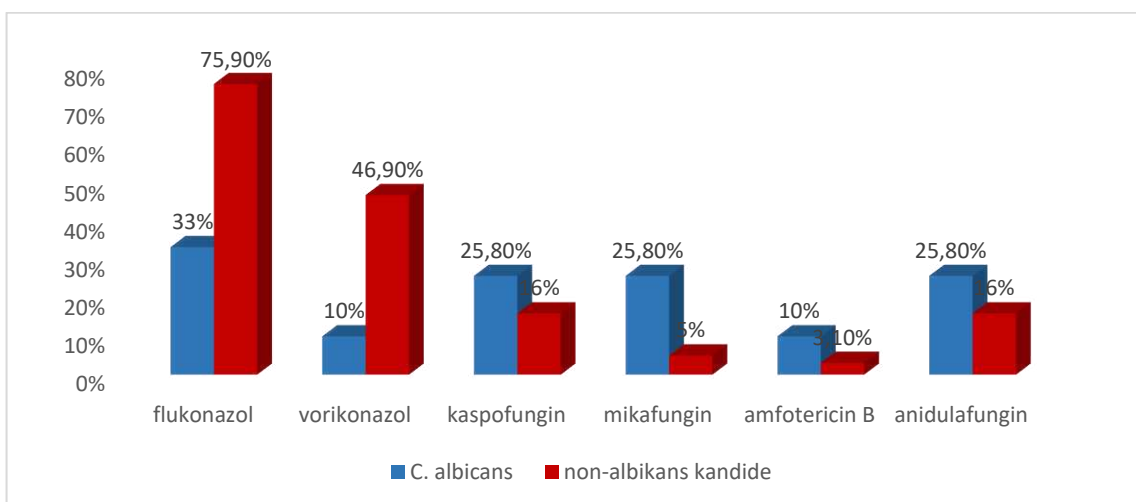
Slika 19. Osjetljivost izolata *C. parapsilosis* na antifungalne lijekove

Na slici 20. je prikazana osjetljivost izolata *C. glabrata* na antimikotike. Rezistenciju na flukonazol je imalo 95,7 % izolata, dok je 2,2 % izolata bilo rezistentno na ehinokandine (kaspofungin, mikafungin, anidulafungin) i amfotericin B.



Slika 20. Osjetljivost izolata *C. glabrata* na antifungalne lijekove

Analizirana je osjetljivost *non-albicans* vrsta u odnosu na osjetljivost izolata *C. albicans*. Dobiveni rezultati prikazani su na slici 21. Uočena je statistički značajno veća rezistencija izolata *non-albicans* kandida na flukonazol i vorikonazol ( $p \leq 0,05$ ).



Slika 21. Usporedba rezistencije na antifungalne lijekove *C. albicans* i *non-albicans* vrsta

U tablici 2. prikazan je raspon minimalnih inhibitornih koncentracija (MIK), MIK<sub>50</sub> i MIK<sub>90</sub> ispitivanih lijekova za vrstu *C. albicans*.

Tablica 2. Raspon vrijednosti MIK-ova, MIK<sub>50</sub> i MIK<sub>90</sub> izolata *C. albicans*.

<i>C. albicans</i>				
N	ANTIFUNGIK	MIK (raspon)	MIK <sub>50</sub>	MIK <sub>90</sub>
30	flukonazol	≤0,12 - 4	1	16
30	vorikonazol	≤0,12 - 4	0,12	0,25
31	kaspofungin	≤0,12 - 4	0,12	>4
31	mikafungin	≤0,06 - 4	0,06	1
31	anidulafungin	≤0,06 - 4	0,06	1
30	amfotericin B	≤0,25 - 8	0,5	1

U tablici 3. prikazan je raspon minimalnih inhibitornih koncentracija (MIK), MIK<sub>50</sub> i MIK<sub>90</sub> ispitivanih lijekova za vrstu *C. parapsilosis*

Tablica 3. Raspon vrijednosti MIK-ova, MIK<sub>50</sub> i MIK<sub>90</sub> izolata *C. parapsilosis*.

<i>C. parapsilosis</i>				
N	ANTIMIKOTIK	MIK (raspon)	MIK <sub>50</sub>	MIK <sub>90</sub>
38	flukonazol	≤0,5 - 32	8	16
38	vorikonazol	≤0,12 - 1	0,25	0,5
39	kaspofungin	0,25 - 2	1	1
39	mikafungin	≤0,06 - 2	0,5	1
39	anidulafungin	≤0,06 - 2	0,5	1
38	amfotericin B	≤0,12 - 4	0,5	1

U tablici 4. prikazan je raspon minimalnih inhibitornih koncentracija (MIK), MIK<sub>50</sub> i MIK<sub>90</sub> ispitivanih lijekova za vrstu *C. glabrata*.

Tablica 4. Raspon vrijednosti MIK-ova, MIK<sub>50</sub> i MIK<sub>90</sub> izolata *C. glabrata*.

<i>C. glabrata</i>				
N	ANTIMIKOTIK	MIK (raspon)	MIK <sub>50</sub>	MIK <sub>90</sub>
46	flukonazol	≤1	4	4
46	vorikonazol	≤0,12 - 4	0,25	1
46	kaspofungin	≤0,12 - 0,5	0,25	0,5
46	mikafungin	≤0,06 - 0,5	0,06	0,06
46	anidulafungin	≤0,06 - 0,5	0,06	0,06
45	amfotericin B	≤0,25 - 2	0,5	1

U tablici 5. prikazan je raspon minimalnih inhibitornih koncentracija (MIK), MIK<sub>50</sub> i MIK<sub>90</sub> ispitivanih lijekova za vrstu *C. tropicalis*.

