

Emilia Tsimbalari¹, *Beata Sulik-Tyszka², Marlena Gołaś^{2,3}, Magdalena Sikora⁴, Katarzyna Piskorska^{2,3}, Ewa Swoboda-Kopeć^{2,3}

Analiza pokrewieństwa genetycznego szczepów *C. glabrata* opornych na leki z grupy azoli wyizolowanych z materiałów klinicznych chorych hospitalizowanych w Samodzielnym Publicznym Centralnym Szpitalu Klinicznym

Genetic relatedness of resistant *C. glabrata* strains to azoles isolated from clinical specimens of patients hospitalized in Central Clinical Hospital

¹Katedra Mikrobiologii, Wirusologii i Immunologii, Państwowy Uniwersytet Medyczny i Farmaceutyczny im. N. Testemicanu, Kiszyniów, Mołdawia

Kierownik Katedry: prof. dr. hab. med. Valeriu Rudic

²Zakład Mikrobiologii, Samodzielny Publiczny Centralny Szpital Kliniczny, Warszawa

P.o. Kierownika Zakładu: dr hab. n. med. Marta Wróblewska

³Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej, Warszawski Uniwersytet Medyczny, Warszawa

Kierownik Zakładu: prof. nadzw. dr hab. med. Grażyna Młynarczyk

⁴Zakład Mikrobiologii Stomatologicznej, Warszawski Uniwersytet Medyczny, Warszawa

P.o. Kierownika Zakładu: dr hab. n. med. Marta Wróblewska

Słowa kluczowe

Candida glabrata, PCR melting profile, pokrewieństwo genetyczne

Key words

Candida glabrata, PCR melting profile, genetic relatedness

Streszczenie

Wstęp. W ostatnich latach odnotowano znaczący postęp w diagnostyce zakażeń grzybiczych spowodowany przede wszystkim opracowaniem nowych metod diagnostycznych oraz wprowadzeniem metod opartych na biologii molekularnej. Metody te są stosowane zarówno do diagnostyki, jak i badań epidemiologicznych. Jedną z ostatnich modyfikacji metody genetycznej RAPD PCR jest *PCR melting profile*. Metoda ta posiada wyższy potencjał różnicujący, w porównaniu z metodą RAPD PCR, dzięki wystandaryzowaniu poszczególnych etapów reakcji.

Cel pracy. Analiza pokrewieństwa genetycznego szczepów *C. glabrata* opornych na leki z grupy azoli wyizolowanych z materiałów klinicznych chorych hospitalizowanych w Samodzielnym Publicznym Centralnym Szpitalu Klinicznym (SPCSK) w Warszawie.

Materiał i metody. Analizie poddano 54 szczepy *C. glabrata* wykazujące oporność na leki z grupy azoli. Szczepy zostały wyizolowane z różnych materiałów klinicznych od chorych z zakażeniem inwazyjnym zgodnie z zasadami klasycznej diagnostyki mikologicznej. Badanie pokrewieństwa genetycznego wykonano używając komercyjnego zestawu PCR MP.

Wyniki. Dla 54 szczepów *C. glabrata* wykonano analizę ich pokrewieństwa genetycznego. Na podstawie porównania wzorów prążkowych wyodrębniono 38 różnych typów genetycznych. Od dwóch chorych wyizolowano szczepy *C. glabrata* o tym samym wzorze prążkowym.

Wnioski. Duże zróżnicowanie wyizolowanych szczepów może świadczyć o endogenym charakterze większości zakażeń i wyklucza możliwość klonalnego rozprzestrzeniania się szczepów *C. glabrata* w środowisku szpitalnym.

Summary

Introduction. In the last years there has been significant progress in the diagnostics of fungal infections which is associated with the development of new diagnostic methods and the development of methods based on molecular biology. These methods are used for both, diagnostic and epidemiological studies. One of the last modification of the RAPD method is PCR melting profile, this method differentiate microorganisms at the same level or even better than the RAPD.

Aim. Genetic relatedness analysis of *C. glabrata* strains resistant to azoles isolated from clinical samples patients hospitalized in the Central Clinical Hospital in Warsaw.

Material and methods. 54 strains of *C. glabrata* resistant to azoles were analyzed. The strains were isolated from various clinical materials patients with invasive infections

Adres/address:

*Beata Sulik-Tyszka
Zakład Mikrobiologii, Samodzielny
Publiczny Centralny Szpital Kliniczny
ul. Banacha 1a, 02-097 Warszawa
tel. +48 (22) 599-17-77
b.sulik@interia.pl

in accordance using routine mycological techniques. The study of genetic relatedness was performed using a commercial PCR MP kits.

