

Pregled biotipova vrste *Candida albicans* izdvojenih iz uzoraka materijala hospitaliziranih bolesnika

Verica VAŽIĆ-BABIĆ¹), dr. sc., dipl. ing. biologije

Emilija MLINARIĆ-MISSONI¹), dr. sc., dr. med., specijalista medicinske mikrobiologije i parazitologije

Smilja KALENIĆ²), prof. dr. sc., dr. med., specijalista mikrobiologije i parazitologije

1) Odsjek za mikologiju, Hrvatski zavod za javno zdravstvo

2) Klinički zavod za kliničku mikrobiologiju i bolničke infekcije, KBC Zagreb

Ključne riječi

biotop

Candida albicans

hospitalizirani bolesnici

Key words

Biotype

Candida albicans

hospitalized patients

Primljeno: 2005–03–08

Received: 2005–03–08

Prihvaćeno: 2005–03–17

Accepted: 2005–03–17

Uvod

Candida albicans ubikvitarni je komenzalni kvasac ljudi i čini fiziološku floru kože i sluznica. Izuzetno rijetko uzrokuje bolest u osoba očuvanog imuniteta. Kada obrana organizma zakaže iz bilo kojih razloga, ovaj se kvasac ponaša kao oportunist. Tada počinje jača kolonizacija sluznica, može ulaziti u krvotok i stvarati žarišta u jednom ili u više organa.

Infekcije ovim kvascem javljaju se češće u bolesnika oboljelih od malignih [1, 2, 3] i endokrinoloških bolesti [4], u onih s teškim operativnim zahvatima [5] i različitim imunološkim deficijencijama [6, 7, 8]. Vrste roda *Candida* najčešći su uzročnici (78,3 %) gljivičnih infekcija, a vrsta *C. albicans* uzrokuje više od 50 % infekcija [9,

Znanstveni članak

Metodom biotipizacije po Oddsu i Abbottu tipizirano je 910 izolata vrste *Candida albicans* iz uzoraka materijala različitih organskih sustava 360 hospitaliziranih bolesnika. Tipizacijom je dobiveno 79 biotipova, a 14 najučestalijih (355, 305, 345, 155, 357, 105, 315, 144, 157, 115, 057, 257, 300 i 244) činilo je 89,3 % svih biotipova ove vrste. Najučestaliji biotip bio je 355 i činio je 20,9 % svih biotipova vrste *C. albicans* iz svih uzoraka. Ovaj biotip bio je zastupljen s 36,2 % u izolatima iz kardiovaskularnog sustava, s 21,4 % u izolatima iz dišnog sustava, s 20,1 % u izolatima iz probavnog sustava, s 19,5 % u izolatima iz obrisaka kože, s 19,4 % u izolatima iz središnjeg živčanog sustava i sa 17,1 % u izolatima iz spolnomokračnog sustava. Ova metoda biotipizacije pogodna je za epidemiološka istraživanja zastupljenosti biotipova vrste *C. albicans*, jer omogućava ispitivanje velikog broja izolata, a ne iziskuje velike materijalne troškove i skupu opremu.

Biotypes of *Candida albicans* isolated from clinical material of hospitalized patients

Scientific article

Using the Odds and Abbott method, 910 isolates of *Candida albicans* were typed. They were isolated from samples of different systems in 360 hospitalized patients. Typing revealed 79 biotypes where 14 (355, 305, 345, 155, 357, 105, 315, 144, 157, 115, 057, 257, 300 i 244) of them were the most common, accounted for 89.3 % of all biotypes. The most common biotype, 355, made up 20.9 % of all biotypes of this species isolated from all samples. It was present in 36.2 % of isolates from the cardiovascular system, 21.4 % of isolates from the respiratory system, 20.1 % of isolates from the gastrointestinal system, 19.5 % of isolates from the skin, 19.4 % of isolates from the central nervous system, and in 17.1 % of isolates from the urogenital system. This method is suitable for epidemiological research of the presence of *C. albicans* biotypes because it enables the testing of a large number of isolates with very low cost and reasonably simple equipment.