Tablica 5. *C. tropicalis*

<i>C. tropicalis</i>				
N	ANTIMIKOTIK	MIK (raspon)	MIK <sub>50</sub>	MIK <sub>90</sub>
10	flukonazol	1.0	2	32
10	vorikonazol	≤0,12 - 4	0,12	1
10	kaspofungin	≤0,12	≤0,12	≤0,12
10	mikafungin	≤0,06	≤0,06	≤0,06
10	amfotericin B	≤0,25 - 0,5	0,5	0,5

Tri od četiri izolata (75 %) vrste *C. lusitaniae* bila su osjetljiva na flukonazol. Raspon minimalnih inhibitornih koncentracija za vorikonazol bio je od  $\leq 0,12$  do 0,25, za kaspofungin točno 0,25, za mikafungin od 0,25 do 0,5, a za amfotericin B od 0,5 do 1.

*C. krusei* ima urođenu rezistenciju na flukonazol. Svi izolati su bili osjetljivi na amfotericin B, vorikonazol i kaspofungin; s rasponom MIK-ova  $\leq 0,12$  do 0,25 za vorikonazol te 0,25 do 0,5 za kaspofungin. Četiri od šest (66,7 %) izolata bila su osjetljiva na mikafungin, s rasponom MIK-ova od  $\leq 0,06$  do 0,12.

Jedini izolat *C. utilis* bio je osjetljiv na flukonazol s MIK-om 2,00, kao i izolat *C. dubliniensis* s MIK-om  $\leq 0,5$  koji je bio osjetljiv i na vorikonazol (MIK  $\leq 0,12$ ).

Jedini izolat *C. guilliermondii* bio je osjetljiv na flukonazol s minimalnom inhibitornom koncentracijom 2,00.

Dva od pet izolata (40 %) *C. famata* bila su osjetljiva na flukonazol s rasponom minimalnih inhibitornih koncentracija od  $\leq 0,5$  do 32.

## **5. RASPRAVA**

Gljivične infekcije, uzrokovane različitim vrstama kandida, predstavljaju veliki zdravstveni problem, a njihova dijagnostika i liječenje stvara ogromne ekonomske troškove i opterećenje za zdravstveni sustav. (40) Epidemiologija invazivnih i neinvazivnih kandidijaza se značajno promijenila posljednjih desetljeća, kako u prevalenciji pojedinih vrsta kandida, tako i u razvoju rezistencije na antimikotike. (42) Iako je *C. albicans* dugo godina bila vodeći uzročnik invazivnih kandidijaza, oko 50 % današnjih infekcija uzrokuju *non-albicans* vrste. Ova promjena dijelom se može pripisati porastu incidencije rezistentnih sojeva kandida (zbog prevelike uporabe flukonazola, kako u profilaksi, tako i u liječenju) te učestalijoj upotrebi venskih katetera i drugih umjetnih materijala. (41)

Prema rezultatima ovog retrospektivnog istraživanja, iz analize svih klinički značajnih izolata roda *Candida* kojima je ispitana osjetljivost na antimikotike u Kliničkom bolničkom centru Split tijekom 2018. godine, rezistenciju na flukonazol pokazalo je 33 % izolata *C. albicans* i 75,9 % *non-albicans* kandida.

Europsko društvo za kliničku mikrobiologiju i infektologiju (ESCMID) i *Infectious Diseases Society of America* (IDSA) kao prvu liniju liječenja invazivnih kandidijaza preporučuju uporabu ehinokandina (npr. kaspofungin, mikafungin). Također, ehinokandini su i prvi izbor u empirijskoj terapiji kandidijaze u ne-neutropeničnih bolesnika u jedinicama intenzivnog liječenja (JIL) i bolesnika s intraabdominalnom kandidijazom. Pokazuju dobro antifungalno djelovanje na široki spektar vrsta roda *Candida*, a rezistencija na njih nije učestala. Prema potrebi, u terapiji se dodaje flukonazol ili vorikonazol oralno. Rezultati ovog istraživanja pokazuju da je 25,8 % testiranih izolata *C. albicans* rezistentno na ehinokandine (kaspofungin, mikafungin i anidulafungin), što odgovara podacima dobivenim istraživanjem Kullberga i suradnika (41). Od ukupnog broja testiranih *non-albicans* kandida, njih 16 % je bilo rezistentno na ehinokandine.

Rezultate studija o poboli i smrtnosti od invazivnih gljivičnih infekcija treba oprezno interpretirati, jer oni mogu varirati ovisno o denominatoru koji se koristi u istraživanju (npr. ukupan broj prijema, ukupan broj rizičnih pacijenata itd.). Također, ponekad je teško postaviti dijagnozu invazivne kandidijaze (kasna izolacija i identifikacija, nemogućnost uzimanja reprezentativnog kliničnog uzorka) pa je statistička analiza ponekad nepouzdana. (42)

U razdoblju od 2006. do 2008. godine, provedena je internacionalna studija u kojoj je sudjelovalo 14 europskih država. Incidencija invazivne kandidijaze je bila 9 na 1000



prijema u JIL (raspon 3-28), s velikim geografskim razlikama, gdje je Finska imala najnižu stopu incidencije, a Španjolska i Italija (geografski i klimatski slične Hrvatskoj) najveću. (42) Rezultati američke TRANSNET studije pokazali su stopu incidencije invazivne kandidijaze od 3,8 % u pacijenata koji su bili podvrgnuti transplantaciji solidnih organa. (42)

U studiji provedenoj u Švicarskoj, od 1999. do 2000. godine, analizirano je 1337 kandidemija, a rezultati su pokazali kako je *C. albicans* uzrokovala 66 % infekcija, bez značajnih promjena tijekom vremena. Slična studija provedena je u Njemačkoj u razdoblju od 1995. do 2004. godine, gdje je ukupni broj kandidemija porastao tijekom vremena, ali je *C. albicans* ostala najčešće izolirana vrsta (57,1 %). S druge strane, u istraživanju provedenom od 1999. do 2003. u Italiji, u populaciji pacijenata liječenih u JIL-u, uočen je porast incidencije kandidemije, a *C. albicans* je uzrokovala manje od 30 % infekcija (42)