Results. Fifty-four strains of *C. glabrata* strains were for genetic relatedness. On the basis of bands patterns 38 different genetic types were identified. In one case, from two patients were isolated *C. glabrata* strains with the same band patterns.

Conclusions. High diversity of *C. glabrata* strains may be indicative of an endogenous nature of most infections and rule out the possibility of clonal spread of strains in a hospital environment.

WSTĘP

W ostatnich latach częstość zakażeń oportunistycznych o etiologii grzybiczej wykazuje tendencję wzrostową. Związane jest to ze zwiększającą się liczbą osób z obniżoną odpornością. Najczęstszym czynnikiem etiologicznym pozostają nadal grzyby z rodzaju *Candida*. Odnotowuje się wzrost częstości zakażeń wywołanych przez szczepy lekooporne oraz nowe gatunki grzybów. Rozpoznanie grzybicy powinno opierać się na obrazie klinicznym chorego oraz badaniach mikologicznych, serologicznych, molekularnych i histopatologicznych. W dużej liczbie przypadków inwazyjnych zakażeń grzybiczych leczenie empiryczne powinno być włączone na podstawie obrazu klinicznego chorego i badań obrazowych, ponieważ diagnostyka uogólnionych zakażeń grzybiczych jest niezwykle trudna. Zakażenia grzybicze rozpoznawane są tylko w 20-30% przypadków za życia chorego. Obraz kliniczny układowych zakażeń grzybiczych jest mało charakterystyczny, może być podobny do zakażeń o etiologii wirusowej, jak również bakteryjnej. Do najczęstszych objawów klinicznych zakażenia grzybiczego należy gorączka. Utrzymywanie się stanów gorączkowych u chorego leczonego antybiotykami szerokospektralnymi, szczególnie z upośledzeniem odporności, powinno nasuwać podejrzenie zakażenia grzybiczego (1-3).

Inwazyjne zakażenia grzybicze to głównie zakażenia szpitalne wywołane przez grzyby z rodzaju *Candida* i *Aspergillus*. Szacuje się, że liczba zakażeń szpitalnych waha się od 5-10%, śmiertelność w przypadku bakteriemii wynosi 16%, natomiast w przypadku fungemii od 30-81%. Drożdżaki z rodzaju *Candida* są czwartym co do częstości czynnikiem etiologicznym zakażeń łożyska naczyniowego. W latach 1979-2000 liczba rejestrowanych fungemii wzrosła o ponad 200% (4, 5). Najczęstszym czynnikiem etiologicznym fungemii były: *C. albicans* (47,9-58,4% przypadków), *C. glabrata*, *C. parapsilosis* i *C. tropicalis*. Inne gatunki: *C. krusei*, *C. lusitaniae*, *C. guillemontii*, *C. dubliniensis*, *Saccharomyces* były wykrywane dużo rzadziej.

Leczenie zakażeń grzybiczych, mimo znaczącego postępu, pozostaje nadal poważnym problemem i bywa znacznie trudniejsze niż leczenie zakażeń bakteryjnych. Wpływa na to niewielka liczba antymikotyków w porównaniu z liczbą leków antybakteryjnych, ale przede wszystkim specyfika procesu infekcyjnego i rozpoznawanie zakażeń grzybiczych zwłaszcza u osób z zaburzeniami układu odpornościowego. Obraz kliniczny układowych zakażeń grzybiczych nie

jest charakterystyczny. W każdym przypadku prawdopodobnej infekcji grzybiczej konieczne jest ustalenie czynnika etiologicznego, oznaczenie jego lekowrażliwości i monitorowanie skuteczności leczenia odpowiednim antymikotykiem (6).

Strategia terapii w tej grupie chorych obejmuje leczenie profilaktyczne, empiryczne i celowane. Wybór opcji terapeutycznej powinien być oparty na ocenie wystąpienia czynnika ryzyka zakażenia grzybiczego, właściwym rozpoznaniu, ocenie stanu klinicznego pacjenta oraz badaniach diagnostycznych. Zbyt późne rozpoznanie, a także zbyt późne wdrożenie leczenia zmniejsza jego skuteczność (7). Trudności terapeutyczne wynikają z szybko narastającej lekooporności na leki przeciwgrzybicze. W związku z szeroko stosowaną profilaktyką rośnie częstość występowania szczepów opornych na standardowe leczenie antymikotykami.

