

# Rezistencija vrsta roda *Aspergillus* serije *Versicolores* na antimikotike

---

**Rukavina, Agneza**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2023**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:776821>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-01-05**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



**Agneza Rukavina**

**Rezistencija vrsta roda *Aspergillus* serije  
*Versicolores* na antimikotike**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, godina. 2023.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Mikrobiologija s parazitologijom Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za mikrobiologiju pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Maje Šegvić Klarić.

Zahvaljujem se svojoj mentorici, prof. dr. sc. Maji Šegvić Klarić na stručnom vodstvu i pomoći tijekom izrade i pisanja ovog rada. Također veliko hvala i svim ostalim djelatnicima Zavoda koji su me srdačno prihvatili, savjetovali i pružili mi brojne prilike za razvoj. Vrijeme provedeno na Zavodu će mi zauvijek ostati u lijepom sjećanju!

Hvala mojoj obitelji na podršci, ohrabrenju i razumijevanju!  
I na kraju, hvala mojim prijateljima što su bili uz mene i obogatili mi studentske dane!

## SADRŽAJ

1. UVOD:.....	1
1.1. Rod <i>Aspergillus</i> .....	1
1.1.1. Serija <i>Versicolores</i> .....	2
1.2. Patogenost roda <i>Aspergillus</i> .....	5
1.3. Sistemske antimikotici .....	8
2. OBRAZLOŽENJE TEME .....	12
3. MATERIJALI I METODE .....	13
3.1. Materijali .....	13
3.1.1. Hranjive podloge .....	13
3.2. Metoda.....	16
3.2.1. Uzorkovanje.....	16
3.2.2. Uzgoj i nasađivanje .....	16
3.2.3. Disk-difuzijska metoda.....	17
4. REZULTATI.....	18
MORFOLOŠKI KLJUČ .....	18
5. RASPRAVA .....	44
6. ZAKLJUČAK .....	48
7. LITERATURA .....	49
8. SAŽETAK .....	55
SUMMARY .....	57
Temeljna dokumentacijska kartica .....	59
Basic documentation card .....	60

# 1. UVOD:

## 1.1. Rod *Aspergillus*

Rod *Aspergillus* predstavlja kozmopolitsku grupu filamentoznih plijesni. One mogu rasti u širokom rasponu temperatura (6-55°C), pri relativno niskoj vlažnosti i na raznim supstratima. Preferiraju složene biljne polimere i poznati su uzročnici kvarenja hrane, stoga ih se može pronaći u blizini organskih ostataka, u tlu i prašini. Poznati su kontaminanti zraka, a neki od njih su oportunistički biljni, životinjski i humani patogeni. Neke vrste su potentni proizvođači mikotoksina, poput aflatoksina, sterigmatocistina i okratoksina (Houbraken i sur., 2020), no svoju štetnost za supstrat duguju i sposobnosti proizvodnje velike količine enzima, poput elastaze koja im omogućava raspad supstrata u molekule koje im služe kao nutrijenti (Krijgsheld i sur., 2013). Također imaju svojstvo proizvodnje drugih metabolita, poput organskih kiselina te mogućnost fermentacije. Navedene karakteristike uz jednostavan uzgoj i tehnike suvremene molekularne biologije omogućile su nastanak industrijskih sojeva vrsta *Aspergillus*, koji su od velike ekonomske i biotehnološke važnosti, jer su ključni za proizvodnju raznih farmaceutika, organskih kiselina te homolognih i heterolognih proteina (Meyer i sur., 2011).

Naziv roda potječe iz 1729. godine, kada ga je Michaeli u *Nova Plantarum Genera* upotrijebio za plijesni čije su ga konidijalne glavice i peteljke podsjećale na *aspergillum*, liturgijski uređaj koji se koristi za škropljenje svetom vodom (Varga i Samson, 2007). *Aspergillus* je jedan od 15 rodova smještenih u porodicu *Aspergillaceae*, podcarstva *Ascomycota* i sadrži preko 440 vrsta smještenih u 6 podrodova, od kojih je jedan *Nidulantes* (Houbraken i sur., 2020).

Razmnožavaju se spolno (teleomorfno) askosporama i nespolno (anamorfno) konidijama, na specijaliziranim hifama koje se nazivaju konidiofori. Tipična struktura konidiofora je spomenuti *aspergilum*, odnosno neseptirana hifa koja završava proširenjem tzv. vezikulom. On nosi jedan ili dva sloja izduženih fialida, koje stvaraju nizove okruglih konidija (Kalenić i sur., 2013). Svaki konidiofor prosječno nosi 10 000 konidija promjera 2,5-3,5µm (Rhame, 1991). Askospore koje su ključne za spolno razmnožavanje, otpornije su na isušivanje i nastaju tijekom saprofitnog rasta u askusima, koji mogu biti različite strukture. Unatoč tomu što je nastanak spora energetski i vremenski zahtjevan proces, reguliran brojnim endogenim i okolišnim čimbenicima, ono je evolucijski bitno za vrstu,

jer u slučaju *A. nidulans* dokazano smanjuje nakupljanje štetnih gena i omogućava nastanak i lakše širenje pozitivnih mutacija (Fischer i Kües, 1994; Verweij i sur., 2009). Izgled rasplodnih struktura temelj je determinacije vrste u plijesni, no u doba dvojne nomenklature različite strukture spolne i nespodne faze bile su prepoznate kao zasebni spolni rodovi. Filogenetskim studijama kasnije je dokazano da su svi oni unutar monofilije *Aspergillus*, a teleomorfno (spolna faza) generičko ime danas se označava kao morfotip (Krijgsheld i sur., 2013). Također, filogenetskim studijama utemeljenim na PCR metodi, dokazano je da konidiofori u obliku aspergiluma nisu jedinstveno obilježje koje označava pripadnost rodu *Aspergillus* te da mu brojne vrste pripadaju, iako nemaju ovo obilježje i obratno. Konidije ovog roda su ekstremno hidrofobne i jednostavno se raspršuju zrakom, a dokaz uspješnosti raspršivanja konidija ovoga roda je da su jedne od najčešće pronađenih plijesni u zraku (Baker i Bennet, 2007). One kliju samo kada su okolišni uvjeti povoljni za rast, a tijekom mirovanja su umjereno otporne na UV zračenje, sušu i visoke temperature, pa tako konidije *A. niger* mogu preživjeti 1h na 50°C (Krijgsheld i sur., 2013).

### 1.1.1. Serija *Versicolores*

Serija *Versicolores* jedna je od 7 klada sekcije *Nidulantes*, podroda *Nidulantes*. Prvotno je 1926. godine od strane Thom i Churcha bila organizirana kao skupina *Aspergillus Versicolor* koja se često revidirala, a 1965. godine sadržavala je 18 vrsta. Tek 1985. godine Gams i suradnici uvode formalne nazive za „skupine“, koje tad postaju podrodovi i odsjeci, a skupina *Versicolores* postaje sekcija u podrodu *Nidulantes* (Chen i sur., 2016). Sekcija je mijenjala broj pripadnika na temelju fenotipskih analiza sve do 2011. godine, kada Peterson i suradnici na temelju PCR analize četiri lokusa, mijenjanju filogenetske odnose i ističu važnost DNK analize za utvrđivanje istih (Peterson, 2008). U međuvremenu je sekcija postala serija koja sadrži 18 vrsta (Géry i sur., 2022), a najveće proširenje nastalo je otkrićem 9 novih vrsta 2012. godine od strane Jurjevića i suradnika. Bitan doprinos je i vrsta *A. pepii* otkrivena na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu u Zagrebu (Jakšić Despot i sur., 2016).

Vrste serije *Versicolores* organizirane su u tri podvrste: podklada *A. sydowii* koja sadrži *A. sydowii*, *A. creber*, *A. venenatus*, *A. tennesseensis*, *A. cvjetkovicii*, *A. jensenii* i *A.*

*puulaauensis*. Podklada *A. versicolor* koja sadrži *A. versicolor*, *A. tabacinus*, *A. fructus*, *A. protuberus*, *A. pepii*, *A. griseoaurantiacus*, *A. hongkongensis*, *A. qilianyuensis*, *A. amoenus* i *A. austroafricanus*; i podklada *A. subversicolor* koja sadrži jednu vrstu *A. subversicolor* (Jurjević i sur., 2012; Wang i Zhuang, 2022).

Vrste *Aspergillus* serije *Versicolores* dobro rastu u vlažnim uvjetima, no dobro toleriraju i suhe uvjete (Jurjević i sur., 2012). Serija je poznata po produkciji mikotoksina sterigmatocistina, kojeg proizvodi 15 od navedenih 18 vrsta, a iznimka su *A. sydowii*, *A. tabacinus* i *A. austroafricanus* (Géry i sur., 2022). Sterigmatocistin je prekursor aflatoksina B1 i od strane Međunarodne agencije za istraživanje karcinoma, klasificiran je kao kancerogen klase 2B tj. mogući karcinogen kod ljudi (Jurjević i sur., 2013). Kod miševa on uzrokuje plućni adenokarcinom, kod štakora hepatocelularni karcinom, a kod majmuna oralno izloženih dozi od 20 mg/kg tjelesne mase, jednom svaka dva tjedna, kroz 4 do 6 mjeseci, uzrokovao je kronični hepatitis (Engelhart i sur., 2002). Produkcija sterigmatocistina u seriji *Versicolores* poznata je već 30 godina, a različite vrste proizvode različite količine toksina. Među kontaminantima zraka najveći proizvođač sterigmatocistina je *A. jensenii*, no vrste *A. fructus* i *A. versicolor* također proizvode 10 do 100 puta veću količinu toksina od ostalih pripadnika serije (Jurjević i sur., 2013). U istraživanju provedenom na uzorcima zraka u kućama dvije godine nakon poplave u Gunji te u Gornjem Stupniku kao kontrolnom selu, dominirale su vrste iz serije *Versicolores* i to *A. jensenii* i *A. creber* (Jakšić i sur., 2021). Ujedno su ove vrste bile i najveći proizvođači sterigmatocistina. U ispitanim ekstraktima bili su prisutni i drugi metaboliti, jedan od prevladavajućih bio je 5-metoksi-sterigmatocistin. On je također citotoksičan i genotoksičan, no u manjoj mjeri, što se pretpostavlja da je rezultat manje biodostupnosti zbog manje polarnosti (Jakšić i sur., 2012; Jakšić Despot i sur., 2016). U istraživanju toksičnosti ekstrakata filamentoznih plijesni, ekstrakti serije *Versicolores* imali su nekoliko puta veću citotoksičnu moć u odnosu na pripadnike sekcije *Flavi* i serije *Nigri* te koncentracija sterigmatocistina nije korelirala s jačinom citotoksičnog učinka. U slučaju *A. protuberus*, citotoksični učinak ekstrakta bio je 25-30% puta veći u odnosu na ekstrakte *A. creber* i *A. jensenii*, unatoč 500 puta manjoj koncentraciji sterigmatocistina. Time je dodatno potvrđeno da sadržaj preostalih metabolita u ekstraktu aspergilija modulira toksičnost sterigmatocistina te kronična izloženost pripadnicima serije *Versicolores* predstavlja visok zdravstveni rizik (Jakšić i sur., 2023).

Najpopularniji i najproučavaniji predstavnik serije, po kojoj je i dobila ime je *Aspergillus Versicolor* Tiraboschi (1908), otkriven 1903. godine od strane Vuillemina pod nazivom *Sterigmatocystis versicolor*. Prvi put je izoliran iz tla 1980. godine, a pronađen je u hiperslanoj vodi Mrtvog mora, uzorku pustinjskog tla, prehrambenim namirnicama te stočnoj hrani (Gery i sur., 2022), u kojoj je produkcija sterigmatocistina uzrokovala toksikozu mliječnih životinja (Jurjević i sur., 2013). Ujedno se zbog velike prisutnosti u zraku zatvorenih prostor koristi kao pokazatelj sindroma bolesne zgrade (engl. SBS – *Sick building syndrome*) (Jurjević i sur., 2012).



## 1.2. Patogenost roda *Aspergillus*

Plijesni roda *Aspergillus* su uobičajeno nepatogene, no mogu postati oportunistički patogeni kada se susretnu s kompromitiranim imunskim sustavom (Baker i Bennet, 2007). Tada mogu zahvatiti bilo koji organski sustav, no u više od 90% bolesnika one uzrokuje respiratornu infekciju (Vandewoude i sur., 2006). Čovjek prosječno udahne 10 m<sup>3</sup> zraka dnevno, a zbog male veličine konidija (2,5-3,5 μm) i njihove velike prisutnosti u zraku, one dolaze u alveolarni prostor, gdje mogu proklijati i formirati hife (NDCC). Otprilike polovica čestica dospije u donji dišni trakt, a oko 20% se ondje taloži. Klijanje spora stoga se može odviti u alveolama, no i u ždrijelu, pri čemu hife micelija mogu dospjeti u alveole, što je na modelu miša dokazano patogenije (Rhame, 1991). U imunokompetentnih osoba izloženih aspergilima zabilježeno je nekoliko kliničkih odgovora, poput preosjetljivog pneumonitisa, koji se javlja kod neatopičnih osoba izloženim velikim koncentracijama konidija aspergila ili neke druge plijesni. Idući poremećaj se očituje kao astma ovisna o IgE i posredovana mehanizmima mastocita, a kod pacijenata oboljelih od astme, javlja se alergijska bronhopulmonalna aspergiloza (Agarwal i Chakrabarti, 2009). Radi se o plućnom poremećaju u kojemu organizam snažno reagira na antigene vrste *Aspergillus*, a prvi put je opisan 1952.godine u Ujedinjenom kraljevstvu, kada ga je Hinston predložio zbog prisutnosti eozinofilije i nakupine u sputumu oboljelih iz koje je uspješno izolirana kultura *A. fumigatus* u sva 3 pacijenta (Novey, 1998). Bolest se manifestira od asimptomatskog bolesnika, s ili bez plućnih infiltrata, do teške nekontrolirane astme, s ili bez središnje bronhiektazije i plućne fibroze (Agarwal i Chakrabarti, 2009).

Kod imunokompromitiranih osoba, narušen je rad makrofaga odgovornih za uništavanje konidija i neutrofila odgovornih za uklanjanje micelija (NDCC). Udisanje konidija aspergila kod ovakvih pacijenata može rezultirati invazivnom plućnom aspergilozom. Ova po život opasna oportunistička infekcija, javlja se uglavnom u bolesnika s teškom imunokompromitacijom, posebice ako je posrijedi dugotrajna neutropenija ili dugotrajna terapija visokom dozom kortikosteroida. Pacijenti s rizikom od invazivne plućne aspergiloze su kategorizirani u visokorizične (aloga transplantacija koštane srži, neutropenija i hematološki rak), srednje rizične (autologna transplantacija koštane srži, pothranjenost, kortikosteroidi, HIV, transplantacija solidnih organa, dijabetes, temeljna bolest pluća i rak solidnih organa) i nisko rizične (cistična fibroza i bolesti vezivnog tkiva) (Parody i sur., 2009). Radi se o razornoj zaraznoj bolesti pacijenata na odjelu intenzivne njege, koja se može

pojaviti i bez imunokompromitiranosti pacijenta, a kronična opstruktivna bolest pluća (KOPB) i ciroza jetre su potencijalni čimbenici rizika. U studiji obdukcije pacijenata na intenzivnoj njezi, 2,7 % pacijenata imalo je invazivnu aspergilozu. Za dobru prognozu ključna je rana dijagnoza, koja je problematična (Hiemenz i sur., 2010). Naime, uzorak se uzima s nesterilnog mjesta te je pozitivna dijagnoza na temelju kulture aspergila iz aspirata traheje upitna (Vandewoude i sur., 2006). Preporuka za pacijente s febrilnom neutropenijom, koja ne odgovara na antibiotike širokog spektra, u ustanovama s visokom incidencijom od aspergiloze je rana empirijska primjena antimikotika (Ruchlemer i sur., 1996). Aspergiloza se može manifestirati i kao kronična progresivna bolest, odnosno kronična plućna aspergiloza, KPA. Ona pogađa preko 3 milijuna ljudi diljem svijeta, uglavnom pacijenata koji su preboljeli plućnu tuberkulozu i čine više od 100 000 oboljelih godišnje. Stopa preživljenja kod KPA je samo 47 % nakon 10 godina, ovisno o stupnju oštećenja pluća i prisutnosti čimbenika rizika u bolesnika (Rozaliyani i sur., 2020).