Prema rezultatima meta-analize provedene na Sveučilištu u Kölnu, dokazan je sveukupni porast incidencije kandidemija kao i porast infekcija uzrokovanih *non-albicans Candida* vrstama. Posebno je uočen porast kandidemija uzrokovanih vrstama *C. parapsilosis* i *C. glabrata*. (43)

*C. parapsilosis* je prema istraživanjima druga ili treća najčešće izolirana vrsta kandida u pacijenata liječenih u JIL-u, a najčešće obolijeva novorođenčad, pacijenti podvrgnuti transplantaciji organa i pacijenti na parenteralnoj prehrani. (40, 44) Iako infekcije *C. parapsilosis* imaju manju stopu pobola i smrtnosti u odnosu na infekcije *C. albicans*, u posljednje vrijeme pronađeno je sve više izolata koji pokazuju rezistenciju na ehinokandine i azole te je uočena i križna rezistencija. (44) Prema rezultatima ovog istraživanja, od ukupno 146 analiziranih izolata, njih 39 pripada vrsti *C. parapsilosis* (27 %) što je čini drugom vrstom po učestalosti. Slični rezultati pronađeni su i u drugim mediteranskim zemljama (Grčka, Španjolska, Italija, Portugal) te Južnoj Americi. Sve veća učestalost izolata *C. parapsilosis* objašnjiva je činjenicom da se većinom radi o bolesnicima u JIL-u koji imaju ugrađene katetere i druge implantirane medicinske uređaje ili su to pacijenti na parenteralnoj prehrani. (44)

Prema rezultatima ovog istraživanja, rezistencija *C. parapsilosis* na flukonazol bila je 71,1 % što je zabrinjavajuće visok postotak. Studija SENTRY analizirala je rezistenciju različitih vrsta kandida na antifungalne lijekove, u bolesnika liječenih u JIL-u. Prema dobivenim rezultatima, rezistencija *C. parapsilosis* na flukonazol je bila 6,3 % .Od

iznimnog je značaja pratiti trendove osjetljivosti *C. parapsilosis* tijekom vremena, zbog uočenog razvoja rezistencije na flukonazol koji se često koristi u profilaktične svrhe. (45) Nadalje, u ovom istraživanju nije zabilježena rezistencija *C. parapsilosis* na vorikonazol, što odgovara podacima iz SENTRY studije, ali je 18,4 % izolata pokazalo umjerenu osjetljivost. (45) Također niti jedan izolirani soj *C. parapsilosis* nije bio rezistentan na ehinokandine. Ipak, važno je istaknuti da su svi testirani izolati bili umjereno osjetljivi na ehinokandine. Ova pojava bi mogla biti zabrinjavajuća, budući su ehinokandini lijek izbora prema raznim preporukama i terapijskim algoritmima. Kao što je u uvodu opisano, interpretacija osjetljivosti izolata vrši se prema graničnim vrijednostima MIK-ova koje je postavilo europsko društvo, EUCAST, za tekuću kalendarsku godinu. Interpretativni EUCAST kriteriji su se promijenili u 2020. godini u odnosu na one koji su vrijedili 2018. Npr., prema EUCAST kriterijima iz 2018. godine izolat bi bio osjetljiv na mikafungin, ako je MIK vrijednost bila manja od 0,002, a umjereno osjetljiv ako je vrijednost MIK-a veća od 0,002 i  $\leq 2,00$ . (46) Prema EUCAST kriterijima iz 2020. godine izolat bi bio osjetljiv na mikafungin ako mu je MIK vrijednost  $\leq 2,00$ . (47) U našem istraživanju, MIK vrijednosti za mikafungin bile su u rasponu od  $\leq 0,06$  do 2 tako da bi svi testirani izolati danas bili proglašeni osjetljivim na ehinokandine.. Rezistencija na amfotericin B u našem istraživanju iznosi 10 %, što je nešto više od podataka pronađenih u literaturi (5,5 %). (48)

Prema rezultatima ovog istraživanja, *C. glabrata* je bila najučestalija vrsta kandida kojoj je ispitivana osjetljivost na antimikotike tijekom 2018. godine. Od ukupno 146 izolata, 47 ih je bilo *C. glabrata* (32 %). *C. glabrata* ima visoku rezistenciju na azolne antifungalne lijekove (npr. flukonazol) zbog snažne ekspresije refluksih pumpi. (40, 49) Infekcija se češće javlja u odraslih pacijenata nego u djece i novorođenčadi. (40) Liječenje invazivnih kandidijaza koje uzrokuje *C. glabrata* iznimno je teško i praćeno je visokom stopom smrtnosti, osobito u odraslih pacijenata koji borave u jedinicama intenzivnog liječenja. Profilaksa flukonazolom smanjila je incidenciju težih oblika kandidijaze u novorođenčadi i imunokompromitiranih osoba, ali ima mali značaj kod liječenja invazivnih kandidijaza koje uzrokuje *C. glabrata*. (49)

Često se *C. glabrata* izolira zajedno s *C. albicans* kao uzrok orofaringealne kandidijaze. To je oportunistička infekcija usne šupljine (kandide su dio mikrobioma 60 % zdravih ljudi) koja se najčešće javlja zbog korištenja inhalacijskih kortikosteroida i antibiotika širokog spektra; u imunokompromitiranih i bolesnika sa šećernom bolesti. (49, 50) U posljednjih nekoliko godina učestalog izolata *C. glabrata* u uzorcima iz usne šupljine

porasla je za 17 %. Iako je koinfekcija česta, *C. glabrata* rijetko sama uzrokuje infekcije oralne šupljine. Nije invazivna prema mukoznom oralno-ezofagealnom epitelu već joj je potrebna koinfekcija s *C. albicans* čak i za samu kolonizaciju. Suprotno od toga, ima sposobnost kolonizacije gastrointestinalnog sustava, može djelovati invazivno na epitel te može uzrokovati deseminirane oblike infekcije u imunokomprimiranih pacijenata. (51)