Rozwój biologii molekularnej umożliwił wykorzystanie markerów molekularnych w diagnostyce mikologicznej. Metody te charakteryzują się wysoką czułością i specyficznością.

W ciągu ostatnich lat metody molekularne znalazły zastosowanie w badaniach pokrewieństwa genetycznego. Szeroko stosowaną metodą typowania genetycznego jest RAPD (ang. *random amplification of polymorphic DNA*). Jedną z ostatnich modyfikacji metody RAPD jest metoda *PCR melting profile*, opracowana przez Masny i Płucienniczaka. Różnicuje ona drobnoustroje lepiej niż technika molekularna RAPD. Dodatkowo jest prosta w wykonaniu, tania i możliwa do przeprowadzenia w krótkim czasie (8, 9).

Metoda typowania MP PCR (ang. *melting profile PCR*) została zmodyfikowana i zoptymalizowana przez Krawczyk i wsp. (9). Technika ta opiera się na analizie DNA genomowego poddawanego reakcji trawienia przy zastosowaniu jednego enzymu restrykcyjnego. W kolejnym etapie powstałe fragmenty restrykcyjne ligowane są z adaptorem. Powstała mieszanina ligacyjna stanowi matrycę w reakcji PCR. Różnicowanie badanych izolatów oparte jest na amplifikacji ograniczonej liczby fragmentów przy zastosowaniu obniżonej temperatury denaturacji w reakcji PCR, zależnej od analizowanego drobnoustroju. Technika MP PCR (*melting profile PCR*) wykorzystywana jest w badaniach epidemiologicznych stosowanych w przypadku szpitalnych zakażeń grzybiczych, w celu określenia ich transmisji. Badania te również pozwalają na monitorowanie leczenia przeciwgrzybiczego pod kontem zmienności drobnoustrojów i ich oporności na antymikotyki (10-16).

CEL PRACY

Analiza pokrewieństwa genetycznego szczepów *C. glabrata* opornych na leki z grupy azoli wyizolowanych z materiałów klinicznych chorych hospitalizowanych w Samodzielnym Publicznym Centralnym Szpitalu Klinicznym (SPCSK) w Warszawie.

MATERIAŁ I METODY

Materiał do badania stanowiło 189 szczepów grzybów drożdżopodobnych z gatunku *Candida glabrata* wyizolowane od 110 chorych z zakażeniem inwazyjnym hospitalizowanych w Oddziałach Zabiegowych, Zachowawczych i w Oddziale Intensywnej Terapii w ramach rutynowej diagnostyki mikologicznej, w Centralnym Szpitalu Klinicznym w Warszawie w latach 2008-2010. Spośród szczepów do badania wybrano 54 szczepy *C. glabrata* wykazujące oporność na leki z grupy azoli.

Oznaczanie wartości MIC antymikotyków wykonano metodą E-test (bioMérieux) z zastosowaniem podłoża RPMI-agar (Biomed). Inkubację prowadzono w wilgotnym inkubatorze w temp. 35°C w ciągu 24-48 godzin (aż do uzyskania wzrostu).

Odczytów dokonywano według zaleceń zawartych w instrukcji „E-test AB BIODISK”.

Szczepy grzybów drożdżopodobnych były izolowane z różnych materiałów klinicznych, w tym z wymazów z ran pooperacyjnych i jamy otrzewnowej. Badano również płyny ustrojowe (otrzewnowy, opłucnowy, płyn mózgowo-rdzeniowy), materiały z dróg oddechowych (popłuczyny pęcherzykowo-oskrzelowe, aspiraty śródchawicze, aspiraty z dolnych dróg oddechowych), punktaty z ropni wewnętrznych i zewnętrznych, z zatok. Przy podejrzeniu fungemii pobierano krew obwodową, a przy podejrzeniu fungemii odcewnikowej badano: krew obwodową, krew z cewnika oraz cewnik naczyniowy.