Najčešće patogene vrste kod ljudi su *A. fumigatus* i *A. flavus* koji osim što mogu uzrokovati aspergiloze, uzrokuju i ozbiljne očne infekcije, uključujući keratitis i endoftalmitis. U imunokompetentnog 27-godišnjeg pacijenta bez povijesti intravenske upotrebe droga, traume oka ili kompromitiranog imunološkog sustava, prijavljen je endogeni endoftalmitis uzrokovan s *A. fumigatus*, a uspješan ishod bio je rezultat kombiniranog kirurškog liječenja i antifungalne terapije. Uzročnik je teško dokazan, jer unatoč vidljivim hifama u bioptiranom uzorku, kultiviranje je bilo otežano pa tako i laboratorijska dijagnoza (Valluri i sur., 1993). Vrsta *A. nidulans* se također pokazala kao uzročnik raznih infekcija kod ljudi. Osim što je poznata kao uzročnik invazivne aspergiloze, identificirana je i u slučajevima otomikoze, micetoma, keratitisa, sinusitisa i plućnog aspergiloma (Chen i sur., 2016).

U seriji *Versicolores* prijavljeni uzročnici humanih infekcija su *A. protuberus*, *A. sydowii*, *A. versicolor* i *A. hongkongensis* koji je otkriven u studiji o onihomikozama (Chen i sur., 2016; Tsang i sur., 2016). Vrsta *A. versicolor* je najčešće prijavljivani oportunistički patogen u seriji. Prijavljeni su slučajevi onihomikoza (Torres-Rodríguez i sur., 1998), invazivne plućne aspergiloze (Charles i sur., 2011), otomikoze (Swain i sur., 2020), diseminirane aspergiloze u psa koja se očitovala kao diskospondilitis, osteomijelitis i pijelonefritis te dva slučaja endoftalmitisa (Zhang i sur., 2012). U prvom slučaju radilo se o endogenom endoftalmitisu u 25-godišnjeg imunokompetentnog (broj CD4 limfocita  $> 500/\text{mm}^3$ , neutrofila  $> 1000/\text{mm}^3$ ), HIV pozitivnog pacijenta (Perri i sur., 2005). Drugi slučaj bio je kod zdravog 58-godišnjeg

pacijenta nakon mikroperforacije rožnice koja se dogodila kao ozljeda starim kabelom pri radu u trošnoj kući. Dijagnoza je, unatoč postojanim simptomima, nastupila tek nakon 6 mjeseci kada je primijećen ožiljak na oku i napravljena kultura infiltrata oka. Nažalost pri prvom odlasku liječniku nije uzet u obzir način zadobivanja ozljede i propuštena je dijagnoza. Naime *A. versicolor* se često nalazi u izolacijskim materijalima i kabelima u trošnim kućama i svaka trauma koja uključuje te elemente treba pomoći kliničaru da uzme u obzir mogući gljivični uzrok endoftalmitisa (Bifrare i Wolfensberger, 2007). U istraživanju provedenom na kliničkim izolatima u Češkoj, *A. sydowii* bila je druga najčešća vrsta nakon *A. fumigatus*. Pronađen je u uzorcima iz dišnog sustava, uha i s površinskih tkiva (Siqueira i sur., 2016). Zanimljiv je i slučaj perzistentne vaginoze uzrokovane *A. protuberansom* u imunokompetentne pacijentice (Borsa i sur., 2015).

Nekoliko vrsta *Aspergillus* poput *A. fumigatus*, *A. terreus*, *A. flavus*, *A. niger*, *A. sydowii* i *A. versicolor* povezuje se s problemima onečišćenja zraka u zatvorenom prostoru, no kako je *A. versicolor* najčešće prijavljena gljivična vrsta u odjeljku *Versicolores* iz vlažnih zatvorenih prostora, njezina se prisutnost koristi kao pokazatelj sindroma bolesne zgrade (SBS – Sick building syndrome) (Jurjević i sur., 2012). Sindrom bolesne zgrade prvobitno je definirala Svjetska zdravstvena organizacija (World Health organisation, WHO) 1983. godine i definirala ga kao skup nespecifičnih simptoma koji se povezuju s određenim radnim mjestima. Simptomi SBS-a mogu biti varijabilni jer zahvaćaju različite dijelove tijela, no mogu se podijeliti na opće simptome (promuklost glasa, alergije, simptom slični gripi, respiratorne bolesti, mučnina, vrtoglavica, glavobolja, umor i nemogućnost koncentracije), simptome sluznice (iritacija očiju, grla i nosa ili kašalj) i dermalne simptome (svrbež kože, lica, ruku ili vlasišta) koji uobičajeno više pogađaju žene (Ghaffarianhoseini i sur., 2018). Mehanizam nastanka simptoma nije poznat u potpunosti, no brojne studije pokazale su povezanost izloženosti sporama plijesni u zatvorenom prostoru s povećanim IgE kod pacijenata iz bolesnih zgrada. U istraživanju provedenom na miševima, izloženost sporama *A. versicolor*, potaknula je proizvodnju proinflammatornih citokina u plućima i u višoj dozi izazvala akutnu upalu pluća (Schwab i Straus, 2004). Dugotrajna izloženost sporama je u miševa uzrokovala i stvaranje granuloma u plućima, koji bi se povukao tek nakon 28 dana (Jussila i sur., 2002). Simptomi SBS-a pojavljuju se u oko 20% izloženih osoba i uobičajeno nestaju kada osoba napusti ugrožavajući prostor na duže vrijeme (Schwab i Straus, 2004).

### 1.3. Sistemski antimikotici

Po prirodi gljive su eukarioti i dijele mnoge receptore, pa posljedično i mete antimikotika s ljudima i ostalim sisavcima, stoga je otežan razvoj snažnih antimikotika, koji su visoko selektivni za gljivične receptore te imaju nizak profil nuspojava i interakcija (Peyton i sur., 2015). Za liječenje sistemskih mikoza poput invazivne aspergiloze, koja zahtijeva sustavnu antifungalnu terapiju, postoje samo četiri glavne klase antifungalnih sredstava (polieni, flucitozin, azoli i ehinokandini) (Van Daele i sur., 2019).

Klasa poliena uključuje nistatin, natamicin i amfotericin B, antibiotske polienske makrolide koji predstavljaju prve antimikotike širokog spektra, koji su se pojavili na tržištu. Nistatin je prvi otkriveni, 1949.godine i koristi se isključivo lokalno za površinske mikoze, kao i natamicin. Amfotericin B (AMB), otkriven 1953.godine, proizvodi ga Gram-pozitivna bakterija *Streptomyces nodosus*, a naziv je dobio zbog svoje amfoternosti. Općenito su polieni građeni od hidrofobnog polienskog „repa“ i hidrofilne „glave“ s mikozaminskom skupinom i poliolskim lancem (Carolus i sur., 2020). Ovakva građa omogućava ugradnju nekoliko molekula amfotericina u lipidni dvosloj gljivica i vezanje za ergosterol. Sekvestracijom ergosterola stvaraju se pore u membrani, koje uzrokuju izlazak intracelularnih iona i makromolekula te povećano nakupljanje reaktivnih kisikovih specija (ROS) što posljedično djeluje fungicidno (Houšt i sur., 2020). Nedostatak amfipatske građe amfotericina B je slaba topljivost u vodi zbog koje se priprema kao koloidna suspenzija s natrijevim deoksikolatom za intravenoznu primjenu, a oralno se koristi samo za gljivične infekcije lumena gastrointestinalnog trakta. Nakon intravenozne primjene široko se rasprostranjuje u većinu tkiva, ali samo 2-3% razine u krvi se postiže u cerebrospinalnoj tekućini, stoga je za određene vrste gljivičnog meningitisa potrebna intratekalna primjena (Katzung, 2018). Ovaj antimikotik širokog spektra djelovanja djeluje na kvasce, plijesni i dimorfne gljive, međutim njegova klinička uporaba je smanjena zbog nedostatka oralne formulacije namijenjene za sistemsku terapiju te značajne toksičnosti, koja uključuje akutnu toksičnost povezanu s infuzijom, te akutnu i kroničnu nefrotoksičnost (Van Daele i sur., 2019). Toksičnost povezana s infuzijom proizlazi iz indukcije proupalnih citokina i kemokina kao što su interleukin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), faktor nekroze tumora  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), monocitni kemotaktični protein 1 (MCP-1) i makrofagni upalni protein 1 $\beta$  (MIP-1 $\beta$ ). Simptomi su gotovo univerzalni, a čine ih vrućica, zimica, grčevi mišića, povraćanje, glavobolja i hipotenzija (Dismukes, 2000). Nefrotoksičnost je rezultat metabolizma amfotericina, koji se izlučuje nepromijenjen urinom (33%) i fecesom

(43%), te zbog nedovoljne selektivnosti prema membranama s kolesterolom umjesto ergosterola, uzrokuje razaranje bubrežnih stanica. Kako bi se smanjili ovi neželjeni učinci, AMB deoksikolat je ugrađen u lipidne formulacije zadržavajući svoju fungicidnu aktivnost. Tri lipidne formulacije su komercijalno dostupne: AMB lipidni kompleks (ABLC), liposomski AMB (LAMB) i AMB koloidna disperzija (ABCD) (Houšt i sur., 2020). Lipidne formulacije pokazuju povoljniju podnošljivost i profil toksičnosti, no nefrotoksične nuspojave i povezani poremećaji elektrolita, iako su smanjeni, nisu u potpunosti uklonjeni (Van Daele i sur., 2019).

Flucitozin je analog pirimidina, odobren 1960-ih i općenito se koristi u ograničenim okolnostima, kao što je u kombinaciji s polienom za kriptokokni meningitis. Rijetko se koristi sam zbog brzog razvoja rezistencije, koja se javlja tijekom monoterapije te brojnih nuspojava koje uključuju kožni osip, gastrointestinalne smetnje, disfunkciju jetre i supresiju koštane srži (Dismukes, 2000). Citozin deaminazom, koja nije prisutna u ljudi, flucitozin se pretvara u toksični spoj 5-fluorouracil, koji ometa biosintezu proteina i deoksiribonukleinske kiseline (DNA) (Perfect, 2017).

Azoli su sintetski spojevi koji se prema broju atoma dušika u peteročlanom azolnom prstenu mogu klasificirati u imidazole s dva atoma i nešto novije triazole s tri atoma dušika. Imidazoli su otkriveni u kasnim 1960-im godinama, a zbog niske selektivnosti i posljedično velikih interakcija i nuspojava, koriste se samo u lokalnoj terapiji. Imidazole čine ketokonazol, klotrimazol, ekonazol i izokonazol koji nisu dostupni u Hrvatskoj te mikonazol, koji je prvi otkriven, no zbog svoje visoke toksičnosti povučen je s tržišta (Maertens, 2004). Triazoli općenito imaju širi spektar djelovanja, a uključuju itrakonazol i flukonazol, koji čine prvu generaciju te vorikonazol, izavukonazol i posakonazol, koji čine drugu generaciju. Mehanizam djelovanja azola temelji se primarno na inhibiciji fungalnog citokrom P450 (CYP) enzima, lanosterol 14 $\alpha$ -demetilaze, posljedično sprječavajući sintezu ergosterola, glavne sterolne komponente stanične membrane gljivica. Nedostatak ergosterola i popratna akumulacija 14 $\alpha$ -metiliranih prekursora uzrokuje promjenu fluidnosti membrane, nenormalno zadržavanje sterola, nepotpuno formiranje stanične stijenke, zadržavanju intracelularnih fosfolipida te promijenjenu aktivnost nekih membranskih enzima, poput hitin sintaze (Nami i sur, 2019). Konačni učinak je inhibicija rasta i replikacije gljivica. Također zabilježen je niz sekundarnih učinaka, kao što je inhibicija morfogenetske transformacije kvasaca u oblik micelija, smanjena adherencija gljivica i izravni toksični učinci na membranske fosfolipide

(Maertens, 2004). Razni azoli imaju različite afinitete prema  $14\alpha$ -demetilazi, što rezultirata različitim antifungalnim djelovanjem, ali i sigurnosnim profilom. Triazoli pokazuju značajno veći afinitet prema gljivičnom CYP enzimu, stoga imaju sigurniji toksikološki profil i širu primjenu, koja uključuje terapiju i profilaksu invazivnih gljivičnih infekcija, a dostupni su kao oralne (PO) i intravenske (IV) formulacije. Glavni nedostatak povezan s upotrebom triazola odnosi se na njihov metabolizam u jetri preko CYP enzima (uglavnom CYP2C9, CYP2C19 i CYP3A4) i njihova inhibicija istih, što dovodi do brojnih lijek-lijek interakcija, koje su posebno izražene kod primjene itraconazola i vorikonazola. Posebna skupina su karcinomski pacijenti, čija terapija uključuje brojne lijekove poput paklitaksela, irinotekana i palbocikliba, koji se metaboliziraju CYP enzimima te primjena triazola kada nisu kontraindicirani u takvih pacijenata mora uključivati praćenje razine antitumorskog lijeka u plazmi (Chen i sur., 2011). Ostali nedostaci uključuju nepravilnu apsorpciju (itraconazol i posakonazol oralna otopina) koja rezultira nepredvidivom izloženosti triazolu, nelinearna i zasićena farmakokinetika s potrebom za terapijskim praćenjem lijeka (vorikonazol), hepatobilijarne nuspojave (cijela klasa), produljenje QTc intervala (EKG) s povezanom (potencijalno fatalnom) aritmijom, kao što je torsades de pointes, oklijevanje u primjeni intravenske formulacije, koja sadrži ciklodekstrine, u bolesnika s oštećenom funkcijom bubrega (itraconazol, vorikonazol, posakonazol), akutne nuspojave (npr. halucinacije i vorikonazol, fotosenzitivne reakcije) kao i toksičnosti povezane s njihovom produljenom uporabom (kao što su kardiotoksičnost, neuropatija, skvamozni rak kože, periostitis povezan s fluorom) i pojava rezistencije na azole koja je najizraženija u vrste *A. fumigatus* (Van Daele i sur., 2019). Unatoč svemu, i dalje se smatraju lijekovima prvog izbora u mnogim kliničkim slučajevima, na primjer u terapiji invazivne aspergiloze ili prevenciji invazivnih gljivičnih infekcija u bolesnika s dugotrajnom neutropenijom. Flukonazol ima odličnu oralnu bioraspodjivost i prodire u cerebrospinalnu tekućinu, no ne pokazuje aktivnost protiv aspergila ili drugih nitastih plijesni. Vorikonazol je klinički relevantan inhibitor CYP3A4 enzima u sisavaca, no unatoč tomu lijek je izbora za invazivnu aspergilozu. Posakonazol je član azola najšireg spektra, koristi se kao posljednja linija u terapiji invazivne aspergiloze, kao profilaksa gljivične infekcije tijekom indukcijske kemoterapije leukemije i za pacijente s alogenom transplantacijom koštane srži s graft-versus-host bolesti (Katzung, 2018).

Posljednja i najnovija klasa antimikotika, koja je u upotrebi od 2000-ih godina su ehinokandini, veliki ciklički heksapeptidi s bočnim lipidnim lancem (Denning, 2003). Ovi modificirani analozi pneumokandina su produkti fermentacije raznih mikroorganizama.