10]. Za određivanje tipova ove vrste mogu se koristiti različite metode fenotipske tipizacije (biotipizacija, serotipizacija, morfotipizacija, enzimotipizacija, rezistotipizacija, auksonotipizacija, osjetljivost na antimikotike i »killer« toksine) i genotipizacije [11, 12]. Rezultati istraživanja drugih autora pokazali su da metoda biotipizacije ima visoku reproducibilnost i sposobnost razlikovanja tipova unutar vrste *C. albicans* [12]. Svrha ovog rada bila je određivanje tipova izolata vrste *C. albicans* metodom biotipizacije po Oddsu i Abbottu [13, 14]. Ovom metodom tipizacije moguće je dobiti 512 različitih biotipova ove vrste, što omogućuje praćenje zastupljenosti pojedinih biotipova u različitim sustavima bolesnika kao i otkrivanje mogućih izvora infekcije. Metoda je pogodna za ispitivanje velikog broja izolata i ne iziskuje velike materijalne troškove i skupu opremu.

Uzorci i metode

Uzorci

U radu je tipizirano 910 izolata vrste *Candida albicans* iz uzoraka materijala šest sustava – probavnog (358 izolata), dišnog (210 izolata), spolnomokračnog (135 izolata), kardiovaskularnog (58 izolata), središnjeg živčanog sustava (36 izolata) te kože (113 izolata) 360 bolesnika hospitaliziranih u različitim odjelima KBC Zagreb. Uzorci kliničkog materijala bili su: obrisci rektuma, ždrijela, uretre, rodnice, nosa, kože pazuha, prepone i mjesta oko i.v. katetera, stolica, želučani sadržaj, mokraća, iskašljaj, bronhoalveolarni ispirak, krv, likvor i biotipati sluznice želuca te tankog i debelog crijeva, a prikupljeni su tijekom jednogodišnjeg perioda. Izolati vrste *C. albicans* izdvojeni su iz dva ili više različitih uzoraka dva ili više sustava istog bolesnika.

Metode izolacije i identifikacije

Svi uzorci kliničkog materijala zasijani su na Sabouraudov glukozni agar te inkubirani na 37 °C tijekom 3–4 dana. Vrsta *C. albicans* identificirana je testovima klijanja, asimilacije i fermentacije šećera te stvaranjem klamidospora na kukuruznom agaru [9, 10].

Metoda biotipizacije

Izolati su do izvođenja testa biotipizacije bili pohranjeni u glicerinskom bujonu na –26 °C. Oživljeni izolati tipizirani su metodom po Oddsu i Abbottu [13, 14]. Svaki izolat bio je testiran dva puta na devet različitih hranjivih podloga (podloge za ispitivanje tolerancije vrijednosti pH 1,4 i povišene koncentracije soli, podloge za ispitivanje sposobnosti lučenja proteinaze i asimilacije ureje, citrata i sorboze te podloge za ispitivanje rezistencije na 5-fluorocitozin, bornu kiselinu i safranin). Pozitivan ishod testa bio je porast izolata na određenoj hranjivoj podlozi, (u daljnjem tekstu podlozi) a sve podloge očitavala je ista osoba (slika 1–4). Podloge su podijeljene u 3 grupe prema kojima je biotip svakog izolata označen troznamenkastim brojem. Svaka znamenka dobivena je na osnovu zbroja rezultata testiranja unutar svake grupe [13].

Rezultati

Biotipizacijom 910 kliničkih izolata vrste *C. albicans* dobiveno je 79 biotipova. Najučestalijih 14 biotipova činilo 89,3 % svih biotipova ove vrste. Biotip 355 najviše je zastupljen i činio je 20,9 % svih biotipova izolata ove vrste u svim sustavima (tablica 1).