Prema podacima ovog istraživanja, 95,7 % izolata *C. glabrata* bilo je rezistentno na flukonazol, dok je rezistencija na ehinokandine i amfotericin B iznosila 2,2 % što odgovara podacima iz literature. Iako imamo dobre rezultate što se tiče rezistencije na ehinokandine, u posljednje vrijeme pronađena je korezistencija izolata rezistentnih na flukonazol s ehinokandinima. Pretpostavlja se da sve veća uporaba azola i ehinokandina može dovesti do nastanka multirezistentnih sojeva *C. glabrata*. (40)

Uz dvije najčešće *non-albicans* vrste (*C. parapsilosis* i *C. glabrata*), u svijetu se značajno povećala incidencija *C. tropicalis*. (40) U 2018. godini, u KBC-u Split, testirano je 10 izolata *C. tropicalis* na antimikotike. Jedna je od najvirulentnijih vrsta kandida (odmah iza *C. albicans*). Najčešće se infekcija *C. tropicalis* javlja u neutropeničnih pacijenata te pacijenata oboljelih od malignih bolesti. (40) *C. tropicalis* pokazuje snažnu rezistenciju prema azolima, naročito flukonazolu. (40) Prema rezultatima našeg istraživanja, 40 % izolata bilo je rezistentno na flukonazol. Ovaj postotak treba uzeti s rezervom uzimajući u obzir relativno mali broj testiranih izolata *C. tropicalis*. Globalno, pokazuje nisku rezistenciju prema ehinokandinima, što odgovara rezultatima našeg istraživanja gdje su svi izolati bili osjetljivi na sva tri ispitana ehinokandina. (40)

Ozbiljan zdravstveni problem u svijetu u posljednje vrijeme predstavlja porast učestalosti infekcija uzrokovanih novoidentificiranom vrstom *C. auris*. Infekcija se obično javlja u bolničkom okruženju. Ova kandida ima sposobnost kolonizacije različitih suhih ili vlažnih površina te se pretpostavlja da se infekcije mogu širiti s pacijenta na pacijenta preko ruku zdravstvenog osoblja i medicinskih uređaja, ukoliko dezinfekcija nije adekvatna. Još uvijek nije poznato koliko su standardne metode dezinfekcije učinkovite protiv *C. auris*. Infekcije koje uzrokuje *C. auris* se teško dijagnosticiraju u kliničkoj praksi jer su za njihovu identifikaciju potrebne nove, moderne mikrobiološke metode. Ono što predstavlja najveći zdravstvenih problem ovih infekcija je rezistencija *C. auris* na većinu poznatih antifungalnih lijekova. Obično se radi o rezistenciji na dvije ili tri skupine antifungika, a 4 % izolata pokazuje rezistenciju na sve skupine antifungalnih lijekova. (40) U KBC-u Split, tijekom 2018. nije izolirana *C. auris*. Uzrok može biti nedostatak adekvatnih dijagnostičkih

metoda ili stvarna epidemiološka slika incidencije pojedinih vrsta kandida, među kojima *C. auris* još uvijek nije našla svoje mjesto.

Sve veći porast invazivnih gljivičnih infekcija predstavlja veliki zdravstveni problem, posebice nepravovremeno postavljena dijagnoza jer se simptomi invazivne kandidijaze mogu zamijeniti s drugim stanjima, npr. bakterijskom sepsom. Rana dijagnoza i pravovremena primjena antifungalnih lijekova, jedini su način smanjenja smrtnosti uzrokovane invazivnim kandidijazama. (52).

Iz svih iznesenih podataka, vidljiv je porast incidencije rezistencije svih vrsta kandida na antifungalne lijekove što predstavlja ozbiljan i značajan zdravstveni problem. Štoviše, očekuje se njegova eskalacija u narednim godinama, ukoliko se ozbiljnije ne poradi na prevenciji. Zabrinjavajuća je i pojava križne rezistencije između antifungika te pojava multirezistentnih i panrezistentnih izolata (sojeva rezistentnih na sve skupine lijekova). Uz potrebu ulaganja u razvoj farmaceutske industrije u smislu istraživanja i otkrivanja novih antifungalnih lijekova, bitno je naglasiti važnost racionalne uporabe lijekova, s posebnim naglaskom na ponekad neutemeljenu primjenu antifungika u profilaksi te bezreceptne preparate. Dokazano je kako prethodna izloženost lijeku može uzrokovati rezistenciju u budućnosti što dovodi do toga da treba pažljivo odabrati pacijente koji su prikladni za terapiju bezreceptnim antifungicima.

Jedno od polja djelovanja racionalnije primjene lijekova je svakako javno ljekarništvo. Gljivična oboljenja kože i noktiju u velikoj većini su u oblasti samoliječenja gdje pacijent, uz nadzor ljekarnika, donosi odluku o sigurnom liječenju. Pravilnim provođenjem ljekarničke skrbi osigurava se adekvatna primjena lijekova, za pravog pacijenta, na ispravan način i u točnoj dozi. Opisane su neke od situacija gdje ljekarnik pridonosi problemu pojave rezistencije.

Čest uzrok opetovanog korištenja bezreceptnih antifungalnih lijekova je njihova prekratka primjena, tj. preuranjeni prekid terapije. Naime, kožne mikoze se relativno lako i brzo liječe primjenom topičkih antifungika, a simptomi se smanjuju (ili prividno nestaju) već kroz par dana. Kada pacijenti uoče kliničko poboljšanje, samoinicijativno prestaju s korištenjem lijeka i tako značajno povećavaju vjerojatnost recidiva. Uloga ljekarnika je savjetovanje i edukacija pacijenata o ispravnoj primjeni lijeka (npr. mazati ne samo zahvaćeno područje već otprilike 1 cm izvan ruba lezije i to dovoljno dugo vremena, tj. minimalno 7 dana nakon povlačenja simptoma).