Naime, anidulafungin se dobiva iz ehinokandina B<sub>0</sub> (*Aspergillus nidulans*), kaspofungin iz pneumokandina B<sub>0</sub> (*Glarea lozoyensis*), a mikafungin iz pneumokandina A<sub>0</sub> (*Coleophoma empetri*) (Houšt i sur., 2020). Antifungalno djelovanje se temelji na nekompetitivnoj inhibiciji 1,3-β-D-glukan sintaze, enzimskog kompleksa od dvije podjedinice: transmembranske katalitičke, Fks i unutarstanične regulatorne, Rho1 podjedinice (Houšt i sur., 2020). Inhibicijom sintaze dolazi do iscrpljivanja 1,3-β-D-glukana iz stanične stijenke gljivica, što rezultira osmotskim baloniranjem i lizom gljivične stanice (Van Daele i sur., 2019). Nažalost, imaju ograničen spektar djelovanja i neaktivni su protiv vrsta *Zigomyces*, *Cryptococcus* spp. i *Fusarium* spp., no prema vrstama roda *Candida* pokazuju fungicidno djelovanje. Na aspergile djeluju fungistatski, lizirajući apikalne vrhove hifa koje se šire, mijenjajući morfologiju hifa te mijenjajući sastav i organizaciju stanične stijenke (Perlin, 2015). S obzirom na to da djeluju fungistatski, mjerenje minimalne inhibitorne koncentracije, MIC koja je definirana kao najniža koncentracija lijeka koja je proizvela potpunu inhibiciju vidljivog rasta gljivica, za ehinokandine nije prikladno. Stoga koristi minimalna učinkovita koncentracija, MEC (Minimal effective concentration) koja je definirana mikroskopski kao najniža koncentracija lijeka koja bi dovela do rasta malih, zaobljenih, kompaktnih oblika hifa u usporedbi s dugim, nerazgranatim skupinama hifa koje se mogu vidjeti u kontroli nakon 48 sati inkubacije (Siqueira i sur., 2016). Svi ehinokandini imaju nisku oralnu bioraspoloživost i prisutni su samo u obliku za intravensku primjenu. Dobro se distribuiraju u tkiva, ali slabo u oko i cerebrospinalnu tekućinu, zbog svoje veličine i visokog afiniteta vezanja na proteine. Imaju malo ozbiljnih interakcija s drugim lijekovima, što je rezultat jedinstvenog antifungalnog mehanizma djelovanja i činjenice da nisu značajni supstrati, inhibitori ili induktori CYP ili P-glikoproteinskih sustava. Pri čemu kaspofungin ima najviše, a anidulafungin najmanje interakcija. Blagi porast klirensa kaspofungina primijećen je u kombinaciji sa snažnim induktorima ili inhibitorima CYP enzima, posebice rifampicinom, fenitoinom, efavirenzom, karbamazepinom i deksametazonom. Svi ehinokandini mogu uzrokovati disfunkciju jetre, uključujući zatajenje jetre, ali su vrlo sigurni u usporedbi s drugim klasama antimikotika te se mogu upotrebljavati i kod djece (Chen i sur., 2011). Trenutno se preporučuju kao lijekovi izbora za liječenje invazivne kandidijaze, uključujući kandidemiju (Van Daele i sur., 2019), a kaspofungin je odobren za empirijsku terapiju tijekom febrilne neutropenije te je uvelike zamijenio amfotericin B za potonju indikaciju. Kod invazivne aspergiloze licenciran je samo kao pomoćna terapija u pacijenata koji nisu odgovorili na amfotericin B, a ne kao primarna terapija (Katzung, 2018).

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Napretkom medicine, zahvaljujući otkriću novih lijekova i razvoju terapijskih protokola, produljen je životni vijek i povećana populacija imunosuprimiranih pacijenata poput onih s HIV-om, pacijenata na antitumorskoj terapiji te pacijenata na imunosupresivnoj terapiji autoimunih poremećaja te za sprječavanje ili liječenje odbacivanja doniranih organa. Također medicinski postupci su postali invazivniji i agresivniji, a popratni poremećaj zaštitnih anatomskih barijera kao rezultat velikih abdominalnih operacija, opsežnih opekline, stalnih katetera, mukozitisa izazvanih terapijom, virusnih infekcija i reakcije transplantata protiv domaćina, omogućuje gljivicama da dosegnu normalno sterilna mjesta na tijelu. Unatoč provedbi preventivnih mjera i korištenju antifungalne kemoprofilakse svjedoči se povećanoj incidenciji mukoznih i invazivnih gljivičnih infekcija tijekom posljednja dva desetljeća, što je postalo globalni javnozdravstveni problem s više od 300 milijuna oboljelih i gotovo 1,35 milijuna smrti godišnje. Stopa smrtnosti od sistemskih gljivičnih infekcija djelomično se može objasniti teškoćom njihova dijagnosticiranja u ranom stadiju razvoja, jer definitivni dokaz često zahtijeva dugotrajne i radno intenzivne pristupe, koji se ne mogu uvijek postići kod ovih teško bolesnih pacijenata. Također trenutno odobreni terapijski arsenal lijekova za liječenje mikoza ograničen je na nekoliko antifungalnih lijekova, a većina ih ima ograničenja poput niske učinkovitosti i visoke toksičnosti. Osim toga, činjenica da su neke gljivične vrste poput *A. fumigatus* otporne na dostupnu terapiju je dodatna prepreka u liječenju tih infekcija.

Velika prisutnost konidija aspergila posebice serije *Versicolores* u zraku vlažnih kuća i sve veća pojavnost infekcija uzrokovanih njima, unutar i van hospitalnih područja, potiče pitanje sigurnosti ljudi koji borave u kućama i školama poplavljenih područja. Također sve veća pojavnost rezistencije aspergila na antimikotike potiče pitanje statusa i porijekla rezistencije u seriji *Versicolores*. Razvoj morfološke dijagnostike ovih plijesni omogućio bi bržu identifikaciju uzročnika kojima je pacijent izložen i olakšao empirijski odabir terapije.

Specifični ciljevi rada su:

- Usporediti morfološke razlike i veličinu kolonija, koje vrste serije *Versicolores* postižu na različitim hranjivim podlogama
- Ispitati osjetljivost vrsta serije *Versicolores* izoliranih iz zraka unutarnjih prostora u Hrvatskoj na antimikotike dostupne za terapiju sistemskih mikoza



## 3. MATERIJALI I METODE

### 3.1. Materijali

#### 3.1.1. Hranjive podloge

- Czapek-agar s kvašćevim ekstraktom (CYA; Oxoid, UK): saharoza 30g, natrijev nitrat ( $\text{NaNO}_3$ ) 2g, kalijev klorid (KCl) 0,5g, magnezijev glicerofosfat 0,5g, željezov sulfat ( $\text{FeSO}_4$ ) 10mg, kalijev sulfat ( $\text{KSO}_4$ ) 0,35 g, agar 12g.

Izvagana praškasta supstanca se otopi u litri destilirane vode uz zagrijavanje do vrenja. Dobivena otopina se sterilizira autoklaviranjem ( $121^\circ\text{C}$ , 1,1 bar, 15 min) i zatim razlijeva u jednokratne sterilne Petrijeve zdjelice.

- Czapek-agar s kvašćevim ekstraktom i 20% glukoze (CYA20; Oxoid, UK): saharoza 170g, natrijev nitrat ( $\text{NaNO}_3$ ) 2g, kalijev klorid (KCl) 0,5g, magnezijev glicerofosfat 0,5g, željezov sulfat ( $\text{FeSO}_4$ ) 10mg, kalijev sulfat ( $\text{KSO}_4$ ) 0,35g, agar 12g.

Izvagana praškasta supstanca i dodatna saharoza se otope u litri destilirane vode uz zagrijavanje do vrenja. Dobivena otopina se sterilizira autoklaviranjem ( $121^\circ\text{C}$ , 1,1 bar, 15 min) i zatim razlijeva u jednokratne sterilne Petrijeve zdjelice.

- Dikloran 18% glicerolni agar (DG18; Oxoid, UK): glukoza 10g, pepton 5g, kalijev dihidrogenfosfat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 1g, magnezijev sulfat ( $\text{MgSO}_4$ ) 0,5g, dikloran 2mg, agar 15g.

Izvagana praškasta supstanca se otopi u litri destilirane vode uz zagrijavanje do vrenja, nakon čega se dodaje odmjereni količina glicerola i kloramfenikola, a smjesa homogenizira. Dobivena otopina se sterilizira autoklaviranjem ( $121^\circ\text{C}$ , 1,1 bar, 15 min) i zatim razlijeva u jednokratne sterilne Petrijeve zdjelice.

- Dikloran-Rose Bengal-kloramfenikolni agar (DRBC; Oxoid, UK): glukoza 10g, pepton 5g, kalijev dihidrogenfosfat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 1g, magnezijev sulfat ( $\text{MgSO}_4$ ) 0,5g, dikloran 2mg, rose-bengal 25mg, agar 15g.

Izvagana praškasta supstanca se otopi u litri destilirane vode uz zagrijavanje do vrenja. Dobivena otopina se sterilizira autoklaviranjem ( $121^\circ\text{C}$ , 1,1 bar, 15 min) i zatim razlijeva u jednokratne sterilne Petrijeve zdjelice.

- Malt-ekstrakt agar (MEA; Oxoid, UK): ekstrakt slada 30g, mikološki pepton 5g, agar 15g .

Izvagana praškasta supstanca se otopi u litri destilirane vode uz zagrijavanje do vrenja. Dobivena otopina se sterilizira autoklaviranjem (121°C, 1,1 bar, 15 min) i zatim razlijeva u jednokratne sterilne Petrijeve zdjelice.

- Mueller-Hinton agar s 2% glukoze i 0,5µg/mL metilenskog modrila (MGM)  
Mueller-Hinton agar (MH; Oxoid, UK): dehidrirana infuzija govedine 300g, kazein hidrolizat 17,5g, škrob 1,5g, agar 17g.

Izvagana praškasta supstanca s dodanom količina glukoze (20g na 1 L otopine) se otopi u litri destilirane vode uz zagrijavanje do vrenja. Dobivenoj otopini se otpipetira određena količina otopine metilenskog modrila te se nakon homogeniziranja otopina sterilizira autoklaviranjem (121°C, 1,1 bar, 15 min) i zatim razlijeva u jednokratne sterilne Petrijeve zdjelice.

Otopina metilenskog modrila se dobiva otapanjem izvagane količine metilenskog modrila u destiliranoj vodi uz lagano zagrijavanje kako bi se osiguralo potpuno otapanje.

- Sabouraud dekstrozni agar (SGA; Oxoid, UK): mikološki pepton 10g, glukoza (dekstroza) 40g, agar 15g.

Izvagana praškasta supstanca se otopi u litri destilirane vode uz zagrijavanje do vrenja. Dobivena otopina se sterilizira autoklaviranjem (121°C, 1,1 bar, 15 min) i zatim razlijeva u jednokratne sterilne Petrijeve zdjelice.

### 3.1.2. Otopina za nasađivanje kolonija s antimikotikom

- Sterilna fiziološka otopina

### 3.1.3. Disk-difuzijski antimikotici

- Amfotericin B 20 µg (AMB 20 µg; Liofilchem, Italija)
- Kaspofungin 5 µg (CAS 5 µg; Liofilchem, Italija)
- Flukonazol 100 µg (FLU 100 µg; Liofilchem, Italija)
- Itrakonazol 50 µg (ITC 50 µg; Liofilchem, Italija)
- Posakonazol 5 µg (POS 5 µg; Liofilchem, Italija)
- Vorikonazol 1 µg (VO 1 µg; Liofilchem, Italija)

## 3.2. Metoda

### 3.2.1. Uzorkovanje

Uzorci obrađeni u ovom radu dio su znanstveno istraživačkog projekta (Štetni učinci pojedinačnih i kombiniranih mikotoksina *Aspergillus* vrsta-MycotoxA IP-09-2014-5982) financiran od Hrvatske zaklade za znanost (HRZZ). Prikupljeni su u razdoblju od 2016. do 2017.godine na poplavljenom području Gunje te Gornjeg Stupnika, koji je služio kao kontrolna skupina. Uzorci su prikupljeni iz prašine, vanjskog zraka i unutarnjeg zraka popravljenih i neoštećenih kuća te škola. Kolonije su bile nasađene, izolirane te im je identitet potvrđen PCR metodom nakon čega su čuvane u sterilnim Eppendorf epruvetama na -20°C. Prikupljene vrste predstavljaju sve vrste serije *Versicolores* koje su dosad pronađene na području Hrvatske.

### 3.2.2. Uzgoj i nasađivanje

#### 3.2.2.1. Uzgoj radi utvrđivanja fenotipskih obilježja

Uzorci su nasađivani direktno iz Eppendorf epruveta u kojima su čuvani, nakon prilagođavanja na sobnu temperaturu i vorteksiranja. Nasađivani su na 6 različitih podloga: CYA, CYA20, DG-18, DRBC, MEA i SGA na kojima su rasli 7 dana, zaštićeni od svjetlosti na 25°C. Svaka vrsta je nasađivana iz dva različita uzroka, uz iznimke *A. pepii* i *A. griseoaurantiacus*, koji su prethodno pronađeni u samo jednom uzorku. U razvijenom morfološkom ključu nazivi i alfanumerički kodovi boja korištenih za opis kolonija odnose se na Raynera (1970) .

#### 3.2.2.2. Priprema inokuluma za nasađivanje na MGM agaru

Uzorci su prije nasađivanja na MGM podloge prvotno bili uzgojeni na MEA ili SGA agaru, kako bi se kultura obnovila i pripremila za prikupljanje konidija. Nakon rasta kolonija u tami, 7 dana, na 25°C konidije su prikupljene sterilnim brisom, smočenim fiziološkom otopinom kojim se lagano prešlo preko kolonija. Konidije prikupljene na brisu suspendirane su u fiziološkoj otopini, a homogenost suspenzije osigurana je vorteksiranjem. Koncentracija inokuluma utvrđena je brojanjem konidija pod mikroskopom s pomoću hemocitometra i iznosila je od  $2 \times 10^6$  do  $5 \times 10^6$  CFU/ml. Ploče su inokulirane unutar 30 minuta od pripreme suspenzije inokuluma.

### 3.2.2.3. Nasađivanje na MGM agaru

Sterilni bris smočen pripremljenim inokulumom, čvrsto se pritisnuo uz unutarnju stijenku epruvete kako bi se uklonio višak tekućine, a zatim upotrijebio za nanošenje kolonija na ploču ukupno 3 puta, uz rotaciju ploče za otprilike 60° svaki put, kako bi se osiguralo ravnomjerno nanošenje. Diskovi su nanešeni na inokulirani agar nakon što se ploča sušila 3 minute i lagano pritisnuti, kako bi se osigurao potpuni kontakt s površinom agara. Nanosila su se 3 diska po jednoj ploči i svaki je od središta bio udaljen 24 mm. Inkubacija je trajala 10 dana, a promjer zone mjerio se do najbližeg milimetra na točki u kojoj postojalo značajno smanjenje rasta. Ispitano je 20 sojeva 11 različitih vrsta, pri čemu su sve vrste osim *A. pepii* i *A. griseoaurantiacus* ispitane iz dva različita uzorka. Za dvije navedene vrste ovo nije bilo moguće jer su prethodno pronađene u samo jednom primjerku.

### 3.2.3. Disk-difuzijska metoda

Jedan od najstarijih pristupa ispitivanju osjetljivosti koji se naširoko koristi u mnogim kliničkim laboratorijima zbog svoje jednostavnosti i niske cijene. Koriste se papirnati diskovi s fiksnom koncentracijom antifungalnog lijeka, a promjer zone oko diska bez kolonija naziva se zona inhibicije te se odnosi na brzinu difuzije antimikotika kroz agar i na osjetljivost izolata na taj antimikotik. Kada su promjeri zona u korelaciji s minimalnim inhibitornim koncentracijama, MIK-ovima za danu kombinaciju gljivice i antimikotika, mogu se prevesti u interpretativne kategorije temeljene na ukupnoj korelaciji. Kriteriji interpretacije promjera razvijeni su usporedbom promjera zona s MIK vrijednosti mnogih izolata. Te su vrijednosti zatim pretvorene u kriterije tumačenja na temelju ukupne korelacije s MIK-om i ishodom bolesnika. Ovo znači da kriteriji disk-difuzije mogu razviti samo za kombinacije gljivica/antimikotika za koje već postoje prijelomne točke (Berkow i sur., 2020).

## 4. REZULTATI

Ispitivanje morfoloških karakteristika serije *Versicolores* provedeno je na uzorcima pronađenim na području Hrvatske i rezultiralo je morfološkim ključem na podlogama CYA, CYA20, DG-18, DRBC, MEA i SGA. Opisane vrste uključuju *A. amoenus*, *A. creber*, *A. fructus*, *A. griseoaurantiacus*, *A. jensenii*, *A. pepii*, *A. protuberus*, *A. puulaauensis*, *A. sydowii*, *A. tennesseensis* i *A. venenatus*. Navedene vrste su također nasađivane na Mueller-Hinton agaru s dodatkom glukoze i metilenskog modrila te im je disk-difuzijskom metodom (prilagođen CLSI M44-A protokol) ispitana osjetljivost na antimikotike: amfotericin B, kaspofungin, flukonazol, itrakonazol, vorikonazol i posakonazol. Rezultati ispitivanja osjetljivosti na antimikotike prikazani su u Tablici 1.