Biotipove vrste *C. albicans* dobivene tipizacijom izolata iz 6 sustava prikazuje tablica 2 i slika 5. U 358 kliničkih izolata iz probavnog sustava tipizirano je 26 biotipova, a 4 najučestalija biotipa (355, 357, 305, 345) činila su 61,7 % svih biotipova vrste *C. albicans* iz probavnog

sustava. U 210 kliničkih izolata iz dišnog sustava tipizirano je 28 biotipova, a 4 najučestalija biotipa (355, 345, 305, 155) činila su 58,0 % svih biotipova vrste *C. albicans* iz dišnog sustava. U 135 kliničkih izolata iz spolnomokračnog sustava tipizirano je 26 biotipova, a 4 najučestalija (355, 345, 305, 105) činila su 50,3 % svih biotipova ovog kvasca iz spolnomokračnog sustava. U 58 kliničkih izolata iz kardiovaskularnog sustava tipizirano je 15 biotipova, a 4 najučestalija (355, 155, 105, 305) činila su 67,3 % svih biotipova vrste *C. albicans* iz ovog sustava. U 36 kliničkih izolata iz središnjeg živčanog sustava tipizirano je 15 biotipova a 4 najučestalija (355, 345, 155, 357) činila su 58,3 % svih biotipova ove vrste iz središnjeg živčanog sustava. U 113 kliničkih izolata iz obrisaka kože tipizirano



Slika 1. Rast 49 izolata vrste *Candida albicans* na kontrolnoj podlozi

Figure 1. Growth of 49 isolates of *Candida albicans* on control plate



Slika 2. Rast 27 izolata vrste *Candida albicans* na podlozi za dokaz tolerancije pH vrijednosti od 1,4

Figure 2. Growth of 27 isolates of *Candida albicans* on plate for testing tolerance of pH 1.4



Slika 3. Rast 18 izolata vrste *Candida albicans* na podlozi za dokaz lučenja proteinaze

Figure 3. Growth of 18 isolates of *Candida albicans* on plate for testing proteinase production



Slika 4. Rast 2 izolata vrste *Candida albicans* na podlozi za ispitivanje osjetljivosti na 5-fluorocitozin

Figure 4. Growth of 2 isolates of *Candida albicans* on plate for testing 5-fluorocytosine resistance

je 18 biotipova, a 4 najučestalija (355, 155, 357, 157) činila su 58,5 % svih biotipova ovog kvasca iz obrisaka kože.

Rasprava

Podaci iz literature o rezultatima istraživanja tipizacije vrste *C. albicans* metodom po Oddsu i Abbottu vrlo su oskudni. Većina autora tipizirala je izolate ove vrste iz dva sustava (spolnomokračnog i probavnog) [13, 15]. O'Connor i sur. tipizirali su ovom metodom 91 izolat vrste *C. albicans* iz obrisaka rodnice, usne šupljine i analnog otvora nehospitaliziranih bolesnica s rekurentnom vulvo-

vaginalnom kandidozom [15]. Tipizacijom su dobivena 54 biotipa, a 4 najučestalija (575, 775, 777 i 351) činila su 28,6 % svih biotipova ove vrste. Odds i Abbott biotipizirali su 85 izolata vrste *C. albicans* iz obrisaka usne šupljine i rodnice hospitaliziranih bolesnica i zdravih žena [13]. Tipizacijom su dobivena 43 biotipa. Četiri najučestalija biotipa iz usne šupljine bila su 153, 157, 357 i 057 a činila su 36,1 % svih biotipova ove vrste iz usne šupljine. Najučestaliji biotipovi iz rodnice bili su 157 i 357, a činili su 46,2 % svih biotipova vrste *C. albicans* iz rodnice. U našem prethodnom istraživanju tipizirano je ovom metodom 124 izolata vrste *C. albicans* iz različitih sustava hospitaliziranih i nehospitaliziranih bolesnika i dobiveno