Jedan od primjera gdje ljekarnik utječe na sprječavanje gljivičnih infekcija je prilikom skrbi za bolesnike s astmom. Inhalacijski kortikosteroidi, samostalno ili u kombinaciji s dugodjelujućim agonistima beta receptora, temelj su liječenja astme. Pacijentu je potrebno savjetovati da nakon svakog korištenja inhalacijskog lijeka ispere usta vodom te ispljune sadržaj. Na taj način se znatno smanjuje pojava oralnih kandidijaza te je smanjena upotreba antifungalnih lijekova za liječenje komplikacija, koje se lako mogu izbjeći.

Druga skupina kroničnih bolesnika koju valja spomenuti su pacijenti oboljeli od šećerne bolesti. Uz savjete o nefarmakološkim mjerama koje uz medikaciju znatno popravljaju stanje bolesti, od iznimne je važnosti svakome pacijentu objasniti pravilnu njegu stopala i usne šupljine. Nakon svakog kupanja, stopala je potrebno nježno osušiti, pregledati i pratiti promjene (rane, crvenilo, svrbež) te svako odstupanje od normalnog prijaviti svome liječniku. Naime, pacijenti često u svojoj kućnoj ljekarni imaju lokalni pripravak (kremu, mast) s antifungalnim i antibiotskim djelovanjem te ranice, crvenilo i svrbež tretiraju na svoju ruku. Na taj način, ne samo da djeluju na povećanje rezistencije na antifungalne i antibiotske lijekove, već zapravo ignoriraju i maskiraju znakove koji upućuju kako njihova regulacija bolesti možda nije adekvatna. Pacijentima se mogu savjetovati puderi koji smanjuju znojenje nogu, korištenje čarapa od prirodnih materijala, ravno rezanje noktiju i nošenje prozračnije obuće kako bi se spriječile gljivične infekcije. Bolesnici sa šećernom bolesti skloni su oštećenju i infekcijama usne šupljine te je za njih izrazito bitna oralna higijena. Potrebno je savjetovati četkice s mekanim vlaknima uz kombinaciju intradentalnih četkica te ispiranje usta blagim antisepticima (upozoriti na potrebite pauze). Na ovakav način uz bolju regulaciju šećerne bolesti znatno se smanjuju komplikacije koje predstavljaju jedan od glavnih tereta zdravstvenog sustava u svijetu.

Ljekarnici, kao dio multidisciplinarnog tima zdravstvenih djelatnika, svojim djelovanjem u svakodnevnoj praksi značajno mogu utjecati na smanjenje razvoja rezistencije na antimikotike i antibiotike općenito. Oni su često prve, a ponekad i jedine osobe zdravstvene profesije kojima se pacijenti javljaju za savjet za svoje zdravstvene probleme. Mudrim i promišljenim pristupom, učinkovito se pacijente usmjerava na ispravni pristup i vodi kroz racionalnu i učinkovitu primjenu antimikrobnih lijekova.

## **6. ZAKLJUČCI**

U periodu od siječnja 2018. godine do 31. prosinca 2018. godine, u Kliničkom zavodu za mikrobiologiju i parazitologiju Kliničkog bolničkog centra Split, ukupno je izolirano 146 izolata vrsta roda *Candida* kojima je ispitivana osjetljivost na antifungalne lijekove.

Najučestalije testirana vrsta bila je *C. glabrata* (32 %), a druga najučestalije testirana vrsta bila je *C. parapsilosis* (27 %). Ukupna učestalost svih testiranih *non-albicans* vrsta (79 %) bila je značajno veća od učestalosti *C. albicans* (21%).

Prema podacima ovog istraživanja, dokazana je statistički značajnija rezistencija *non-albicans* kandida na azolnu skupinu antifungika (flukonazol i vorikonazol) u odnosu na *C. albicans*. Ista razlika nije dokazana za ehinokandine (prva linija liječenja invazivnih kandidijaza) i amfotericin B.

Visok stupanj rezistencije predstavlja značajan problem zdravstvenog sustava te je od osobite važnosti pažnju usmjeriti na racionalniju primjenu antifungalnih lijekova. Iako se veliko znanja i sredstava usmjerava prema farmaceutskoj industriji i otkivanju novih antifungalnih lijekova, ipak, nužno je istaknuti veliku važnost svih zdravstvenih djelatnika u smanjenju rezistencije na lijekove, osobito ljekarnika, koji su pacijentima najdostupniji, a često i jedini zdravstveni djelatnici kojima se obraćaju u nadi brzog rješenja svojih zdravstvenih problema.