### MORFOLOŠKI KLJUČ

#### *A. amoenus* (slika 1)

Kolonije uzgojene 7 dana na DG agaru na 25 °C postigle su promjer 14-18 mm, uzdignute su 1-2 mm sa središnjim udubljenjem. Rubovi su glatki, brazdom odvojeni, širine 2 mm i svjetlije obojeni s bojama u rasponu od bijele do bež (45). Konidijalne glavice su guste, baršunaste, svijetlo žuto (11) ili bež (64) obojene s ponekim radijalnim brazdama, bez eksudata.

Kolonije uzgojene 7 dana na MEA agaru na 25 °C postigle su promjer 12-24 mm, uzdignute su 1mm sa središnjim udubljenjem, rubovi su glatki, širine 2 mm i bijelo obojeni. Konidijalne glavice su guste, baršunaste i svijetlo sive (105) do zelenkasto plave (92) boje s ponekim radijalnim brazdama. Izlučeni eksudat je proziran i bež (86) obojen.

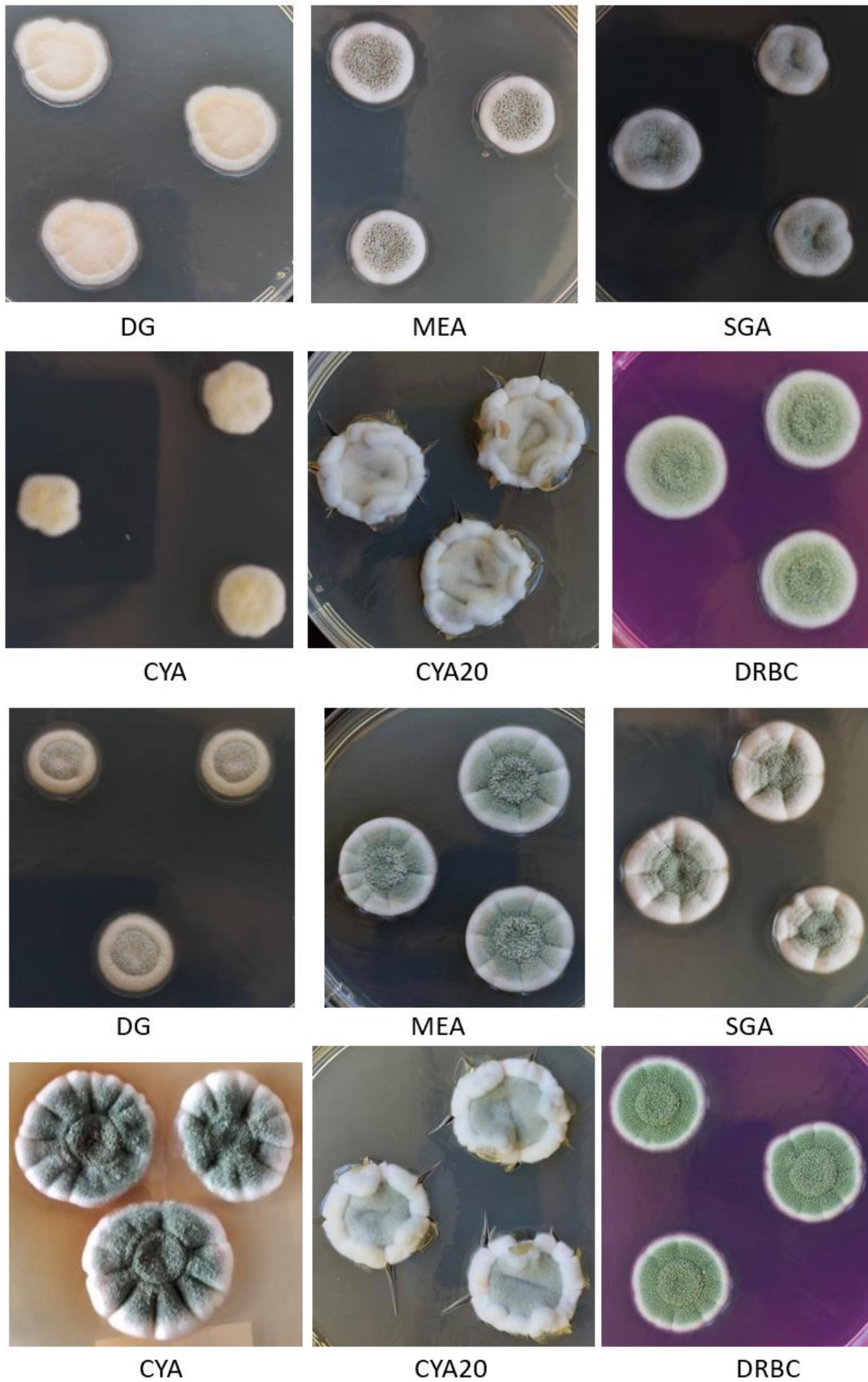
Kolonije uzgojene 7 dana na SGA agaru na 25 °C postigle su promjer 15-21mm, uzdignute su 2mm sa središnjim udubljenjem i ponekim radijalnim i koncentričnim brazdama. Rubovi su glatki, debljine 2 mm i bijelo obojeni. Konidijalne glavice su guste, baršunaste i sivo zelenkaste(91) boje. Izlučeni eksudat je proziran.

Kolonije uzgojene 7 dana na CYA agaru na 25 °C postigle su promjer 9-23mm, središnje su uzdignute 2 mm, rubovi su glatki, debljine 1 mm i bijelo obojeni. Konidijalne glavice su

baršunaste, svijetlo žuto(66) ili sivkasto zelene(110) boje. Jedan uzorak izlučivao je prozirni eksudat.

Kolonije uzgojene 7 dana na CYA20 agaru na 25 °C postigle su promjer 22-23 mm, uzdignute su 3 mm sa središnjim udubljenjem. Rubovi su glatki i uzdignuti 6mm, debljine 4 mm i bijelo obojeni s radijalnim brazdama. Konidijalne glavice su baršunaste i sivo zelenkaste (68 i 91) boje. Izlučeni eksudat je proziran.

Kolonije uzgojene 7 dana na DRBC agaru na 25 °C postigle su promjer 19-21 mm, uzdignute su 1 mm sa središnjim povišenjem, pa udubljenjem. Rubovi su glatki, debljine 1 mm i bijelo obojeni. Konidijalne glavice su funikularne i svjetlo zelenkaste (50 i 71) boje, bez eksudata.



Slika 1. Morfologija vrste *A. amoenus* iz serije *Versicolores* nakon 7 dana uzgoja u tami pri 25°C



### *A. creber* (slika 2)

Kolonije uzgojene 7 dana na DG agaru na 25 °C postigle su promjer 11-12 mm, uzdignute su 2mm sa središnjim udubljenjem. Rubovi su pjeskasti, plosnati i širine 1-2 mm. Makroskopski izgled kolonije je praškast i bež (45 i 64) boje, bez eksudata.

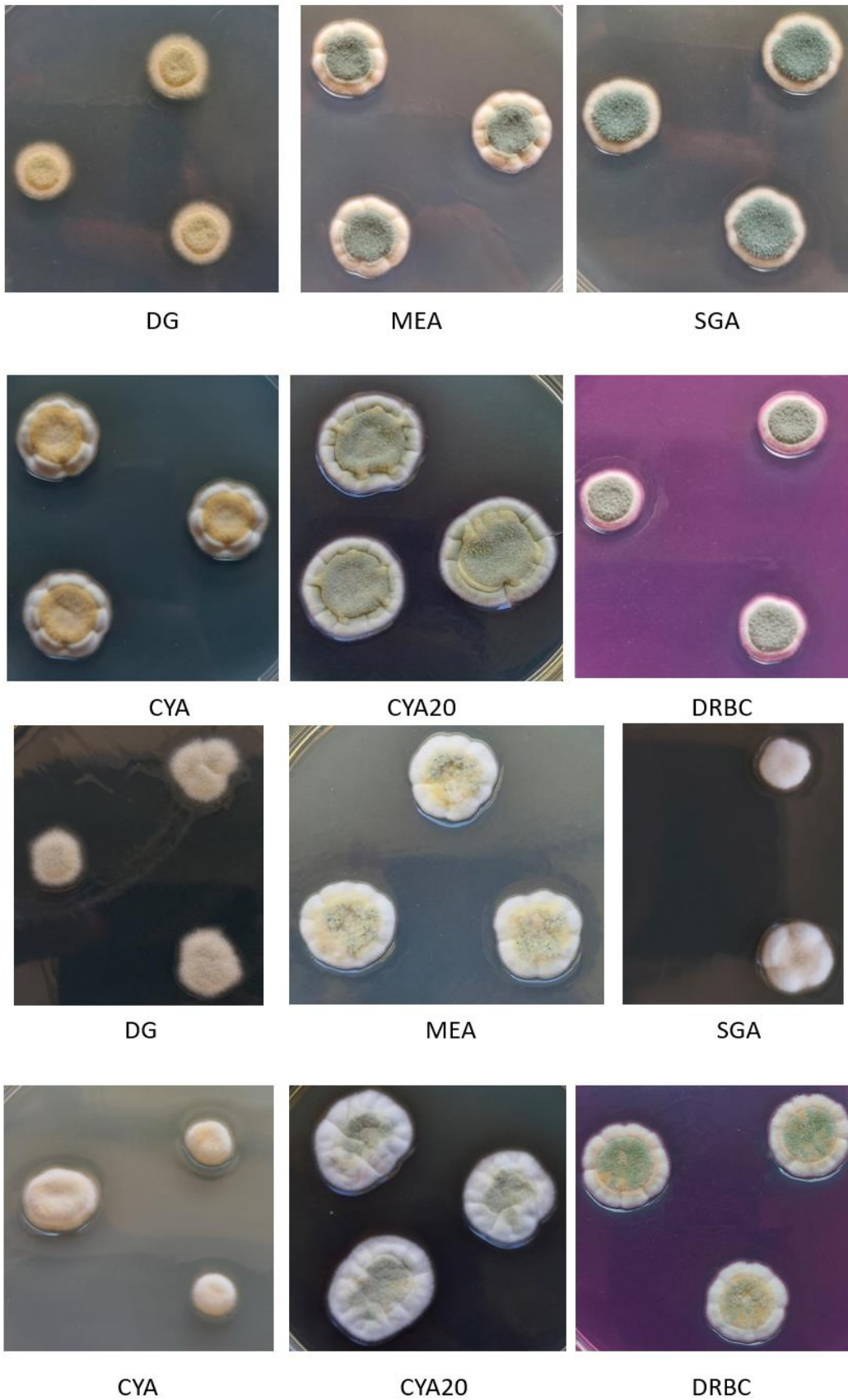
Kolonije uzgojene 7 dana na MEA agaru na 25 °C postigle su promjer 15-17 mm, uzdignute su 2mm sa središnjim udubljenjem. Rubovi su glatki, širine 2 mm, bijelo obojeni s radijalnim brazdama. Konidijalne glavice su guste, baršunaste i u središtu zelene(72) ili svijetlo žute(15) boje, bez eksudata.

Kolonije uzgojene 7 dana na SGA agaru na 25 °C postigle su promjer 10-15 mm, uzdignute su 2mm sa središnjim udubljenjem i ponekim radijalnim brazdama. Rubovi su glatki, debljine 2 mm i bijelo obojeni. Konidijalne glavice su guste, baršunaste i u središtu dodatno izdignute i zelene (92) boje ili udubljene i svijetlo žute (46) boje, bez eksudata.

Kolonije uzgojene 7 dana na CYA agaru na 25 °C postigle su promjer 11-16 mm, uzdignute 2 mm, rubovi su glatki, širine 1 mm, bijelo obojeni s radijalnim brazdama. Konidijalne glavice su baršunaste, od ruba odvojene koncentričnom brazdom, svijetlo žuto (11) su obojene i bez eksudata.

Kolonije uzgojene 7 dana na CYA20 agaru na 25 °C postigle su promjer 21-23 mm, uzdignute su 2mm sa središnjim udubljenjem. Rubovi su glatki, širine 2 mm, bijelo obojeni s radijalnim brazdama. Konidijalne glavice su guste, baršunaste, od ruba odvojene koncentričnom brazdom i u središtu žute (46) i zelene (72) boje, bez eksudata. Slabi crvenkasto ljubičasti topljivi pigment prisutan u podlozi.

Kolonije uzgojene 7 dana na DRBC agaru na 25 °C postigle su promjer 10-16 mm, uzdignute su 1 mm sa središnjim udubljenjem. Rubovi su glatki, debljine 1 mm, bijelo obojeni u jednom uzorku s radijalnim brazdama. Konidijalne glavice su baršunaste, od ruba odvojene koncentričnom brazdom, zelenkasto sive (105) ili zeleno i žuto (71 i 11) obojene, bez eksudata.



Slika 2. Morfologija vrste *A. creber* iz serije *Versicolores* nakon 7 dana uzgoja u tami pri 25°C

*A. fructus* (slika 3)

Kolonije uzgojene 7 dana na DG agaru na 25 °C postigle su promjer 9-10 mm, uzdignute su 1 mm. Rubovi su pjeskasti i bež (45) boje. Makroskopski izgled kolonije je praškast i u središtu zelenkasto bež (86) boje, bez eksudata.

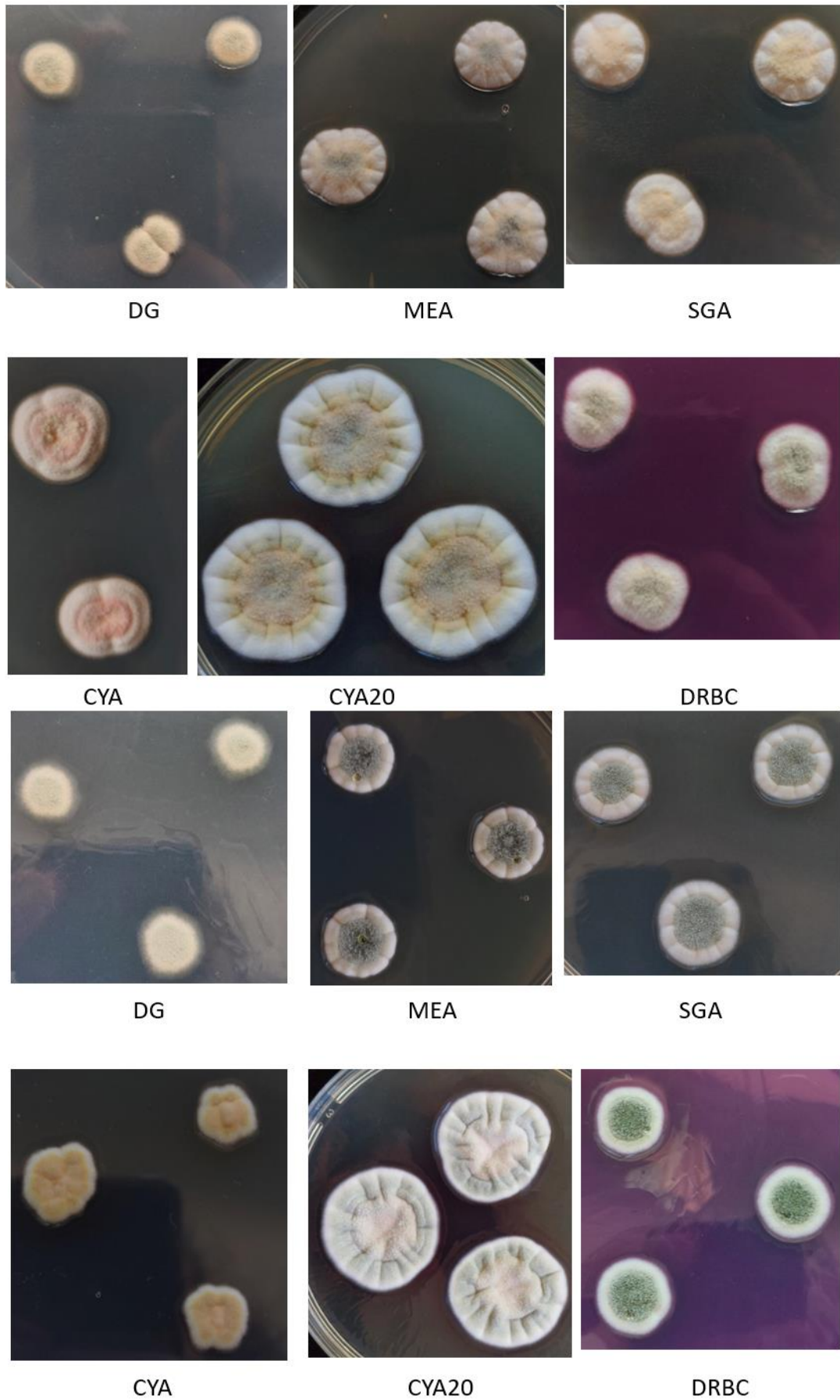
Kolonije uzgojene 7 dana na MEA agaru na 25 °C postigle su promjer 15-17 mm, uzdignute su 2 mm, rubovi su glatki. Bojom se razlikuje središnja krug i dva vanjska "obruča". Vanjski obruč širine je 2mm, bijelo je obojen s radijalnim brazdama. Srednji obruč širok je 2 mm i svijetlo žute (45) do svijetlo zelene (105) je boje, a središnji krug je plavkasto zelene(123) boje. Konidijalne glavice su guste i baršunaste, a jedan izolat je imao prozirni žućkasti (46) eksudat.