Analizę podobieństwa genetycznego szczepów *C. glabrata* wykonano metodą PCR MP KIT (DNA-Gdańsk). Analizę przeprowadzono zgodnie z protokołem dołączonym do zestawu przez producenta. Całkowite DNA genomowe szczepów zostało wyizolowane z komórek grzybów drożdżopodobnych za pomocą zestawu od-

czynników do izolacji DNA, według zaleceń producenta (EURx). Otrzymane DNA trawiono enzymem restrykcyjnym *Hind* III przez 60 minut w 37°C. Po trawieniu próbki DNA ligowano z adaptorami przez 60 minut w 16°C. Przeprowadzono reakcję PCR ze starterem homologicznym do sekwencji adaptorów. Produkty reakcji rozdzielono w 2% żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyny. Zdjęcia oraz analizę żeli wykonano za pomocą aparatury i oprogramowania firmy SYNGENE.

WYNIKI

Spośród 189 szczepów grzybów drożdżopodobnych wyizolowanych z materiałów klinicznych chorych z rozpoznaniem inwazyjnym zakażeniem grzybiczym, dalszym badaniom genetycznym poddano 54 szczepy *C. glabrata*. Wszystkie szczepy wykazywały oporność wobec azoli. Wśród 54 szczepów *C. glabrata* poddanych analizie molekularnej wyodrębniono 38 różnych typów genetycznych.

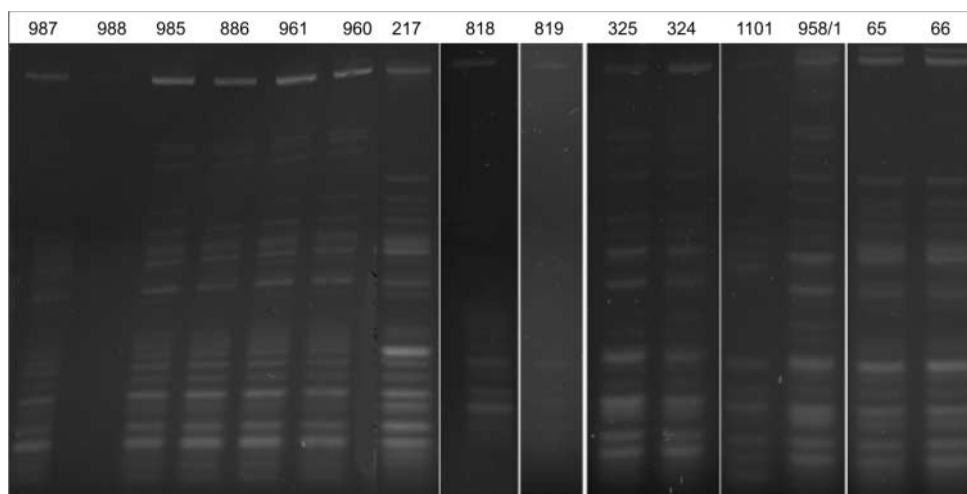
W Klinice Chirurgii Ogólnej Transplantacyjnej i Wątroby, z materiałów klinicznych od 9 chorych uzyskano 15 izolatów posiadających 10 swoistych wzorów prążkowych, nie stwierdzono przenoszenia klonalnego szczepów pomiędzy chorymi w obrębie oddziału (ryc. 1).

W Klinice Chirurgii Ogólnej Naczyniowej i Transplantacyjnej z materiałów klinicznych od 11 chorych uzyskano 17 izolatów zakwalifikowanych do 11 odrębnych typów genetycznych (ryc. 2).

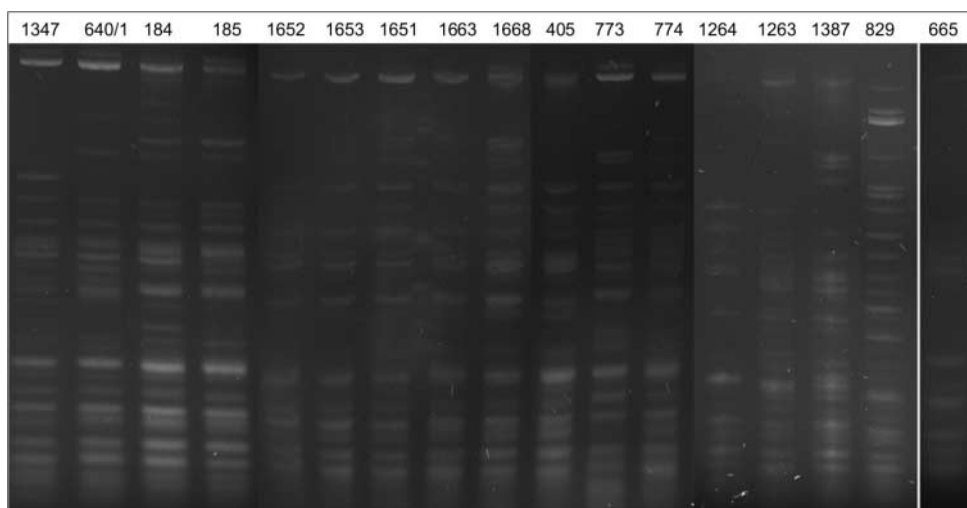
W Klinice Hematologii z materiałów klinicznych od 2 chorych wyhodowano 5 izolatów zakwalifikowanych do dwóch typów genetycznych. Każdy typ genetyczny był charakterystyczny dla danego pacjenta (ryc. 3).