## 7. POPIS CITIRANE LITERATURE

1. Mlinarić-Missoni E. Poglavlje 54. U: Uzunović-Kamberović S. Medicinska mikrobiologija. Fojnica: Štamparija Fojnica d.o.o.; 2009. str. – str. 539,540
2. Mlinarić-Missoni E. Poglavlje 50. U: Uzunović-Kamberović S. Medicinska mikrobiologija. Fojnica: Štamparija Fojnica d.o.o.; 2009. str. 545, 547
3. Howard KC , Dennis EK , Watt DS , Garneau-Tsodikova S . A comprehensive overview of the medicinal chemistry of antifungal drugs: perspectives and promise. Chem Soc Rev. 2020 Apr 21;49(8):2426-2480.
4. de Oliveira Santos GC, Vasconcelos CC, Lopes AJO, de Sousa Cartágenes MDS, Filho AKDB, do Nascimento FRF i suradnici. *Candida* Infections and Therapeutic Strategies: Mechanisms of Action for Traditional and Alternative Agents. Front Microbiol. 2018 Jul 3;9:1351.
5. Kaur R, Singh M, Ritu Dhakad, Kumar R. Emergence of non-*albicans Candida* species and antifungal resistance in intensive care unit patients. Asian Pac. J. Trop. Biomed. Dec 2015. 6(5), 455-460
6. Walsh TJ, Dixon DM. Spectrum of Mycoses. In: Baron S, editor. Medical Microbiology. 4th edition. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996.
7. Mlinarić-Missoni E. Poglavlje 50. U: Uzunović-Kamberović S. Medicinska mikrobiologija. Fojnica: Štamparija Fojnica d.o.o.; 2009. str. 623
8. Mlinarić-Missoni E. Poglavlje 50. U: Uzunović-Kamberović S. Medicinska mikrobiologija. Fojnica: Štamparija Fojnica d.o.o.; 2009. str. 623
9. Mlinarić-Missoni E. Poglavlje 58. U: Uzunović-Kamberović S. Medicinska mikrobiologija. Fojnica: Štamparija Fojnica d.o.o.; 2009. str. 643
10. Mlinarić-Missoni E. Poglavlje 59. U: Uzunović-Kamberović S. Medicinska mikrobiologija. Fojnica: Štamparija Fojnica d.o.o.; 2009. str. 657
11. Mlinarić-Missoni E. Poglavlje 60. U: Uzunović-Kamberović S. Medicinska mikrobiologija. Fojnica: Štamparija Fojnica d.o.o.; 2009. str. 674
12. <https://www.medicinenet.com/script/main/art.asp?articlekey=11073>, pritup: 15. listopad 2020. godine
13. De Rosa FG, Garazzino S, Pasero D, Di Perri G, Ranieri VM. Invasive candidiasis and candidemia: new guidelines. Minerva Anestesiol. 2009 Jul-Aug;75(7-8):453-8.

14. Van Dijck P, Sjollemma J, Cammue BP, Lagrou K, Berman J, d'Enfert C i suradnici Methodologies for *in vitro* and *in vivo* evaluation of efficacy of antifungal and antibiofilm agents and surface coatings against fungal biofilms. *Microb Cell*. 2018 Jun 14;5(7):300-326.
15. <https://www.gaffi.org/why/fungal-disease-frequency/>, pristup: 15. listopada 2020. godine
16. Morbidity and Mortality Due to Fungal Infections Pal, M. Morbidity and Mortality Due to Fungal Infections. *J Appl Microbiol Biochem*, 2017 Jan, 1(1);1-3
17. <https://www.cdc.gov/fungal/diseases/candidiasis/index.html>, pristup: 15. listopada 2020. godine
18. Mlinarić-Missoni E. Poglavlje 54. U: Uzunović-Kamberović S. Medicinska mikrobiologija. Fojnica: Štamparija Fojnica d.o.o.; 2009. str. 583-585, 587
19. <http://www.chemspider.com/>, pristup: 15. listopada 2020. godine
20. Stone NR, Bicanic T, Salim R, Hope W. Liposomal Amphotericin B (AmBisome®): A Review of the Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, Clinical Experience and Future Directions. *Drugs*. 2016 Mar;76(4):485-500.
21. <https://www.medicinenet.com/script/main/art.asp?articlekey=22907>, pristup: 15. listopada 2020. godine
22. Mazu TK, Bricker BA, Flores-Rozas H, Ablordeppey SY. The Mechanistic Targets of Antifungal Agents: An Overview. *Mini Rev Med Chem*. 2016;16(7):555-578. doi:10.2174/1389557516666160118112103
23. Yang H, Tong J, Lee CW, Ha S, Eom SH, Im YJ. Structural mechanism of ergosterol regulation by fungal sterol transcription factor Upc2. *Nat Commun*. 2015 Feb 6;6:6129.
24. Jun-Feng L., Jun-Jie X., Kai-Li N., Fang W., Li D. Outline of the biosynthesis and regulation of ergosterol in yeast. *World J Microbiol Biotechnol*. 2019 Jun 20;35(7):98.
25. Brajtburg J, Powderly W G., Kobayashi G S., Medoff G. Amphotericin B: current understanding of mechanisms of action. *Antimicrob Agents Chemother*. 1990 Feb;34(2):183-8
26. Allana J S., Elias B C., Holly E B. Echinocandins: the newest class of antifungals. *Ann Pharmacother*. 2009 Oct;43(10):1647-57.

27. Ryder NS., Terbinafine: mode of action and properties of the squalene epoxidaseinhibition. *Br J Dermatol.* 1992 Feb;126 Suppl 39:2-7.
28. Vermes A, Guchelaar H J., Dankert J. Flucytosine: a review of its pharmacology, clinical indications, pharmacokinetics, toxicity and drug interactions. *J Antimicrob Chemother.* 2000 Aug;46(2):171-9.
29. K Khosravi Rad, Falahati M., Roudbary M., Farahyar S., Nami S. Overexpression of MDR-1 and CDR-2 genes in fluconazole resistance of *Candida albicans* isolated from patientswith vulvovaginal candidiasis. *Curr Med Mycol.* 2016 Dec;2(4):24-29.
30. O'Shaughnessy EM, Lyman CA, Walsh TJ. Chapter 25: Amphotericin B: Polyene Resistance Mechanisms. In: Mayers D. *Antimicrobial Drug Resistance: Mechanisms of Drug Resistance.* Springer International Publishing, New York, 2009.
31. Patrick V.D., Jelmer S., Bruno P C., Katrien L., Judith B., Christophe d&#39;E. i sur.Methodologies for in vitro and in vivo evaluation of efficacy of antifungal and antibiofilmagents and surface coatings against fungal biofilms. *Microb Cell.* 2018 Jun 14;5(7):300-326.
32. Hokken MWJ, Zwaan BJ, Melchers WJG, Verweij PE. Facilitators of adaptation and antifungal resistance mechanisms in clinically relevant fungi. *Fungal Genet Biol.* 2019 Nov;132:103254.
33. Mlinarić-Missoni E. Poglavlje 55. U: Uzunović-Kamberović S. *Medicinska mikrobiologija.* Fojnica: Štamparija Fojnica d.o.o.; 2009. str. 593-598. 601-603
34. <https://www.microbiologyinpictures.com/bacteria-photos/candida-albicans-photos/chromogenic-candida-agar.html>, pristup: 15. listopada 2020. godine
35. Odds FC, Bernaerts R. CHROMagar *Candida*, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important *Candida* species. *J Clin Microbiol.* 1994;32(8):1923-1929. doi:10.1128/JCM.32.8.1923-1929.1994
36. <https://www.biomerieux-diagnostics.com/etestr>, pristup: 15. listopada 2020. godine
37. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techpcr/>, pristup: 15. listopada 2020. godine
38. Deorukhkar SC, Roushani S. Identification of *Candida* Species: Conventional Methods in the Era of Molecular Diagnosis. *Ann Microbiol Immunol.* 2018; 1(1): 1002
39. <https://www.biomerieux-usa.com/clinical/vitek-2-healthcare>, pristup: 15. listopada 2020. godine