Kolonije uzgojene 7 dana na SGA agaru na 25 °C postigle su promjer 16-17 mm, uzdignute su 2mm sa središnjim udubljenjem. Rubovi su glatki, vanjski obruč širok je 2mm, bijele je boje s radijalnim brazdama. Središnji krug odvojen je koncentričnom brazdom i svijetlo žute (45) ili zelenkasto sive (120) boje. Konidijalne glavice su guste, izgledaju baršunasto, nema eksudata.

Kolonije uzgojene 7 dana na CYA agaru na 25 °C postigle su promjer 12-17 mm, uzdignute su 2 mm sa središnjim udubljenjem. Rubovi su glatki i u ravnini s podlogom. Jedan uzorak imao je koncentričnu brazdu koja je dijelila vanjski bijeli obruč, širine 4 mm i unutarnji ružičasti (58 i 61) krug. Drugi uzorak imao je nepravilan uzorak brazdanja te bijeli vanjski obruč širine 2 mm i unutarnji krug žuto narančaste (10) boje. Konidijalne glavice su i bez eksudata.

Kolonije uzgojene 7 dana na CYA20 agaru na 25 °C postigle su promjer 27-28 mm, uzdignute su 2 mm sa središnjim udubljenjem. Rubovi su glatki, bijelo obojeni, pojavljuje se koncentrična brazda i izvan nje radijalne brazde. Konidijalne glavice su guste, baršunaste, u središtu žute (41 i 45) i zelene (120) boje, bez eksudata. Slabi crvenkasto ljubičasti topljivi pigment prisutan u podlozi.

Kolonije uzgojene 7 dana na DRBC agaru na 25 °C postigle su promjer 14-15 mm, uzdignute su 2 mm. Rubovi su glatki i bijele boje. Konidijalne glavice su baršunaste, svijetlo žute (45) i zelene (65) boje, jedan uzorak imao je prozirni eksudat.



Slika 3. Morfologija vrste *A. fructus* iz serije *Versicolores* nakon 7 dana uzgoja u tami pri 25°C

*A. griseoaurantiacus* (slika 4)

Kolonije uzgojene 7 dana na DG agaru na 25 °C postigle su promjer 12-13 mm, uzdignute su 2 mm sa središnjim udubljenjem. Rubovi su glatki i bež (61) boje. Makroskopski izgled kolonije je praškast i u središtu narančasto bež (10) boje, bez eksudata.

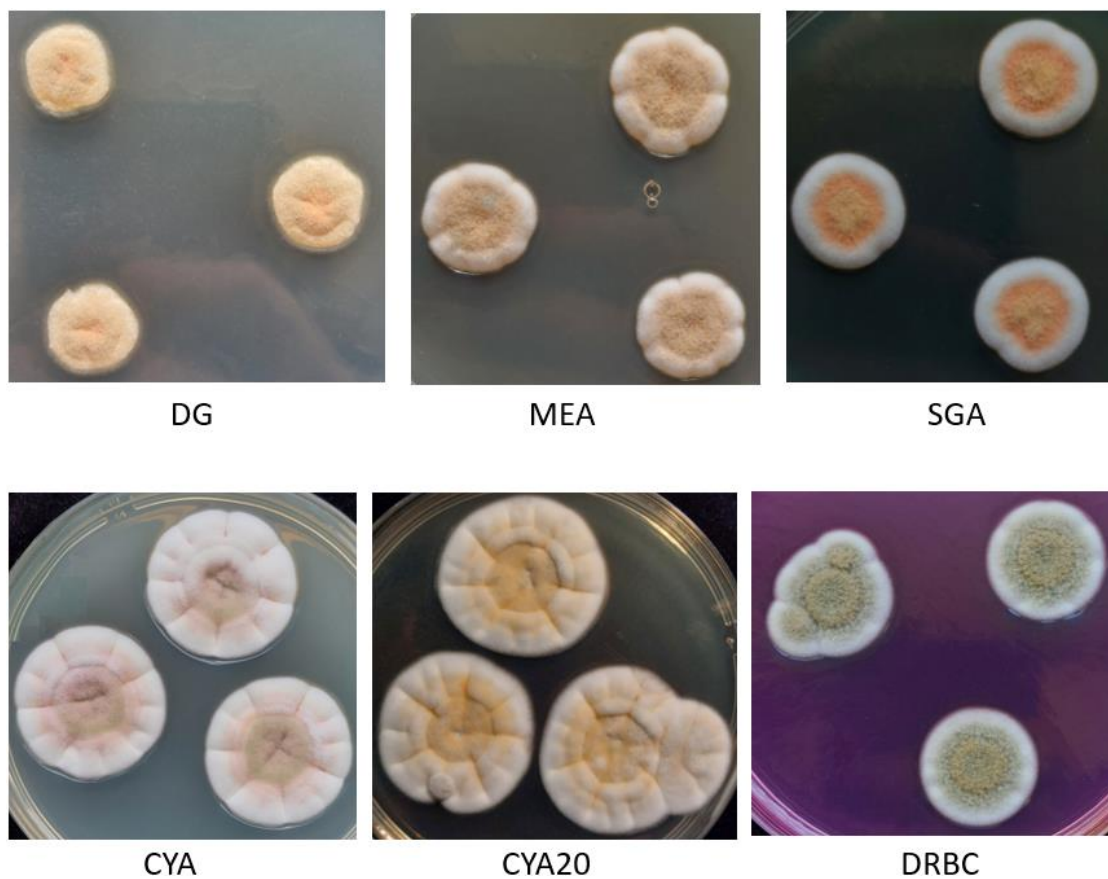
Kolonije uzgojene 7 dana na MEA agaru na 25 °C postigle su promjer 16-18 mm, uzdignute su 2 mm sa središnjim udubljenjem, rubovi su glatki. Bojom se razlikuje središnja krug i vanjski obruč. Vanjski obruč širine je 2 mm, bijelo je obojen s radijalnim brazdama. Središnji krug odvojen je koncentričnom brazdom i narančasto bež (41) je boje. Konidijalne glavice su guste i baršunaste, prisutan je prozirni, narančasti (7) eksudat.

Kolonije uzgojene 7 dana na SGA agaru na 25 °C postigle su promjer 17-19 mm, uzdignute su 2 mm sa središnjim ispupčenjem. Rubovi su glatki, vanjski obruč širok je 3mm i bijele je boje. Srednji obruč širok je 2mm i ružičasto narančaste (4) je boje, a središnji krug je ispupčen i svijetlo žute boje(10). Konidijalne glavice su guste, izgledaju baršunasto, nema eksudata.

Kolonije uzgojene 7 dana na CYA agaru na 25 °C postigle su promjer 30 mm, uzdignute su 1 mm sa središnjim udubljenjem. Rubovi su glatki, prisutne su radijalne i koncentrične brazde. Konidijalne glavice su guste, baršunaste i obojene bijelo, svijetlo ružičasto (58 i 61) i svijetlo zeleno (89). Prisutan je prozirni eksudat.

Kolonije uzgojene 7 dana na CYA20 agaru na 25 °C postigle su promjer 35 mm, uzdignute su 2 mm sa središnjim udubljenjem. Rubovi su glatki, bijelo obojeni, pojavljuje se koncentrična brazda i izvan nje radijalne brazde. Konidijalne glavice su guste, baršunaste, u središtu narančasto žute (10 i 41) boje, bez eksudata.

Kolonije uzgojene 7 dana na DRBC agaru na 25 °C postigle su promjer 21 mm, uzdignute su 2 mm sa središnjim udubljenjem. Rubovi su glatki i bijele boje. Konidijalne glavice su funikularne, u središtu uzdignute i svijetlo žute (10) i zelenkaste (86) boje.



Slika 4. Morfologija vrste *A. griseoaurantiacus* iz serije *Versicolores* nakon 7 dana uzgoja u tami pri 25°C

#### *A. jensenii* (slika 5)

Kolonije uzgojene 7 dana na DG agaru na 25 °C postigle su promjer 10-14 mm, uzdignute su 1 mm sa središnjim udubljenjem. Rubovi su pjeskasti, bež (45) boje, u jednom uzorku su u ravnini podloge i širine 1-2 mm. Makroskopski izgled kolonije je praškast, bez eksudata.

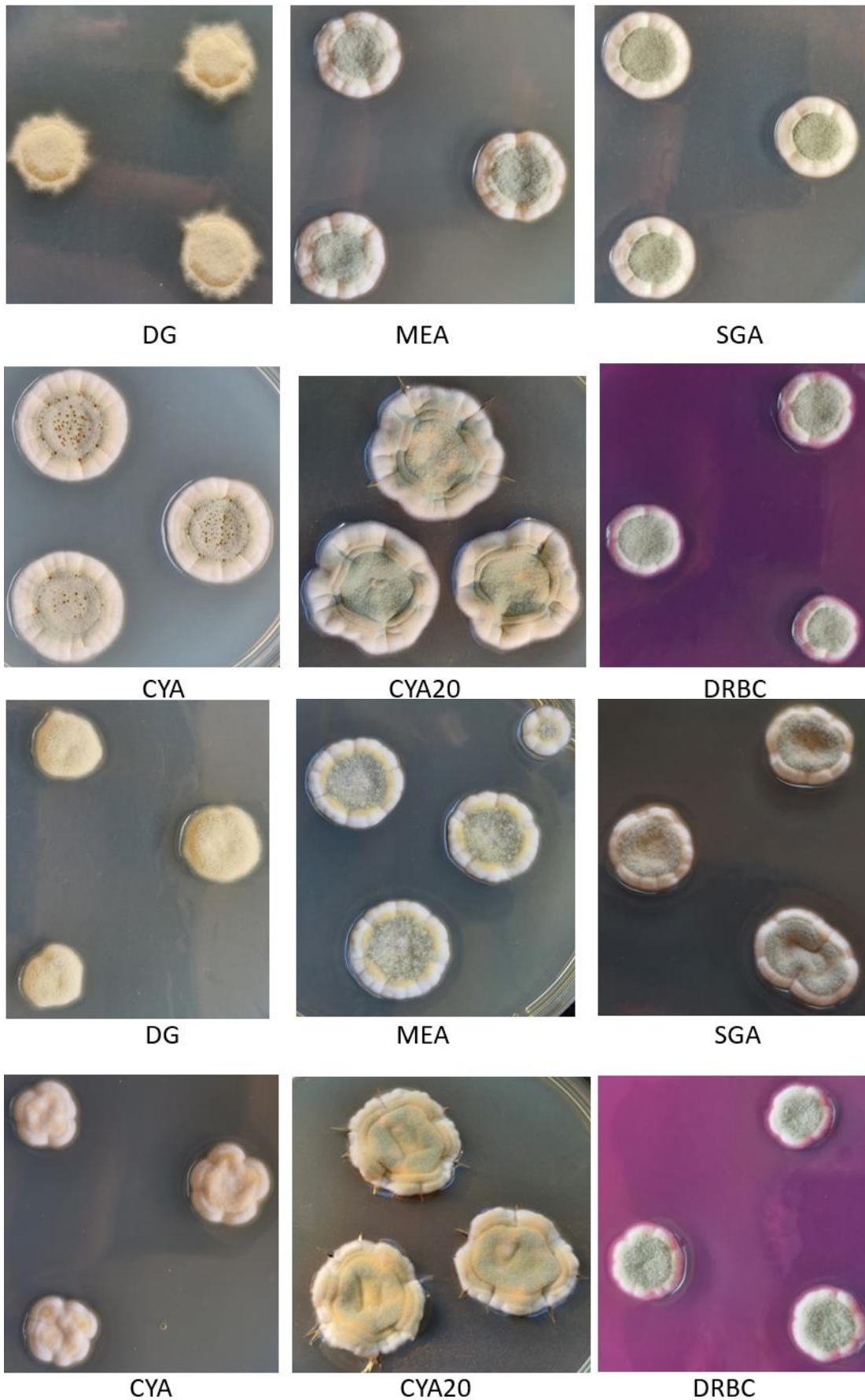
Kolonije uzgojene 7 dana na MEA agaru na 25 °C postigle su promjer 16-20 mm, uzdignute su 2 mm sa središnjim udubljenjem, rubovi su glatki. Bojom se razlikuje središnji krug i dva vanjska obruča. Vanjski obruč širine je 2 mm, bijelo je obojen s radijalnim brazdama. Srednji obruč širok je 1 mm i svijetlo žute (11) do svijetlo zelene (86) je boje, a središnji krug je zelenkasto sive (120) boje. Konidijalne glavice su guste i baršunaste, bez eksudata.

Kolonije uzgojene 7 dana na SGA agaru na 25 °C postigle su promjer 15-16 mm, uzdignute su 2 mm sa središnjim udubljenjem, rubovi su glatki. Bojom se razlikuje središnji krug i dva vanjska obruča. Vanjski obruč širine je 1-2 mm, bijelo je obojen s radijalnim brazdama. Srednji obruč širok je 1 mm, također ima radijalne brazde i svijetlo žute(45) do zelenkasto sive (117) je boje, a središnji krug je plavo zelenkaste (105 i 120) boje. Konidijalne glavice su guste, izgledaju baršunasto, bez eksudata.

Kolonije uzgojene 7 dana na CYA agaru na 25 °C postigle su promjer 14-23mm. Uzdignute su 2 mm sa središnjim udubljenjem, rubovi su glatki i bijele boje. Jedan izolat je bio svijetlo žuto (45) i svijetlo zeleno (117) obojen, izlučivao je prozirni, smečkasti (106) eksudat te je imao jednu koncentričnu brazdu, a izvan nje više radijalnih brazdi. Drugi izolat imao je bijeli vanjski obruč širine 2 mm i koncentričnom brazdom odvojeni unutarnji krug žuto narančaste (47) boje, bez eksudata. Konidijalne glavice su guste i baršunaste u oba izolata.

Kolonije uzgojene 7 dana na CYA20 agaru na 25 °C postigle su promjer 23-26 mm, uzdignute su 2 mm sa središnjim udubljenjem. Rubovi su glatki i mjestimično uzdignuti 4 mm, bijelo obojeni. Pojavljuju se dvije koncentrične brazde i izvan unutarnje pojavljuju se radijalne brazde. Konidijalne glavice su guste, baršunaste, žute (47) i zelenkasto sive (117) boje, bez eksudata. Slabi crvenkasto ljubičasti topljivi pigment prisutan u podlozi.

Kolonije uzgojene 7 dana na DRBC agaru na 25 °C postigle su promjer 12-13mm, uzdignute su 2mm. Rubovi su glatki i bijele boje, pojavljuje se jedna koncentrična brazda i izvan nje par radijalnih brazdi. Konidijalne glavice su baršunaste i zelenkasto sive (117) boje, eksudat je proziran i svijetlo žute (46) boje.



Slika 5. Morfologija vrste *A. jensenii* iz serije *Versicolores* nakon 7 dana uzgoja u tami pri 25°C



### *A. pepii* (slika 6)

Kolonije uzgojene 7 dana na DG agaru na 25 °C postigle su promjer 12-14 mm, uzdignute su 2 mm sa središnjim udubljenjem. Rubovi su pjeskasti, bež (86) boje, u ravnini podloge i širine 1-2 mm. Makroskopski izgled kolonije je praškast, bez eksudata.