Tablica 1. Učestalost biotipova vrste *Candida albicans*
Table 1. Frequency of *Candida albicans* biotypes

| Biotip / strain type | Broj pojavljivanja (%)/ No. of times(%) |
|---|--|
| 355 | 190 (20,9) |
| 305 | 108 (11,9) |
| 345 | 102 (11,3) |
| 155 | 95 (10,4) |
| 357 | 88 (9,7) |
| 105 | 52 (5,7) |
| 315 | 47 (5,2) |
| 144 | 42 (4,6) |
| 157 | 29 (3,2) |
| 115, 057 | 26 (2,9) |
| 257, 300 | 24 (2,7) |
| 244 | 7 (0,8) |
| 000, 001, 002, 005, 015, 017, 041, 045, 047, 100, 111, 135, 140, 147, 150, 175, 200, 205, 214, 217, 234, 241, 250, 255, 317, 325, 340, 347, 351, 360, 364, 367, 544, 555, 755 | 70 (7,7) |
| 003, 012, 025, 035, 040, 051, 053, 054, 055, 065, 101, 110, 113, 117, 120, 124, 125, 127, 160, 166, 301, 307, 311, 330, 335, 341, 504, 547, 615, 744 | 30 (3,3) |
| Ukupno / Total | 79 910 (100,0) |

Tablica 2. Pregled biotipova 910 izolata vrste *Candida albicans* iz 6 organskih sustava**Table 2.** Biotypes of 910 isolates of *Candida albicans* from 6 organ systems

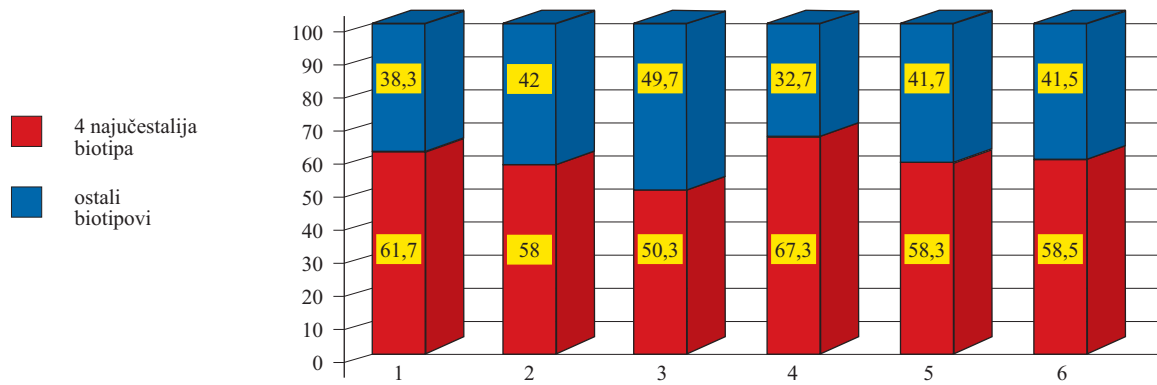
| 1 | | 2 | | 3 | | 4 | | 5 | | 6 | |
|--|---------|--|---------|--|---------|------------------------------------|---------|--|--------|-------------------------------|---------|
| Biotip | Br./% | Biotip | Br./% | Biotip | Br./% | Biotip | Br./% | Biotip | Br./% | Biotip | Br./% |
| 355 | 72/20,1 | 355 | 45/21,4 | 355 | 23/17,1 | 355 | 21/36,2 | 355 | 7/19,5 | 355 | 22/19,5 |
| 357 | 57/15,9 | 345 | 32/15,3 | 345 | 20/14,8 | 155 | 8/13,8 | 345 | 6/16,7 | 155 | 16/14,2 |
| 305 | 56/15,6 | 305 | 24/11,4 | 305 | 13/9,6 | 105, 305 | 10/17,2 | 155 | 5/13,9 | 357 | 15/13,3 |
| 345 | 36/10,1 | 155 | 21/10,0 | 105 | 12/8,9 | 315 | 3/5,2 | 357 | 3/8,3 | 157 | 13/11,5 |
| 155 | 35/9,8 | 315 | 12/5,7 | 315 | 11/8,2 | 015, 100, 157, 214, 347, 360 | 12/20,7 | 041, 234, 305, 315 | 8/22,3 | 105 | 9/8,0 |
| 144 | 25/7,0 | 105 | 11/5,3 | 155 | 10/7,4 | 051, 113, 117, 301 | 4/6,9 | 035, 065, 105, 311, 335, 504, 744 | 7/19,5 | 305, 345 | 16/14,2 |
| 315 | 15/4,2 | 144 | 10/4,8 | 357 | 6/4,5 | | | | | 315, 144 | 8/7,9 |
| 105 | 14/3,9 | 357 | 7/3,3 | 057, 115 | 8/5,9 | | | | | 147, 205, 255, 364, 367 | 10/8,9 |
| 157 | 12/3,4 | 115 | 6/2,9 | 144, 244, 257, 300 | 12/8,9 | | | | | 053, 054, 124, 160 | 4/3,5 |
| 300 | 5/1,4 | 057, 257 | 10/4,8 | 001, 017, 111, 157, 340, 351, 555 | 14/10,4 | | | | | | |
| 057, 257 | 8/2,3 | 300 | 4/1,9 | 012, 040, 055, 127, 166, 341 | 6/4,5 | | | | | | |
| 115 | 3/0,9 | 244 | 3/1,4 | | | | | | | | |
| 000, 005, 047, 135, 150, 217, 755 | 14/3,9 | 002, 045, 140, 175, 200, 241, 250, 317, 325, 544 | 20/9,5 | | | | | | | | |
| 003, 120, 125, 244, 307, 547 | 6/1,7 | 025, 101, 110, 330, 615 | 5/2,4 | | | | | | | | |
| 26 | 358/100 | 28 | 210/100 | 26 | 135/100 | 15 | 58/100 | 15 | 36/100 | 18 | 113 |