W Klinice Chirurgii Gastroenterologicznej z materiałów klinicznych pochodzących od 7 chorych wyizolowano 7 szczepów, posiadających 6 wzorów molekularnych. Szczepy od 2 chory należały do tego samego typu genetycznego (ryc. 4).

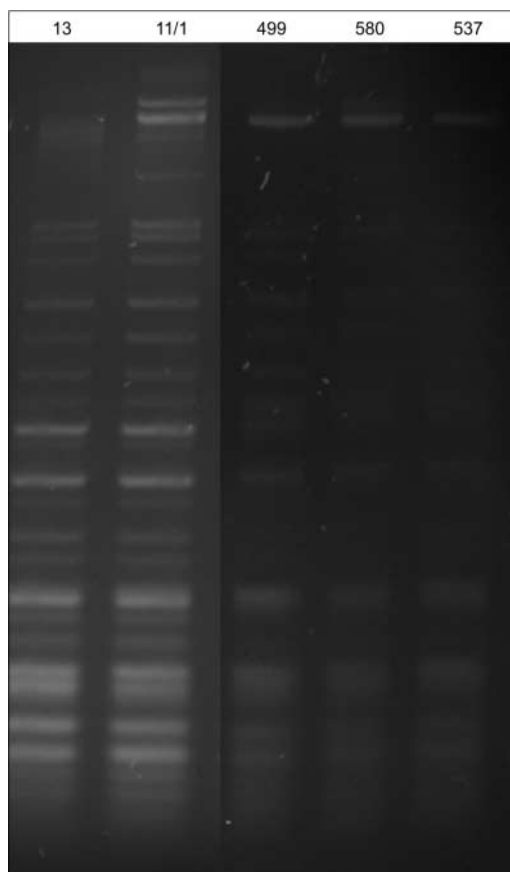
Na oddziale OIT od 2 chorych wyizolowano 3 szczepy, zaliczone do 2 typów genetycznych (na żelu 3 pierwsze ścieżki) (ryc. 5).



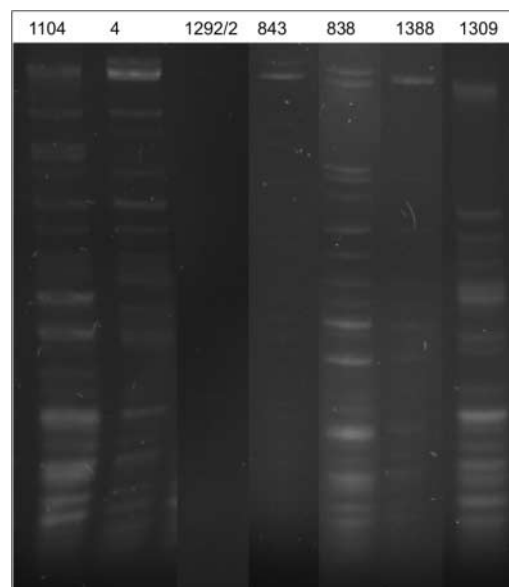
Ryc. 1. Rozdział elektroforetyczny produktów PCR MP dla szczepów *C. glabrata* wyizolowanych od pacjentów z Kliniki Chirurgii Ogólnej Transplantacyjnej i Wątroby.