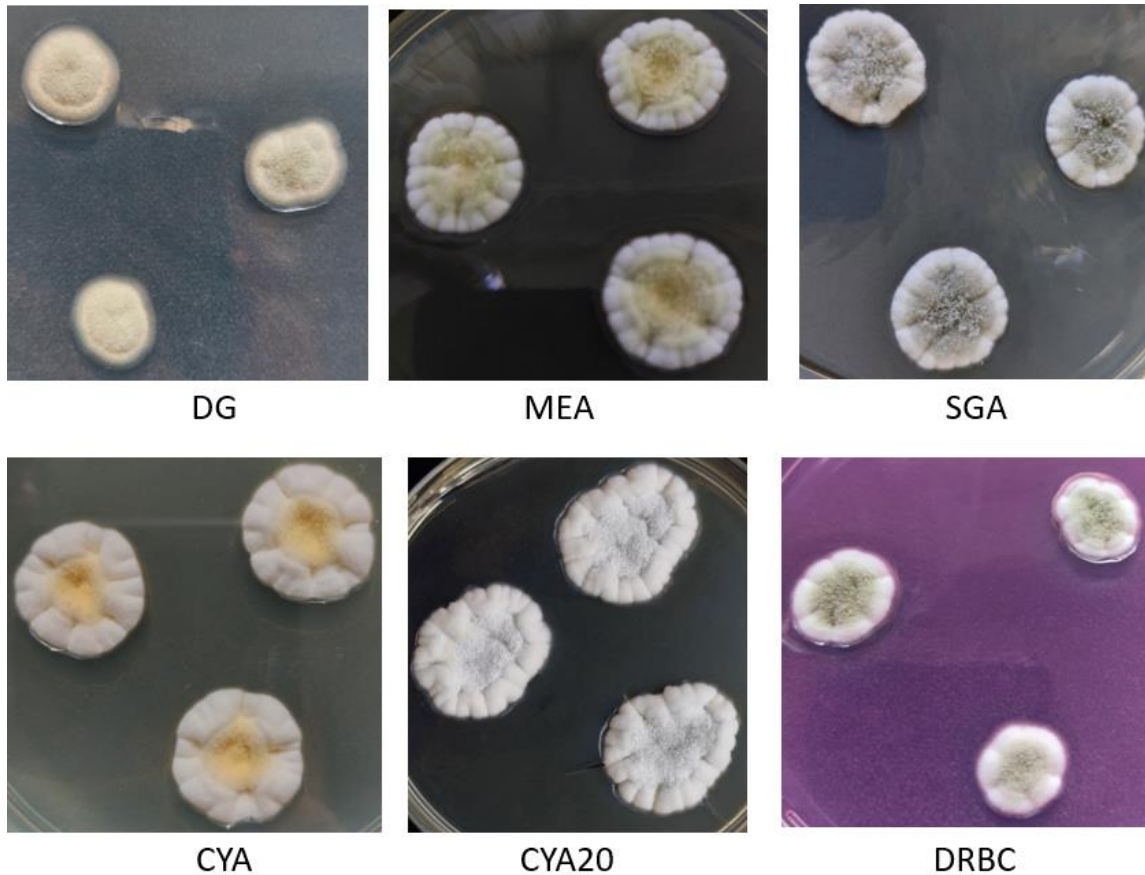
Kolonije uzgojene 7 dana na MEA agaru na 25 °C postigle su promjer 18-20 mm, uzdignute su 2 mm sa središnjim udubljenjem i radijalnim brazdama koje se nalaze izvan jedine koncentrične brazde, rubovi su glatki i bijele boje. Konidijalne glavice su guste, funikularne, svijetlo žute (66) boje, bez eksudata.

Kolonije uzgojene 7 dana na SGA agaru na 25 °C postigle su promjer 22-24 mm, uzdignute su 2 mm sa središnjim udubljenjem i radijalnim brazdama, rubovi su glatki. Konidijalne glavice su guste, funikularne, plavkasto sive (105 i 120) boje s prozirnim eksudatom.

Kolonije uzgojene 7 dana na CYA agaru na 25 °C postigle su promjer 20 mm, uzdignute su 2mm sa središnjim udubljenjem, rubovi su glatki. Bojom se razlikuje središnji krug i vanjski obruč. Vanjski obruč širine je 5mm, bijelo je obojen s radijalnim brazdama. Središnji krug odvojen je koncentričnom brazdom i svijetlo žute (11) je boje. Konidijalne glavice su guste i baršunaste, bez eksudata.

Kolonije uzgojene 7 dana na CYA20 agaru na 25 °C postigle su promjer 28-31 mm, uzdignute su 2 mm sa središnjim udubljenjem, rubovi su glatki. Koncentričnom brazdom je odijeljen središnji krug i vanjski obruč. Vanjski obruč širine je 5mm, bijelo je obojen s radijalnim brazdama. Središnji krug je bijele do svijetlo sive (109) boje. Konidijalne glavice su guste, funikularne, bez eksudata.

Kolonije uzgojene 7 dana na DRBC agaru na 25 °C postigle su promjer 14-16 mm, uzdignute su 2 mm s radijalnim brazdama, rubovi su glatki i bijele boje. Konidijalne glavice su baršunaste i zelenkasto sive (89) boje, eksudat je proziran.



Slika 6. Morfologija vrste *A. peyii* iz serije *Versicolores* nakon 7 dana uzgoja u tami pri 25°C

#### *A. protuberus* (slika 7)

Kolonije uzgojene 7 dana na DG agaru na 25 °C postigle su promjer 12-14 mm, uzdignute su 2 mm sa središnjim udubljenjem. Rubovi su pjeskasti, u ravnini podloge i širine 1 mm. Makroskopski izgled kolonije je praškast, bež (45) boje i bez eksudata.

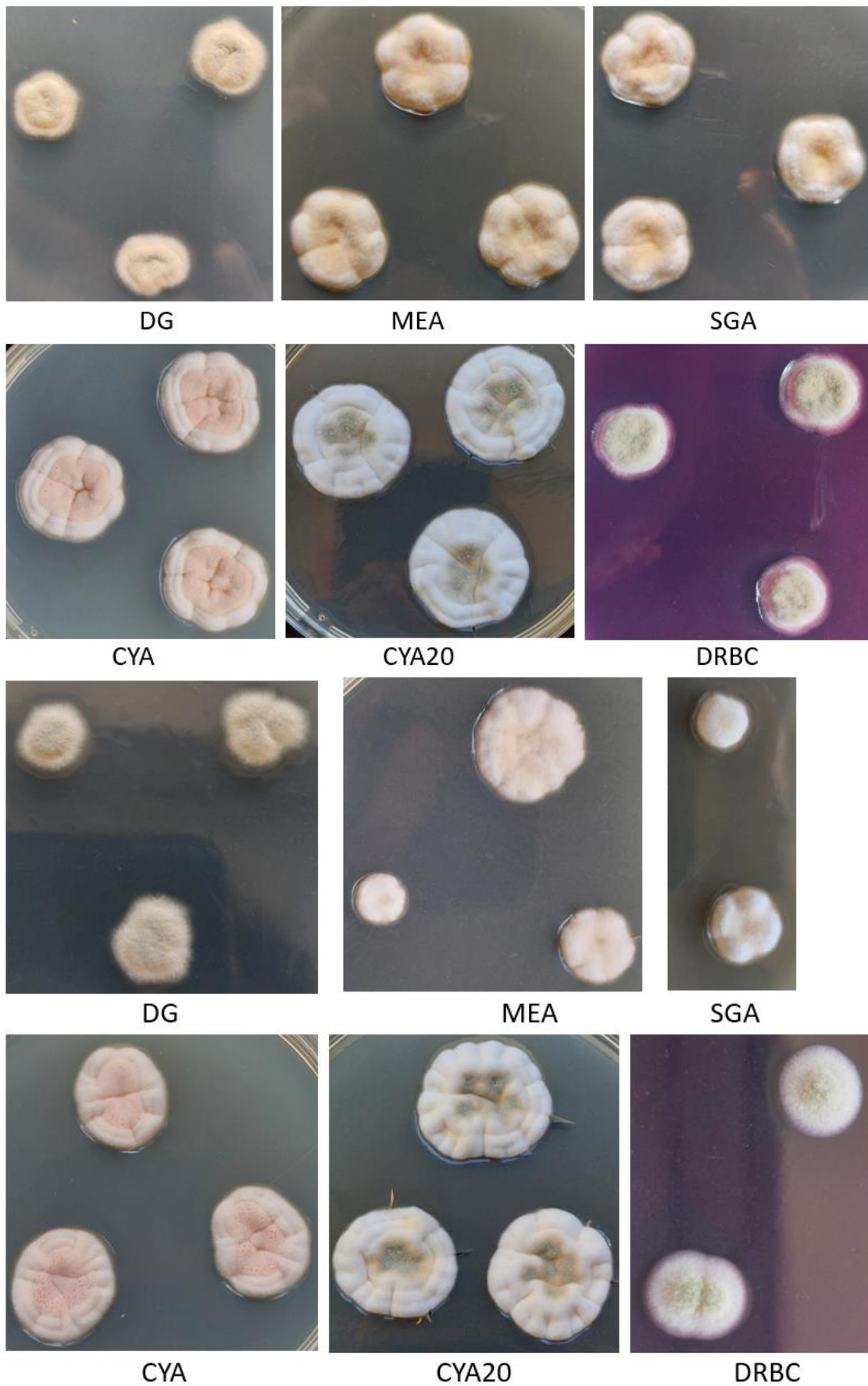
Kolonije uzgojene 7 dana na MEA agaru na 25 °C postigle su promjer 9-16 mm, uzdignute su 2 mm sa središnjim udubljenjem i radijalnim brazdama, rubovi su glatki. Konidijalne glavice su guste, baršunaste, bijele do svijetlo žute (11) boje, u jednom uzorku pojavljuju se male, prozirne kapljice eksudata.

Kolonije uzgojene 7 dana na SGA agaru na 25 °C postigle su promjer 10-17 mm, uzdignute su 2 mm sa središnjim udubljenjem, rubovi su glatki. Bojom se razlikuje svijetlo žuti (11) središnji krug i bijeli vanjski obruč, širine 1 mm s radijalnim brazdama. Konidijalne glavice su guste, izgledaju baršunasto, nema eksudata.

Kolonije uzgojene 7 dana na CYA agaru na 25 °C postigle su promjer 21-24 mm, rubovi su glatki. Pojavljuju se dvije koncentrične brazde i izvan unutarnje pojavljuju se radijalne brazde. Konidijalne glavice su guste, baršunaste, izvan unutrašnje koncentrične brazde su bijelo obojene, a unutar nje su svijetlo ružičasto (41 i 61) obojene s prozirnim eksudatom.

Kolonije uzgojene 7 dana na CYA20 agaru na 25 °C postigle su promjer 24-27 mm, uzdignute su 2 mm sa središnjim udubljenjem. Rubovi su glatki i bijelo obojeni. Pojavljuju se jedna do dvije koncentrične brazde i izvan unutarnje pojavljuju se radijalne brazde. Konidijalne glavice su guste, baršunaste, žute (11) i plavkasto sive (51) boje, bez eksudata.

Kolonije uzgojene 7 dana na DRBC agaru na 25 °C postigle su promjer 12-13 mm, uzdignute su 2 mm. Rubovi su glatki i bijele boje. Konidijalne glavice su baršunaste, žute (11) i zelenkaste (49) boje.



Slika 7. Morfologija vrste *A. protuberus* iz serije *Versicolores* nakon 7 dana uzgoja u tami pri 25°C

*A. puulaauensis* (slika 8)

Kolonije uzgojene 7 dana na DG agaru na 25 °C postigle su promjer 9-12 mm, uzdignute su 2 mm sa središnjim udubljenjem. Rubovi su pjeskasti, u jednom uzorku su u ravnini podloge i široki 1 mm. Makroskopski izgled kolonije je praškast, bež (45 i 64) boje i bez eksudata.

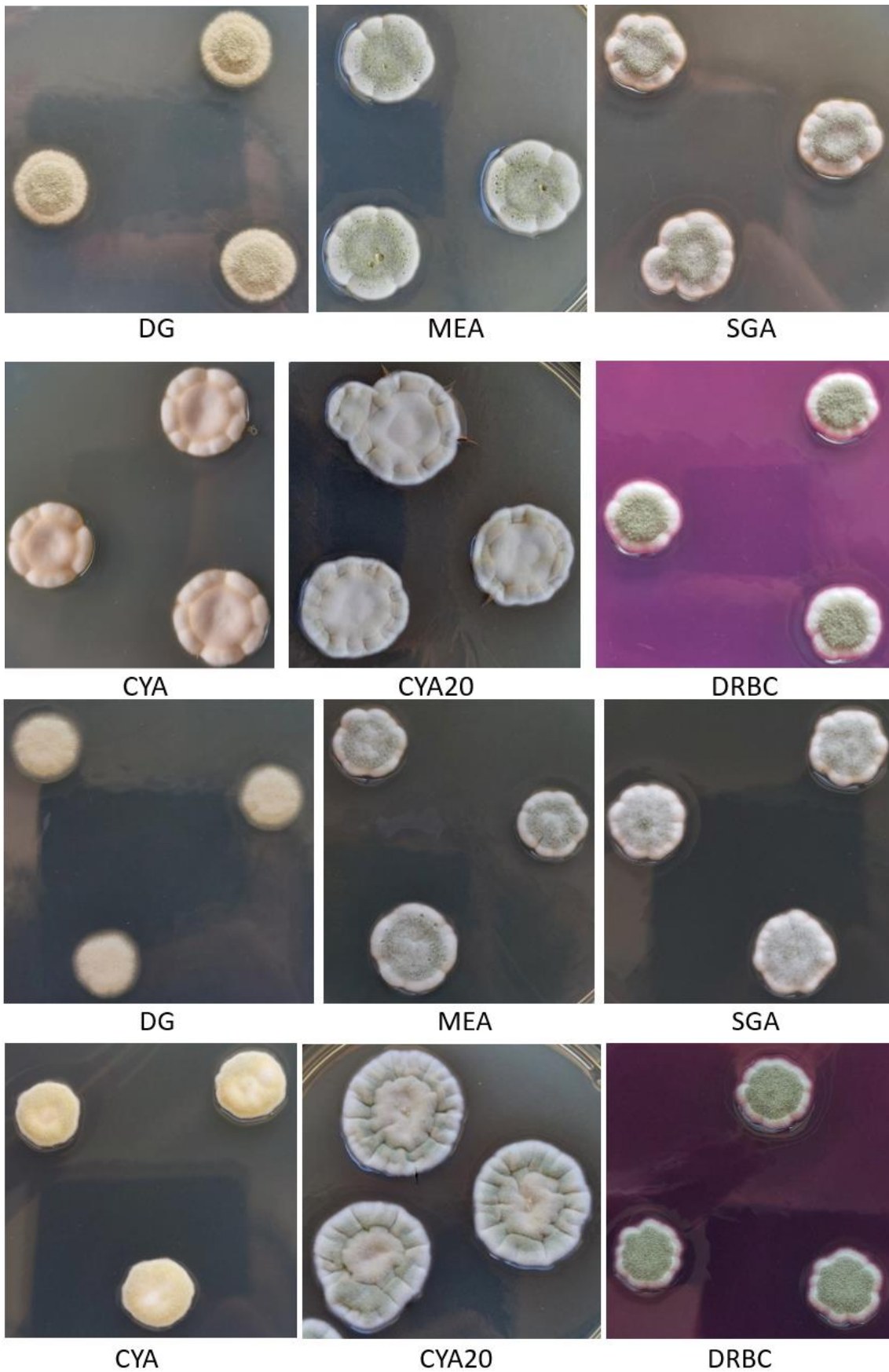
Kolonije uzgojene 7 dana na MEA agaru na 25 °C postigle su promjer 13-18 mm, uzdignute su 1-2 mm sa središnjim udubljenjem i radijalnim brazdama na rubovima, koji su glatki i bijele boje. Konidijalne glavice su guste, baršunaste, svijetlo zelene (68) do plavkasto sive (91) boje, eksudat je proziran i svijetlo žute boje.