40. Pristov KE, Ghannoum MA. Resistance of *Candida* to azoles and echinocandins worldwide. *Clin Microbiol Infect.* 2019 Jul;25(7):792-798.
41. Kullberg BJ, Vasquez J, Mootsikapun P, Nucci M, Paiva JA, Garbino J i suradnici. Efficacy of anidulafungin in 539 patients with invasive candidiasis: a patient-level pooled analysis of six clinical trials. *J Antimicrob Chemother.* 2017 Aug 1;72(8):2368-2377.
42. Bassetti M, Righi E, Montravers P, Cornely OA. What has changed in the treatment of invasive candidiasis? A look at the past 10 years and ahead. *J Antimicrob Chemother.* 2018 Jan 1;73(suppl\_1):i14-i25.
43. Koehler P, Stecher M, Cornely OA, Koehler D, Vehreschild MJGT, Bohlius J, Wisplinghoff H, Vehreschild JJ. Morbidity and mortality of candidaemia in Europe: an epidemiologic meta-analysis. *Clin Microbiol Infect.* 2019 Oct;25(10):1200-1212.
44. Tóth R, Nosek J, Mora-Montes HM, Gabaldon T, Bliss JM, Nosanchuk JD, Turner SA, Butler G, Vágvolgyi C, Gácsér A. *Candida parapsilosis*: from Genes to the Bedside. *Clin Microbiol Rev.* 2019 Feb 27;32(2):e00111-18.
45. Pfaller MA, Messer SA, Moet GJ, Jones RN, Castanheira M. *Candida* bloodstream infections: comparison of species distribution and resistance to echinocandin and azole antifungal agents in Intensive Care Unit (ICU) and non-ICU settings in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2008-2009). *Int J Antimicrob Agents.* 2011 Jul;38(1):65-9.
46. [https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Breakpoint\\_tables/v\\_9.0\\_Breakpoint\\_Tables.pdf](https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_9.0_Breakpoint_Tables.pdf), pristup: 15. listopada 2020. godine
47. [https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/AFST/Clinical\\_breakpoints/AFST\\_BP\\_v10.0\\_200204\\_updatd\\_links\\_200924.pdf](https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/AFST/Clinical_breakpoints/AFST_BP_v10.0_200204_updatd_links_200924.pdf), pristup: 15. listopada 2020. godine
48. Deorukhkar SC, Saini S, Mathew S. Non-albicans *Candida* Infection: An Emerging Threat. *Interdiscip Perspect Infect Dis.* 2014;2014:615958.
49. Tati S, Davidow P, McCall A, et al. *Candida glabrata* Binding to *Candida albicans* Hyphae Enables Its Development in Oropharyngeal Candidiasis. *PLoS Pathog.* 2016;12(3):e1005522.

50. Pankhurst CL. Candidiasis (oropharyngeal). *BMJ Clin Evid.* 2009;2009:1304. Published 2009 Mar 18.
51. Charlet, R., Pruvost, Y., Tumba, G. *et al.* Remodeling of the *Candida glabrata* cell wall in the gastrointestinal tract affects the gut microbiota and the immune response. *Sci Rep* 8, 3316 (2018).
52. Pappas PG, Kauffman CA, Andes DR, Clancy CJ, Marr KA, Ostrosky-Zeichner L, Reboli AC, Schuster MG, Vazquez JA, Walsh TJ, Zaoutis TE, Sobel JD. Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis.* 2016 Feb 15;62(4):e1-50.

## **8. SAŽETAK**

**Uvod:** Gljivične infekcije, uzrokovane različitim vrstama kandida, predstavljaju veliki zdravstveni problem, a njihova dijagnostika i liječenje stvara ogromne troškove i opterećenje za zdravstveni sustav. Epidemiologija invazivnih i neinvazivnih kandidijaza se značajno promijenila posljednjih desetljeća, kako u prevalenciji pojedinih vrsta kandida, tako i u razvoju rezistencije na antimikotike. Iako je *C. albicans* dugo godina bila vodeći uzročnik invazivnih kandidijaza, oko 50 % današnjih infekcija uzrokuju *non-albicans* vrste.

**Cilj istraživanja:** Cilj ovog istraživanja je utvrditi distribuciju najznačajnijih vrsta kandida kojima je ispitana osjetljivost na antimikotike te odrediti učestalost rezistentnih sojeva kandida na testirane lijekove u Kliničkom bolničkom centru Split u 2018. godini.