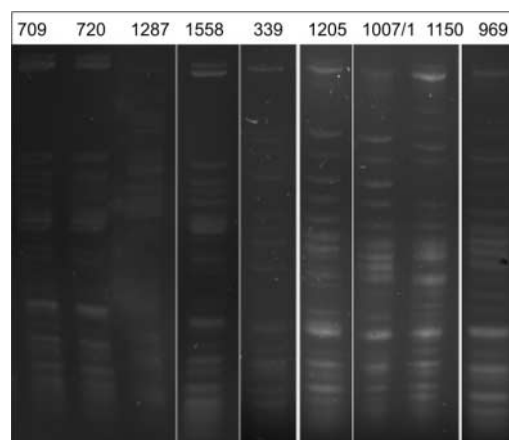
Ryc. 2. Rozdział elektroforetyczny produktów PCR MP dla szczepów *C. glabrata* wyizolowanych od pacjentów z Kliniki Chirurgii Ogólnej Naczyniowej i Transplantacyjnej.



Ryc. 3. Rozdział elektroforetyczny produktów PCR MP dla szczepów *C. glabrata* wyizolowanych od pacjentów z Kliniki Hematologii.



Ryc. 4. Rozdział elektroforetyczny produktów PCR MP dla szczepów *C. glabrata* wyizolowanych od pacjentów z Kliniki Chirurgii Gastroenterologicznej.



Ryc. 5. Rozdział elektroforetyczny produktów PCR MP dla szczepów *C. glabrata* wyizolowanych od pacjentów z OIT.

DYSKUSJA

Metody oparte na technikach biologii molekularnej znalazły szerokie zastosowanie w diagnostyce mikrobiologicznej, a czasami są wręcz niezbędne w identyfikacji zakażeń. Kwestią najbliższych kilku lat jest wprowadzenie metod opartych na biologii molekularnej do standardowych, rutynowych protokołów postępowania diagnostycznego. Dają one możliwość szybkiego wykrywania drobnoustrojów oraz umożliwiają przeprowadzenie dochodzeń epidemiologicznych i poszukiwanie

źródła zakażenia. Należy podkreślić, że diagnostyka oparta o metody biologii molekularnej w istotny spo-

sób uzupełnia i poszerza metody klasyczne, jednak nie może w chwili obecnej zastąpić metod klasycznych bakteriologicznych, biochemicznych czy immunologicznych (12).

Zakażenia grzybicze najczęściej są to zakażenia o charakterze endogennym, chociaż również zdarzają się przypadki zakażeń egzogennych. Źródłem zakażenia może być zarówno personel medyczny, jak też środowisko szpitalne. W związku z szerokim stosowaniem terapii immunosupresyjnej, a także profilaktyki przeciwczerwicy, zwiększa się udział gatunków z grupy *non-albicans Candida* spp. w zakażeniach grzybiczych. Gatunek *C. glabrata* jest jednym z najczęściej izolowanych drożdżaków z grupy *non-albicans Candida* spp. Jest to związane z szerokim stosowaniem leków przeciwczerwicy z grupy azoli, w szczególności flukonazolu, powodując narastanie nabytej oporności na tę grupę leków. Częstość zakażeń wywołanych przez oporne na flukonazol szczepy, w tym *C. krusei* i *C. glabrata*, wykazuje tendencję wzrostową.

W wyniku przeprowadzonej analizy *Candida glabrata* stanowiła dominujący gatunek z grupy *non-albicans Candida* spp. wyizolowany z materiałów klinicznych chorych, hospitalizowanych we wszystkich badanych oddziałach szpitalnych. Odsetek wyhodowań tego gatunku w Oddziałach Zachowawczych w latach 2008-2010 wynosił odpowiednio: 33,8, 27,3 i 15,4%, w analizowanym czasie. Podobną częstość izolacji zanotowano w Oddziałach Zabiegowych z udziałem procentowym: 34, 26,4 i 20,6% oraz w OIT: 18,4, 15,4 i 17,9%.

Rozwój biologii molekularnej umożliwił wykorzystanie markerów molekularnych w diagnostyce mikologicznej. Epidemiologia molekularna dostarcza informacji mających bardzo duże znaczenie dla nawracających zakażeń, zwłaszcza chorych z grup ryzyka. Czynniki sprzyjające rozwojowi zakażeń grzybiczych są: neutropenia, limfopenia, chemio- i radioterapia, przewlekłe leczenie glikokortykosteroidami i lekami immunosupresyjnymi oraz nabyty zespół upośledzenia odporności (AIDS), rzadziej wrodzone niedobory układu odpornościowego. Grupę ryzyka stanowią również skrajne grupy wiekowe (> 60 r.ż. i noworodki), a także osoby przewlekłe niedożywione. Grupę chorych najwyższego ryzyka rozwoju inwazyjnego zakażenia grzybiczego stanowią pacjenci poddani przeszczepianiu narządów, zwłaszcza allogenicznym komórek krwiotwórczych.