Kolonije uzgojene 7 dana na SGA agaru na 25 °C postigle su promjer 12-17 mm, uzdignute su 2 mm sa središnjim udubljenjem, rubovi su glatki, bijele boje s radijalnim brazdama. Konidijalne glavice su guste, baršunaste, svijetlo sive (109) i sivo zelenkaste (89) boje, bez eksudata.

Kolonije uzgojene 7 dana na CYA agaru na 25 °C postigle su promjer 12-17 mm, uzdignute su 2 mm sa središnjim udubljenjem, rubovi su glatki. U jednom uzorku pojavljuje se koncentrična brazda i izvan nje radijalne brazde. Konidijalne glavice su guste, baršunaste, svijetlo ružičasto (41) i svijetlo žuto (36) obojene, bez eksudata.

Kolonije uzgojene 7 dana na CYA20 agaru na 25 °C postigle su promjer 20-27 mm, uzdignute su 2 mm sa središnjim udubljenjem. Rubovi su glatki i bijelo obojeni. Pojavljuje se jedna koncentrična brazda i izvan nje pojavljuju se radijalne brazde. Konidijalne glavice su guste, baršunaste, bež (45) i zelenkaste (91) boje, bez eksudata. Slabi crvenkasto ljubičasti topljivi pigment prisutan u podlozi.

Kolonije uzgojene 7 dana na DRBC agaru na 25 °C postigle su promjer 11-13 mm, uzdignute su 2 mm, rubovi su glatki i bijele boje. Pojavljuje se jedna koncentrična brazda, izvan nje pojavljuju se radijalne brazde, a unutar nje su baršunaste konidijalne glavice zelenkaste (50 i 67) boje, bez eksudata.



Slika 8. Morfologija vrste *A. puulaauensis* iz serije *Versicolores* nakon 7 dana uzgoja u tami pri 25°C

*A. sydowii* (slika 9)

Kolonije uzgojene 7 dana na DG agaru na 25 °C postigle su promjer 9-14 mm, uzdignute su 2 mm. Jedan uzorak ima središnje udubljenje, bež (45) je boje, rubovi su mu pjeskasti, u razini s podlogom i širine 1-2 mm. Drugi uzorak je baršunast i svijetlo bež(45) do bijele boje, oba su bez eksudata.

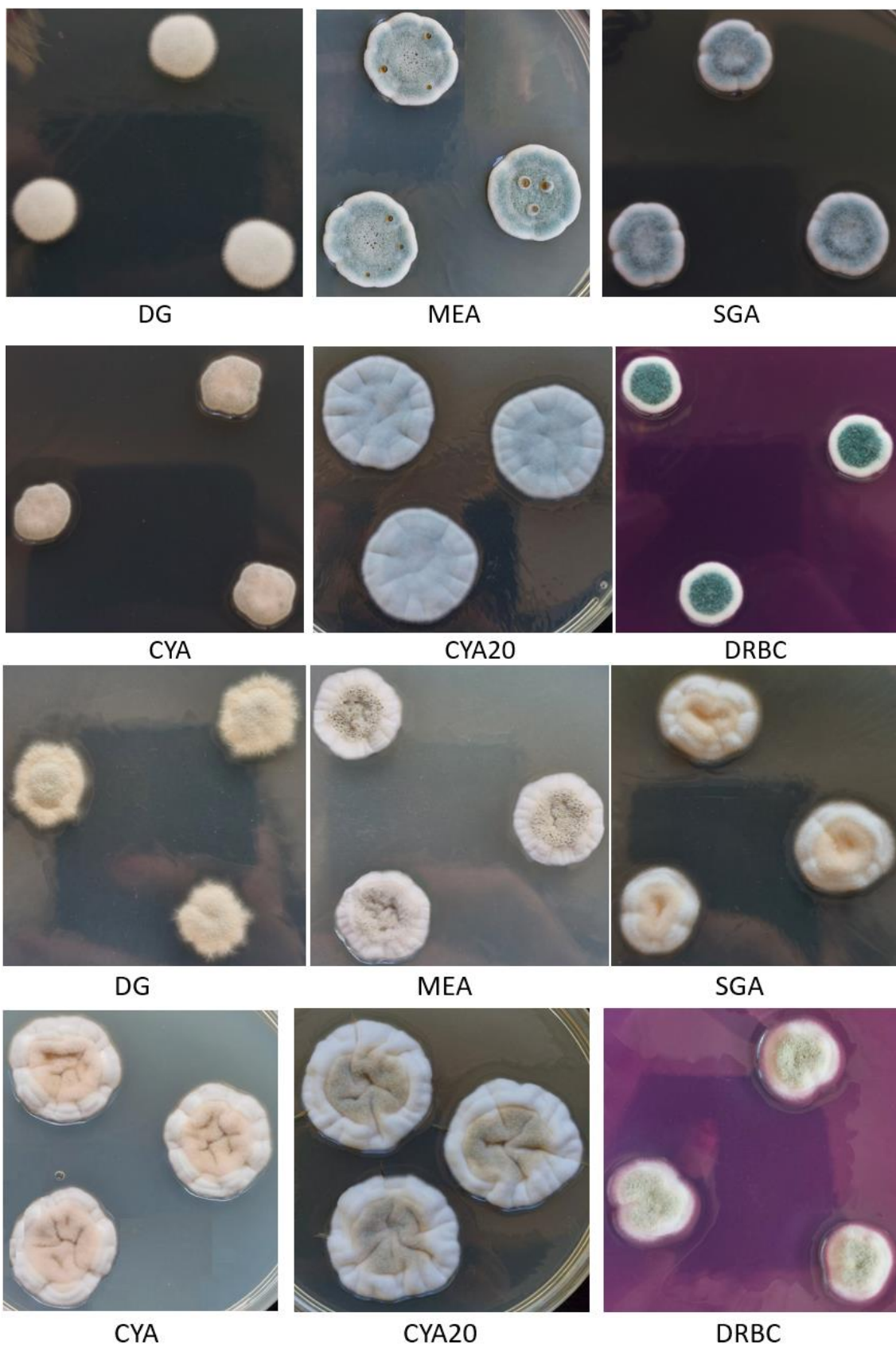
Kolonije uzgojene 7 dana na MEA agaru na 25 °C postigle su promjer 19-23 mm, uzdignute su 1-2 mm sa središnjim udubljenjem i radijalnim brazdama na rubovima, koji su glatki i bijele boje. Konidijalne glavice su guste, baršunaste, bež (45) ili plavkasto zelene (92) boje, eksudat je proziran i narančasto smeđe boje.

Kolonije uzgojene 7 dana na SGA agaru na 25 °C postigle su promjer 12-19 mm, uzdignute su 2 mm sa središnjim udubljenjem. Rubovi su glatki, bijele boje i s ponekom radijalnom brazdom. Konidijalne glavice su guste, baršunaste, svijetlo žute (11) ili zelenkasto plave (25) boje, bez eksudata.

Kolonije uzgojene 7 dana na CYA agaru na 25 °C postigle su promjer 9-24 mm. Uzdignute su 2 mm sa središnjim udubljenjem, rubovi su glatki. Jedan uzorak je imao dvije koncentrične brazde unutar kojih je bio svijetlo ružičaste (41) boje, a izvan njih bio je bijele boje s više radijalnih brazdi. Drugi uzorak nije imao brazde i bio je bež (45) boje. Konidijalne glavice su guste, baršunaste i bez eksudata u oba izolata.

Kolonije uzgojene 7 dana na CYA20 agaru na 25 °C postigle su promjer 21-30 mm, uzdignute su 2-4 mm sa središnjim udubljenjem i radijalnim brazdama. Rubovi su glatki i bijelo obojeni. U jednom uzorku pojavljuje se jedna koncentrična brazda unutar koje su konidijalne glavice svijetlo žuto(11) i zelenkasto(92) obojene. Drugi uzorak bio je svijetlo plavo (73) obojen. Konidijalne glavice su guste, baršunaste i s prozirnim eksudatom u oba primjerka.

Kolonije uzgojene 6 dana na DRBC agaru na 25 °C postigle su promjer 9-14 mm, uzdignute su 2 mm, rubovi su glatki. Pojavljuje se jedna koncentrična brazda, izvan nje su baršunaste konidijalne glavice bijele boje, a unutar nje su svijetlo zelene(68) ili plavo zelenkaste (23) boje, jedan uzorak izlučivao je prozirni eksudat.



Slika 9. Morfologija vrste *A. sydowii* iz serije *Versicolores* nakon 7 dana uzgoja u tami pri 25°C



*A. tennesseensis* (slika 10)

Kolonije uzgojene 7 dana na DG agaru na 25 °C postigle su promjer 10-17 mm, uzdignute su 1-2 mm sa središnjim udubljenjem. U jednom uzorku rubovi su pjeskasti, u ravnini podloge i široki 1 mm. Drugi uzorak imao je oštro ograničene, valovite rubove. Makroskopski izgled kolonije je praškast, bež (45 i 11) boje i bez eksudata.

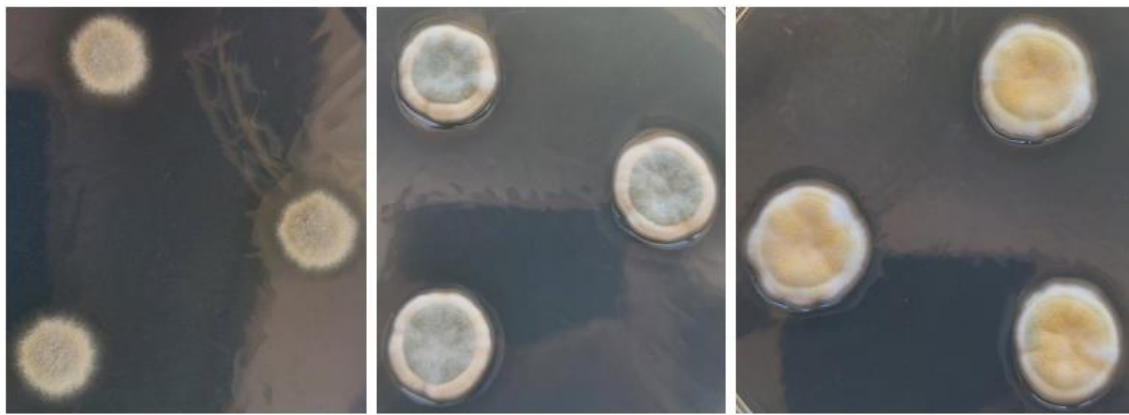
Kolonije uzgojene 7 dana na MEA agaru na 25 °C postigle su promjer 13-16 mm, uzdignute su 1-2 mm sa središnjim udubljenjem i jednom koncentričnom brazdom. Rubovi su glatki s radijalnim brazdama. Konidijalne glavice su guste, baršunaste, zelene (69) do plavkasto sive (91) boje. Njih okružuje svijetlo žuti (66) „obruč“ na koji se nastavljaju bijeli rubovi, jedan uzorak izlučivao je proziran i žućkasti (47) eksudat.

Kolonije uzgojene 7 dana na SGA agaru na 25 °C postigle su promjer 14-16 mm, uzdignute su 2 mm sa središnjim udubljenjem i prisutna je jedna koncentrična brazda. Rubovi su glatki, bijele boje s radijalnim brazdama. Konidijalne glavice su guste, baršunaste, svijetlo žute (11) ili sivo zelenkaste (71) boje, bez eksudata.

Kolonije uzgojene 7 dana na CYA agaru na 25 °C postigle su promjer 23-26 mm, uzdignute su 1-2 mm sa središnjim udubljenjem, rubovi su glatki i bijele boje. Prisutne su dvije koncentrične brazde i izvan njih radijalne brazde. Konidijalne glavice su guste, baršunaste, svijetlo žuto (11), svijetlo zelene (68 i 71) i plavkasto sivo (92) obojene. Jedan uzorak izlučivao je prozirni smeđi (44) eksudat.

Kolonije uzgojene 7 dana na CYA20 agaru na 25 °C postigle su promjer 23-26 mm, uzdignute su 2 mm sa središnjim udubljenjem. Rubovi su glatki, bijelo i bež (45 i 66) obojeni. Pojavljuje se jedna koncentrična brazda i izvan nje pojavljuju se radijalne brazde. Konidijalne glavice su guste, baršunaste, zelenkaste (67 i 71) i plavkasto sive (91) boje, bez eksudata.

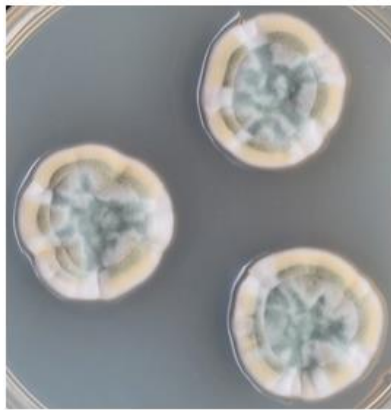
Kolonije uzgojene 7 dana na DRBC agaru na 25 °C postigle su promjer 11-13 mm, a one koje su u istim uvjetima rasle 7 dana imale su promjer 16-18 mm. Uzdignute su 2 mm sa središnjim udubljenjem, rubovi su glatki i bijele boje. Pojavljuje se jedna koncentrična brazda, izvan nje pojavljuju se radijalne brazde, a unutar nje su baršunaste konidijalne glavice zelenkaste (17 ili 72 i 91) i svijetlo žute (66) boje, bez eksudata.



DG

MEA

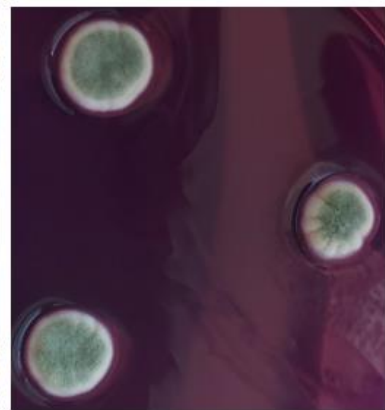
SGA



CYA



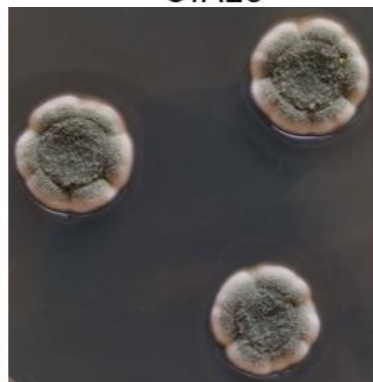
CYA20



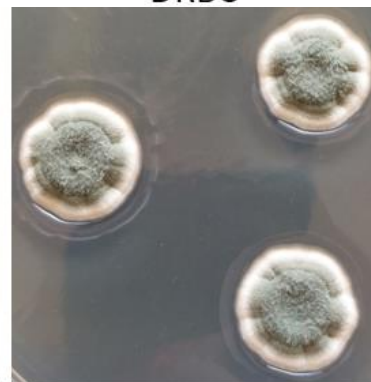
DRBC



DG



MEA



SGA



CYA



CYA20



DRBC

Slika 10. Morfologija vrste *A. tennesseensis* iz serije *Versicolores* nakon 7 dana uzgoja u tami pri 25°C

*A. venenatus* (slika 11)

Kolonije uzgojene 7 dana na DG agaru na 25 °C postigle su promjer 6-9 mm, uzdignute su 2 mm sa središnjim udubljenjem. Jedan uzorak imao je oštro ograničene rubove i bio je bež (64) boje. Drugi uzorak pjeskaste rubove i bio je svijetlo bež (45) boje. Makroskopski izgled kolonije je praškast, bez eksudata.

Kolonije uzgojene 7 dana na MEA agaru na 25 °C postigle su promjer 11-19 mm. Uzdignute su 2 mm sa središnjim udubljenjem, rubovi su glatki i bijele boje. Jedan uzorak je imao jednu koncentričnu brazdu koja je bila 1 mm odvojena od ruba, dok je drugi uzorak imao više radijalnih brazdi na rubovima i izlučivao je prozirni eksudat. Konidijalne glavice su guste i baršunaste, svijetlo žute(66) i svijetlo zelenkaste (51) boje.

Kolonije uzgojene 7 dana na SGA agaru na 25 °C postigle su promjer 8-14 mm, uzdignute su 2 mm sa središnjim udubljenjem, rubovi su glatki i bijele boje. Konidijalne glavice su guste, baršunaste, plavo zelenkaste (51) ili bijele boje, bez eksudata.