Legenda: 1 – probavni sustav, 2 – dišni sustav, 3 – spolnomokračni sustav, 4 – kardiovaskularni sustav, 5 – središnji živčani sustav, 6 – koža

Legend: 1 – gastrointestinal system, 2 – respiratory system, 3 – urogenital system, 4 – cardiovascular system, 5 – central nervous system, 6 – skin

je 25 biotipova [16]. U 58 izolata iz uzoraka hospitaliziranih bolesnika tipizirano je 11 biotipova, a 4 najučestalija biotipa (357, 375, 155 i 371) činila su 77,6 % svih biotipova ove vrste. U 66 izolata iz uzoraka nehospitaliziranih bolesnika dobiven je 21 biotip a 4 najučestalija biotipa (371, 155, 375 i 351) činila su 45,5 % svih biotipova ove vrste. Iz navedenih istraživanja vidljivo je da je raznolikost biotipova vrste *C. albicans* iz uzoraka nehospitaliziranih bolesnika veća (svaki drugi ili treći izolat je različitog biotipa) od raznolikosti biotipova izolata ove vrste iz uzoraka hospitaliziranih bolesnika (svaki peti izolat je različitog biotipa). U ovom istraživanju biotipova

vrste *C. albicans* iz uzoraka hospitaliziranih bolesnika tek je svaki jedanaesti izolat bio različitog biotipa. Premda metoda biotipizacije po Oddsu i Abbottu pruža mogućnost tipizacije 512 različitih biotipova vrste *C. albicans* rezultati navedenih istraživanja pokazuju znatno manji broj biotipova (od 25 do 79). U ovim istraživanjima četiri najučestalija biotipa činila su 28,6 % [15], 36,1 % [13] te 77,6 % i 45,5 % [16] svih biotipova vrste *C. albicans*, a u našem su istraživanju činila od 50,3 % do 67,3 %. Metoda biotipizacije po Oddsu i Abbottu, uz druge metode fenotipizacije [17] i genotipizacije [18, 19], pruža pomoć u razlikovanju tipova unutar vrste *C. albicans* što



Slika 5. Zastupljenost 4 najučestalija biotipa vrste *Candida albicans* izdvojene iz uzoraka 6 organskih sustava

Figure 5. Prevalence of the most common 4 biotypes of *Candida albicans* isolated from 6 organic systems

omogućuje otkrivanje epidemiološkog izvora infekcije kao i putova širenja ovog kvasca [12].