Metoda typowania MP PCR (*melting profile PCR*) opracowana przez Krawczyk i wsp. bazuje na użyciu niskiej temperatury denaturacji i przyłączaniu liganu (adaptoru) w celu różnicowania izolatów drożdżaków z rodzaju *Candida* (9). Jednak szeroki dostęp do

metod molekularnych typowania drobnoustrojów często jest limitowany przez niewystarczające wyposażenie laboratorium (17).

Wyniki przeprowadzonych badań genetycznych wskazują na duże zróżnicowanie wewnątrzgatunkowe *C. glabrata*. Świadczyć to może o braku endemicznego występowania szczepów oraz o tym, że zdecydowana większość inwazyjnych zakażeń grzybiczych ma charakter endogenny, co zgodne jest z doniesieniami literaturowymi (6, 7). Tylko dwa szczepy *C. glabrata* pochodzące od chorych z Kliniki Chirurgii Gastroenterologicznej były ze sobą spokrewnione i należały do tego samego typu genetycznego.

Oporność szczepów *Candida* na leki przeciwczerwicy jest konsekwencją stosowania antymikotyków w leczeniu zakażeń grzybiczych, zwłaszcza w terapii profilaktycznej i empirycznej, powodując selekcję szczepów opornych (1, 7, 18, 19). Prawdopodobnie w trakcie terapii grzyby drożdżopodobne będące czynnikami etiologicznymi zakażeń mogą być zastępowane innymi gatunkami pochodzącymi z flory szpitalnej, opornymi na stosowane leki (7, 20). Narastanie lekooporności wśród wielu gatunków grzybów spowodowało zainteresowanie badaniami, które mogłyby pomóc w wyjaśnieniu nieznanych dotychczas mechanizmów wirulencji i oporności grzybów na powszechnie stosowane leki przeciwczerwicy (4, 21-24). Problem nabywania genów determinujących oporność skłania do dalszych obserwacji i monitorowania zmian aktywności przeciwczerwicy (23-26). Wydaje się, że problem zakażeń grzybiczych będzie inspirował do poszukiwania dokładniejszych metod diagnostycznych. Metody oparte na biologii molekularnej pozwolą na przyspieszenie identyfikacji drobnoustrojów oraz wykorzystane zostaną w badaniach epidemiologicznych zakażeń szpitalnych. Metody oparte na biologii molekularnej używane w analizie epidemiologicznej zakażeń powodowanych przez drożdżaki z rodzaju *Candida*, dzięki szybkiej identyfikacji zakażeń szpitalnych mogą mieć pozytywny wpływ na zmniejszenie ilości tych zakażeń (27).

WNIOSKI

1. *Candida glabrata* była gatunkiem dominującym, izolowanym od chorych z inwazyjnym zakażeniem grzybiczym, hospitalizowanych w oddziałach szpitalnych CSK w analizowanym czasie.
2. Duża różnorodność genetyczna w obrębie badanych szczepów wyklucza możliwość ich klonalnego rozprzestrzeniania się i wskazuje na endogenny charakter zakażeń.
3. Stwierdzono transmisję szczepu *Candida glabrata* pomiędzy dwoma chorymi.

PIŚMIENNICTWO

1. Zielińska E: Kontrowersje dotyczące optymalnej profilaktyki i leczenia zakażeń grzybami w stanach obniżonej odporności. Przegl Epidemiol 2003; 57: 299-307.

2. Seferińska I, Pałynyczko G, Warzocha K: Układowe zakażenia grzybicze: etiologia, rozpoznanie i nowe możliwości lecznicze. Acta Haematol Pol 2005; 36(1): 45-54.