**Materijali i metode:** U ovom retrospektivnom istraživanju korišteni su podatci arhive Kliničkog zavoda za mikrobiologiju i parazitologiju KBC Split. Prikupljeni su podatci o svim klinički značajnim sojevima kandida kojima je ispitana osjetljivost na antifungalne lijekove u periodu istraživanja. Ponavljajući ili tzv. „copy“ sojevi nisu uvršteni u analizu. Kvantitativni podatci opisani su medijanom i srednjom vrijednosti, dok su kategorijske varijable izražene apsolutnim brojevima i postocima. Razlike vrijednosti podataka u ispitivanim skupinama obrađene su koristeći hi-kvadrat test. Razina statističke značajnosti postavljena je na  $p \leq 0,05$

**Rezultati:** U razdoblju istraživanja, ispitana je osjetljivost na antimikotike ukupno 146 izolata kandida, od kojih je 79 % pripadalo *non-albicans* vrstama, što je značajno više od broja testiranih izolata *C. albicans* (21 %). Najčešće testirane vrste bile su *C. glabrata* (32 %), *C. albicans* (21 %) i *C. parapsilosis* (27 %). Rezistencija *non-albicans* vrsta na flukonazol (76 % izolata) je bila značajno viša od rezistencije *C. albicans* (33 % izolata). Rezultati ovog istraživanja pokazuju da je 25,8 % testiranih izolata *C. albicans* te 16 % testiranin *non-albicans* izolata, rezistentno na ehinokandine,

**Zaključak:** Veći broj klinički značajnih izolata *non-albicans* kandida od izolata *C. albicans* kao i zabilježena rezistencija na najčešće primjenjivane antimikotike (flukonazol i ehinokandine), naglašava potrebu praćenja i redovitog testiranja izolata različitih vrsta kandida na antimikotike. Istraživanjem i analizom trendova prevalencije pojedinih vrsta kandida i frekvencija njihovih rezistencija na antimikotike, mogu se postaviti algoritmi empirijske i ciljane antifungalne terapije.

## **9. SUMMARY**



**Background:** Fungal infections, caused by different *Candida* species, represent a great medical issue and their diagnostic and treatment creates enormous expenses and burden for the healthcare system. Epidemiology of invasive and non-invasive candidiasis has significantly changed over the last decades, as much in prevalence of individual *Candida* species, as in development of resistance to antifungal drugs. Although *C. albicans* was the leading cause of invasive candidiasis for many years, around 50 % of contemporary infections are caused by *non-albicans* species.

**Objectives:** The aim of this study was to determine the distribution of the most significant *Candida* species, that were tested for antifungal susceptibility. The aim was also to determine the frequency of *Candida* strains resistant to tested drugs in the University Hospital of Split in 2018.

**Materials and methods:** In this retrospective study, data has been used from the archive of Department of Microbiology and Parasitology, University Hospital of Split. The information about all clinically significant *Candida* strains, that were tested for antifungal susceptibility in period of the study, was collected. Repetitive or so-called “copy” strains were not included in the analysis. Quantitative data is described with median and mean value, while categorical variables are expressed with absolute numbers and percentages. The differences between values of the data in the observed species were analysed using chi-square test. The level of statistical significance was set to  $p \leq 0,05$ .

**Results:** In the period of the study, 146 *Candida* species were tested for antifungal susceptibility, out of which 79 % belonged to *non-albicans* species, which is significantly higher than the number of tested *C. albicans* isolates (21 %). Most frequently tested species were *C. glabrata* (32 %), *C. albicans* (21 %) and *C. parapsilosis* (27 %). Resistance of *non-albicans* species to fluconazole (76 %) was significantly higher than the resistance of *C. albicans* (33 %). Results of this study show that 25,8 % of all tested *C. albicans* isolates and 16% of tested *non-albicans* isolates, are resistant to echinocandins.

**Conclusion:** Higher proportion of tested *non-albicans Candida* isolates than *C. albicans* isolates, as well as recorded resistance to frequently used antifungal drugs, emphasizes the need of continuous antimicrobial surveillance and susceptibility testing of different *Candida species* to antifungal drugs. Analysing and monitoring trends of prevalence of individual *Candida* species, and their resistance to antifungal drugs, can help in establishing algorithms for empirical and final antifungal therapy.

## **10. ŽIVOTOPIS**

### **OSOBNI PODATCI:**

- Ime i prezime: Katarina Širić
- Datum i mjesto rođenja: 22. svibanj 1996. godine, Žepče, Bosna i Hercegovina
- Državljanstvo: hrvatsko
- E-adresa: katarina.siric@gmail.com

### **OBRAZOVANJE:**

- 2003. – 2011. Osnovna škola Žepče
- 2011. – 2015. Katolički školski centar Don Bosco Žepče, smjer: opća gimnazija
- 2015. – 2020. Medicinski fakultet i Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu, studij farmacije

### **DODATNA EDUKACIJA:**

- Kongres farmacije u Dubrovniku 2019. godine (+ postersko izlaganje)
- Mayo Clinic Short Course on Epigenomics
- 11th International Society for Applied Biological Sciences Conference
- PharmaAkademija listopad 2019. godine i ožujak 2020. godine
- School of Scientific Writing
- EPSA Mentoring Project 2018.

### **JEZICI:**

- Engleski jezik (C1)

### **VOLONTERSKO ISKUSTVO:**

Akadska godina 2017./2018:

- koordinatorica javnozdravstvenih kampanja splitske podružnice Udruge studenata farmacije i medicinske biokemije Hrvatske (Svjetski dan borbe protiv AIDS-a, Tjedan raka, Tjedan oralnog zdravlja, Svjetski dan epilepsije, CPSAlab radionica)
- organizacija humanitarnih događaja (Fritulijada, Svjetski dan žena, Muffinijada)

Akadska godina 2018./2019.

- predsjednica splitske podružnice Udruge studenata farmacije i medicinske biokemije Hrvatske

- članica Organizacijskog odbora trećeg Praktična znanja za studente (edukacija)
- članica Organizacijskog odbora Natjecanja u izradi magistralnih pripravaka (edukacija i logistika)
- članica Organizacijskog odbora petog i šestog Kongresa Udruge studenata farmacije i medicinske biokemije Hrvatska (IT povjerenik)
- članica Organizacijskog odbora stručnog skupa Nobel Days (financije)
- redakcija časopisa Recipe

**RADNO ISKUSTVO:**

- Dukat d.o.o. – promotor
- Pčelarstvo Radošević – promotor

**INTERESI:**

- Javno zdravstvo
- IT