Zaključak

Biotipizacijom 910 izolata vrste *C. albicans* iz uzoraka 6 različitih sustava 360 hospitaliziranih bolesnika dobiveno je 79 biotipova. Najučestalijih 14 biotipova činilo je 90 % svih biotipova ove vrste. Biotip 355 najviše je zastupljen među izolatima iz svih sustava i njegov se udio kretao od 17,1 % do 36,2 %. Tipizacija temeljena na fenotipskim osobinama vrste *C. albicans* može pomoći u epidemiološkim istraživanjima gljivičnih infekcija. Predstavlja osnovu za daljnja istraživanja koja će se oslanjati na fenotipskim ili genotipskim osobinama gljiva.

Literatura

- [1] Richet HM, Andremond A, Tancrede C, Pico JL, Jarvis WR. Risk factors for candidemia in patients with acute lymphatic leucemia. *Rev Infect Dis* 1991; 13: 487–92.
- [2] Anaisse EJ, Bodey GP, Kantarijan H, Ro J, Vartivarian SE, Hopfer R, Hoy J, Rolston K. New spectrum of fungal infections in patients with cancer. *Rev Infect Dis* 1998; 11: 369–78.
- [3] Karabinis A, Hill C, Leclerc B, Tancrede C, Baume D, Andremond A. Risk factors for candidemia in cancer patients; a case-control study. *J Clin Microbiol* 1998; 26: 429–32.
- [4] Odds FC. *Candida and Candidosis*. 2nd ed. London: Bailliere Tindall, 1988.
- [5] Pannuti CS, Ginrich RD, Pfaller MA, Wenzel RP. Nosocomial pneumonia in adult patients undergoing bone marrow transplantation: A 9-years study. *J Clin Oncol* 1991; 9: 1–5.
- [6] Vaundry WL, Tierney AJ, Wenman WM. Investigation of a cluster of systemic *Candida albicans* infections in a neonatal intensive care unit. *J Infect Dis* 1998; 158: 1375–9.
- [7] Pfaller MA, Wenzel RP. Impact of changing epidemiology of fungal infections in the 1990s. *Eur J Microbiol Infect Dis* 1992; 4: 287–91.
- [8] Reef SE, Lasker BA, Butcher DS, McNeil MM, Pruitt R, Keyserling H, Jarwis WR. Non-perinatal nosocomial transmission of *Candida albicans* in neonatal intensive care unit; prospective study. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 1255–9.
- [9] Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC. *Manuel of clinical microbiology*. Washington DC: ASM Press, 1999.
- [10] Ajello L, Hay RJ. *Medical mycology*. U: Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections. 9 izd. London: Arnold, 1998.
- [11] Merz WG. *Candida albicans* strain delineation. *Clin Microbiol Rev* 1990; 4: 321–34.
- [12] Otero L, Vazquez F, Palacio V, Vazquez S, Carreno F, Mendez FJ. Comparison of seven phenotyping methods for *Candida albicans*. *Eur J Epidemiol* 1995; 2: 221–4.
- [13] Odds FC, Abbott AB. A simple system for the presumptive identification of *Candida albicans* and differentiation of strains within the species. *Sabouraudia* 1980; 18: 301–17.
- [14] Odds FC, Abbott AB. Modification and extension of tests for differentiation of *Candida* species and strains. *Sabouraudia* 1983; 21: 79–81.
- [15] O'Connor MI, Sobel JD. Epidemiology of recurrent vulvovaginal candidiasis: identification and strain differentiation of *Candida albicans*. *J Infect Dis* 1986; 2: 358–62.
- [16] Važić-Babić V, Temmer K, Bilić A. Preliminary findings on biotypes of *Candida albicans* species. *AAMJ* 1995; 2: 124–5.
- [17] Klempp-Selb B, Rimek D, Kappe R. Karyotyping of *Candida albicans* and *Candida glabrata* from patients with *Candida* sepsis. *Mycoses* 2000; 43: 159–63.
- [18] Martin C, Roberts D, van der Weide M et al. Development of a PCR-based line probe assay for identification of fungal pathogens. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 3735–42.
- [19] Bounoux ME, Tavanti A, Bouchier C et al. Collaborative consensus for optimized multilocus sequence typing of *Candida albicans*. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 5265–6.