3. Swoboda-Kopeć E: Grzyby jako zagrażające patogeny oddziałów szpitalnych. Rozprawa habilitacyjna, 2007.
4. Marchlik WD, Kurnatowski P: Grzyby jako czynniki etiologiczne zakażeń szpitalnych. Otolaryngologia 2010; 9(2): 50-54.
5. Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM et al.: Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24, 179 cases from a prospective nationwide surveillance study. Clin Infect Dis 2004; 39: 309-317.
6. Biliński P, Seferińska I, Warzocha K: Diagnostyka i leczenie układowych zakażeń grzybiczych w onkologichematologii. Onkologia w Praktyce Klinicznej 2008; 4(1): 15-24.
7. Butrym A, Zywar K, Dietzczenia J, Mazur G: Inwazyjne zakażenia grzybicze u pacjentów z nowotworami hematologicznymi. Mikol Lek 2011; 18(1): 47-53.
8. Masny A, Plucienniczak A: Ligation mediated PCR performed at low denaturation temperatures – PCR melting profiles. Nucleic Acids Res 2003; 31(18): 114-119.
9. Krawczyk B, Leibner-Cisak J, Mielech A et al.: PCR melting profile (PCR MP) – a new tool for differentiation of *Candida albicans* strains. BMC Infect Dis 2009; 9: 177-189.
10. Bartkowiak J: Zastosowanie metod biologii molekularnej w medycynie. [W:] Wierzbicki R (red.): Wybrane zagadnienia biologii molekularnej. Akademia Medyczna w Łodzi, 2000: 112-136.
11. Blumm HE, Wu CH, Wu GY (eds.): Molecular diagnosis and therapy. Kluwer Acad. Publishers, Dordrecht, Boston, London 1996.
12. Bartkowiak J: Badania molekularne w rozpoznawaniu i różnicowaniu chorób zakaźnych. Przegl Epidemiol 2003; 57: 381-389.
13. Birmingham N, Luetlich K: Polymerase chain reaction and its applications. Current Diagnostic Pathology 2003; 9: 159-164.
14. Bał J: Biologia molekularna w medycynie. Elementy genetyki klinicznej. Wyd. 2, PWN, Warszawa 2006.
15. Netsvetyayeva I, Sikora M, Gołoś M et al.: Diagnostyczne aspekty zakażeń grzybiczych u chorych po przeszczepieniu narządów unaczynionych (ze szczególnym uwzględnieniem przeszczepiania nerki). Nowa Klinika 2011; 18(4): 4079-4088.
16. White PL, Perry MD, Barnes RA: An update on the molecular diagnosis of invasive fungal disease. FEMS Microbiol Lett 2009; 296: 1-10.
17. Bean P, Olive DM: Principles and application of methods for DNA-based typing of microbial organisms. J Clin Microbiol 1999; 37: 1661-1669.
18. Pappas PG, Kauffman CA, Andes D et al.: Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis 2009; 48: 503-535.
19. Nawrot U: Mikafungina – aktywność przeciwgrzybicza, zastosowanie w leczeniu i profilaktyce inwazyjnej kandydozy. Mikol Lek 2010; 17(1): 41-44.
20. Magill SS, Shields C, Sears CL et al.: Triazole Cross – Resistance among *Candida* spp.: Case Report, Occurrence among Bloodstream Isolates, and Implications for Antifungal Therapy. J Clin Microbiol 2006; 44: 529-553.
21. Dorocka-Bobkowska B, Konopka K: Powstawanie biofilmu *Candida* i jego znaczenie w patogenezie zakażeń przewlekłych – przegląd piśmiennictwa. Dent Med Probl 2003; 40(2): 405-410.
22. Krajewska-Kulak E, Lewko J, Rolka H et al.: Grzybicze zakażenia szpitalne – narastający problem. Mikol Lek 2000; 7(3): 159-163.
23. Pfaller MA, Boyken L, Hollis RJ et al.: *In vitro* susceptibility of invasive isolates of *Candida* spp. to anidulafungin, caspofungin, and micafungin: six years of Global Surveillance. J Clin Microb 2008; 46: 150-156.
24. Pfaller MA, Messer SA, Moet GJ et al.: *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). International Journal of Antimicrobial Agents 2011; 38: 65-69.
25. Costa-de-Oliveira S, Marcos MI, Silva RM et al.: FKS2 mutations associated with decreased echinocandin susceptibility of *Candida glabrata* following anidulafungin therapy. Antimicrobial agents and chemotherapy 2011; 55(3): 1312-1314.
26. Silva A, Costa-de-Oliveira S, Azevedo MM et al.: The increase of chitin content in the cell wall accounts for the reduced echinocandin susceptibility displayed by clinical isolates of *C. parapsilosis*. Clin Microbiol Infect 2010; 16(2): 215.
27. Marais E, Steward R, Duse AG et al.: *Candida parapsilosis* detected in TPN using the BactT: Alert system and characterized by randomly amplified polymorphic DNA. J Hosp Infect 2004; 56: 291-296.

otrzymano/received: 17.02.2015
zaakceptowano/accepted: 11.03.2015