Kolonije uzgojene 7 dana na CYA agaru na 25 °C postigle su promjer 15-24 mm. Uzdignute su 2 mm sa središnjim udubljenjem, rubovi su glatki i bijele boje. Prisutna je jedna koncentrična brazda od ruba odvojena 4 mm, a izvan nje više radijalnih brazdi. Jedan uzorak bio je bijele boje, dok je drugi uzorak bio svijetlo žuto (11) i svijetlo zeleno (91) obojen, a u podlozi je imao prisutan topljivi smeđi pigment. Konidijalne glavice su guste i baršunaste u oba izolata.

Kolonije uzgojene 7 dana na CYA20 agaru na 25 °C postigle su promjer 23-26 mm, uzdignute su 2 mm sa središnjim udubljenjem. Rubovi su glatki i bijelo obojeni. U jednom uzorku pojavljuju se dvije koncentrične brazde i izvan unutarne pojavljuju se radijalne brazde, taj uzorak bio je bijele i svijetlo žute (11) boje. Drugi uzorak imao je jednu koncentričnu brazdu plavkaste (92) boje, unutar koje su konidijalne glavice bile narančaste (10 i 42) boje. Izvan nje su se nastavljale radijalne brazde, a uzorak je bio žute(11) i bijele boje. Konidijalne glavice su guste, baršunaste, bez eksudata sa crvenkasto smeđim topljivim pigmentom prisutnim u podlozi.

Kolonije uzgojene 7 dana na DRBC agaru na 25 °C postigle su promjer 7-12 mm, uzdignute su 2 mm sa središnjim udubljenjem. Rubovi su glatki i bijele boje, u jednom uzorku pojavljuje se jedna koncentrična brazda i izvan nje par radijalnih brazdi. Konidijalne glavice su baršunaste i bijele ili zelenkaste (50 i 51) boje, bez eksudata.



DG



MEA



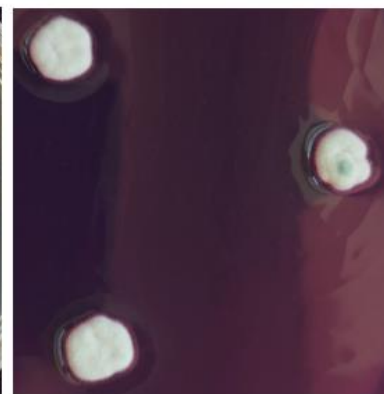
SGA



CYA



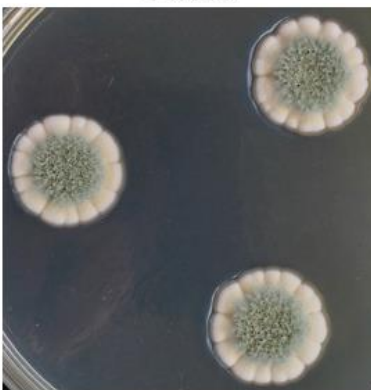
CYA20



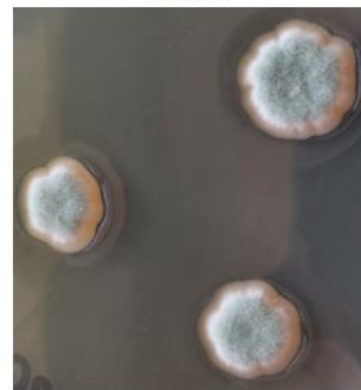
DRBC



DG



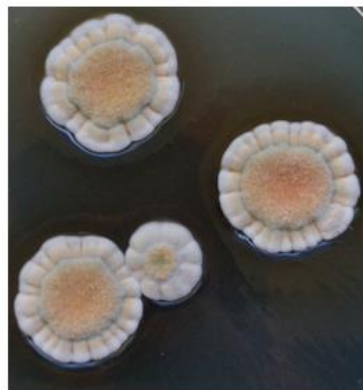
MEA



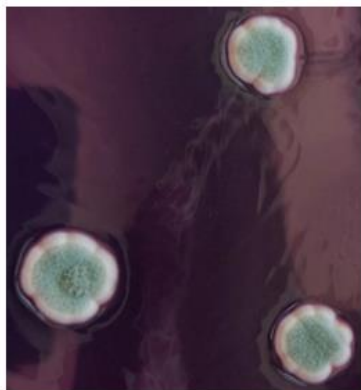
SGA



CYA



CYA20



DRBC

Slika 11. Morfologija vrste *A. venenatus* iz serije *Versicolores* nakon 7 dana uzgoja u tami pri 25°C

Tablica 1. Pomjeri zona inhibicije i referentne vrijednosti za tumačenje osjetljivosti vrsta *Aspergillus* serije *Versicolores* na antimikotike dostupne za sistemsku primjenu na Hrvatskom tržištu. Svaka vrsta nasadena je i ispitana iz dva različita uzorka, uz iznimku *A. pepii* i *A. griseoaurantiacus*.

VRSTA	AMFOTERICIN B 20µg disk		KASPOFUNGIN 5µg disk		FLUKONAZOL 100µg disk		ITRAKONAZOL 50µg disk		POSAKONAZOL 5µg disk		VORIKONAZOL 1µg disk	
	Uvjeti osjetljivosti (O) i rezistencije (R)	Izmjerena zona inhibicije	Uvjeti osjetljivosti (O) i rezistencije (R)	Izmjerena zona inhibicije	Uvjeti osjetljivosti (O) i rezistencije (R)	Izmjerena zona inhibicije	Uvjeti osjetljivosti (O) i rezistencije (R)	Izmjerena zona inhibicije	Uvjeti osjetljivosti (O) i rezistencije (R)	Izmjerena zona inhibicije	Uvjeti osjetljivosti (O) i rezistencije (R)	Izmjerena zona inhibicije
<i>A.amoenus</i>	R ≤12mm O ≥15mm	R R	R ≤13mm O ≥17mm	R R	R ≤19mm	R R	R ≤19mm	32 39	R ≤12mm O ≥17mm	42 50	R ≤13mm O ≥17mm	R R
<i>A.creber</i>	R ≤12mm O ≥15mm	R R	R ≤13mm O ≥17mm	R R	R ≤19mm	R R	R ≤19mm	R R	R ≤12mm O ≥17mm	34 42	R ≤13mm O ≥17mm	R R
<i>A.fructus</i>	R ≤12mm O ≥15mm	R R	R ≤13mm O ≥17mm	R R	R ≤19mm	R R	R ≤19mm	R 34	R ≤12mm O ≥17mm	36 41	R ≤13mm O ≥17mm	R 23
<i>A.griseoaurantiacus</i>	R ≤12mm O ≥15mm	R	R ≤13mm O ≥17mm	R	R ≤19mm	R	R ≤19mm	45	R ≤12mm O ≥17mm	57	R ≤13mm O ≥17mm	23
<i>A.jensenii</i>	R ≤12mm O ≥15mm	R R	R ≤13mm O ≥17mm	R R	R ≤19mm	R R	R ≤19mm	27 35	R ≤12mm O ≥17mm	44 49	R ≤13mm O ≥17mm	R 18
<i>A.pepii</i>	R ≤12mm O ≥15mm	R	R ≤13mm O ≥17mm	R	R ≤19mm	R	R ≤19mm	52	R ≤12mm O ≥17mm	60	R ≤13mm O ≥17mm	44

VRSTA	AMFOTERICIN B 20µg disk		KASPOFUNGIN 5µg disk		FLUKONAZOL 100µg disk		ITRAKONAZOL 50µg disk		POSAKONAZOL 5µg disk		VORIKONAZOL 1µg disk	
	Uvjeti osjetljivosti (O) i rezistencije (R)	Izmjerena zona inhibicije	Uvjeti osjetljivosti (O) i rezistencije (R)	Izmjerena zona inhibicije	Uvjeti osjetljivosti (O) i rezistencije (R)	Izmjerena zona inhibicije	Uvjeti osjetljivosti (O) i rezistencije (R)	Izmjerena zona inhibicije	Uvjeti osjetljivosti (O) i rezistencije (R)	Izmjerena zona inhibicije	Uvjeti osjetljivosti (O) i rezistencije (R)	Izmjerena zona inhibicije
<i>A. protuberus</i>	R ≤12mm O ≥15mm	R R	R ≤13mm O ≥17mm	R R	R ≤19mm	R R	R ≤19mm	R 36	R ≤12mm O ≥17mm	26 42	R ≤13mm O ≥17mm	R 30
<i>A. puulaauensis</i>	R ≤12mm O ≥15mm	R 15	R ≤13mm O ≥17mm	R R	R ≤19mm	R R	R ≤19mm	33 46	R ≤12mm O ≥17mm	43 60	R ≤13mm O ≥17mm	17 40
<i>A. sydowii</i>	R ≤12mm O ≥15mm	R R	R ≤13mm O ≥17mm	R R	R ≤19mm	R R	R ≤19mm	R 25	R ≤12mm O ≥17mm	25 36	R ≤13mm O ≥17mm	R 20
<i>A. tennesseensis</i>	R ≤12mm O ≥15mm	R R	R ≤13mm O ≥17mm	R R	R ≤19mm	R R	R ≤19mm	32 39	R ≤12mm O ≥17mm	42 50	R ≤13mm O ≥17mm	R R
<i>A. venenatus</i>	R ≤12mm O ≥15mm	R R	R ≤13mm O ≥17mm	R R	R ≤19mm	R R	R ≤19mm	28 35	R ≤12mm O ≥17mm	46 54	R ≤13mm O ≥17mm	R R

\*Oznaka R u stupcu „Izmjerena zona inhibicije“ predstavlja izostanak iste

## 5. RASPRAVA

Rezultati ovog istraživanja pokazali su da morfološko određivanje nije najsigurnija metoda za razlikovanje vrsta serije *Versicolores*, jer se uzorci iste vrste, na istoj podlozi mogu međusobno razlikovati. Također na određenim podlogama se fenotipska svojstva različitih vrsta međusobno poklapaju. Podloge koje su se pokazale najbolje za morfološko razlikovanje su DRBC, CYA i CYA20. Na podlogama DG, MEA i SGA sve su vrste međusobno pokazivale veliku sličnost bojom konidijalnih glavica i teksturom kolonija. Pojava topljivog pigmenta uglavnom je bila na CYA20 podlozi, uz poneku iznimku na CYA agaru. Također rast na CYA20 podlozi rezultirao je najvećim promjerom kolonija u svih ispitivanih vrsta, što je rezultat veće količine glukoze dostupne kao hranjive tvari, no govori i o dobroj podnošljivosti nižeg aktiviteta vode u ovoj seriji. Za korištenje morfološkog ključa potreban je rast kolonija od minimalno 7 dana, a poželjno bi bilo i 10 dana, kako bi se omogućio daljnji razvoj boje konidija, topljivog pigmenta i potencijalnog eksudata.

Ispitivanje osjetljivosti izolata na antimikotike provelo se metodom CLSI M44-A na Mueller-Hinton agaru s dodanom glukozom i metilenskim modrilom (MGM). Izmjerene zone inhibicije oko diskova protumačene su na temelju radova Espinel-Ingroff i sur., 2007 i Canton i sur., 2009.

Primjećena je rezistencija svih uzoraka na kaspofungin te bi zbog prisutnosti u cijeloj seriji ona mogla biti intrinzična. Vrlo malo se zna o rezistenciji *Aspergillus* na ehinokandine, jer se ispitivanja osjetljivosti provode rijetko i popraćena su s poteškoćama u ponovljivosti rezultata i korelaciji s kliničkim in vitro testiranjima. Također terapijski ishod liječenja aspergiloza s ehinokandinima je lošiji nego s triazolima i polienima te se oni uglavnom koriste kao dio kombinirane terapije. Posljedično je broj prijavljenih slučajeva sekundarne rezistencije mali, a mehanizam rezistencije nije potpuno utvrđen (Gonçalves i sur., 2016). U nedostatku prijavljenih slučajeva i s ciljem karakterizacije mehanizama rezistencije, u laboratoriju su 2005.godine inducirana dva tipa rezistencije kod *A. fumigatus* na kaspofungin. Prvi je bio točkaste mutacije gena *fxs1*, koji je ključan za sintezu 1,3- $\beta$ -D-glukan sintaze i rezultirao je 16 puta manjom osjetljivošću na lijek. Druga klasa spontanih mutanata svoju rezistenciju dugovala je povećanoj ekspresiji 28 različitih gena koji kodiraju sintezu strukturnih komponenti stanične stijenke, sintezu enzima odgovornih za biosintezu stanične stijenke, sintezu transportnih proteina te proteina ključnih u staničnoj signalizaciji poput



MAP kinaze (Gardiner i sur., 2005). U međuvremenu prijavljena su dodatna dva izolata *A. fumigatus* koji su rezultirali smanjenom osjetljivošću 1,3- $\beta$ -D-glukan sintaze zbog točkaste mutacije u *fxs1* genu. Prvi slučaj je klinički izolat koji je nakon terapije s mikafunginom rezultirao smanjenom osjetljivošću (reda veličine 5 do 6) na sve ehinokandine i kliničkim neuspjehom liječenja kronične plućne aspergiloze (Jiménez-Ortigosa i sur., 2017). Drugi slučaj je laboratorijski inducirana križna rezistencija na ehinokandine nakon izlaganja *A. fumigatusa* anidulafunginu (e Silva i sur., 2020). U slučaju iz 2008. godine istražen je klinički uzorak *A. fumigatusa* koji je slabo odgovarao na terapiju kaspofunginom. Otkriveno je da izolat nije imao nikakve mutacije, udio 1,3- $\beta$ -D-glukana stanične stijenke bio je isti kao u kontrolnom uzorku koji je bio osjetljiv na kaspofungin, no za razliku od kontrolnog uzorka, ovaj uzorak imao je pojačanu ekspresiju *fxs1* gena (Arendrup i sur., 2008). Bitno je napomenuti da se profil osjetljivosti vrsta na pojedinačne ehinokandine međusobno razlikuje. Primjer je vrsta *A. lentulus* koja je slabo osjetljiva na kaspofungin unatoč osjetljivosti na anidulafungin i mikafungin (Gonçalves i sur., 2016).

Postojanje samo jednog izolata *A. puulauensis*, koji je bio osjetljiv na amfotericin B u dozi od 20 $\mu$ g isključuje intrinzičku rezistenciju, no odgovara prijavljenoj smanjenoj osjetljivosti prisutnoj u vrstama *A. versicolor* i *A. sydowii* (Van Der Linden i sur., 2011; Torres-Rodríguez i sur., 1998; Siqueira i sur., 2016). U studiji provedenoj na kliničkim izolatima *Aspergillus* u Koreji, 4,4 % uzoraka pripadalo je seriji *A. versicolores*, a činili su je 5 uzoraka *A. sydowii* i jedan *A. versicolor* iz respiratornog uzorka. Svi uzorci prikazali su nisku osjetljivost na amfotericin B, uključujući pripadnike serije *A. versicolores* (Heo i sur., 2015) što je odgovaralo i rezultatima dobivenim 2022. godine korištenjem E-testa i disk-difuzijske metode (Lo Cascio i sur., 2022). Također u istraživanju iz 2002.godine na kliničkim izolatima s područja SAD-a i Kanade, svih 9 uzoraka *A. versicolor* (zbog neutvrđene identifikacije i filogenetskih odnosa nije sigurno da se radi o vrsti *A. versicolor*, no sigurno se radi o plijesnima iz serije *Versicolores*) pokazalo je slabu osjetljivost na amfotericin B (Pfaller i sur., 2002). Dodatan dokaz su izolati prikupljeni sa svinjske farme, gdje su oba izolata *A. versicolores* bila rezistentna (White i sur., 2021). Točan mehanizam rezistencije nije utvrđen, no mogući načini su smanjena apsorpcija antimikotika, pojačana ekspresija efluksnih pumpi za AMB, smanjen sadržaj ergosterola u citoplazmatskoj membrani i/ili povećana aktivnost katalaze koja je odgovorna za smanjenje oksidativnog stresa uzrokovanog AMB-om u stanici. Intrinzično otporna vrsta *A. terreus* svoju rezistenciju na AMB duguje povećanoj aktivnosti katalaze, no u studiji na *A. fumigatus* povećana aktivnost katalaze nije

imala pozitivnu korelaciju s porastom MIK-a na ispitivani rezistentnim sojevima, no njena prisutnost je u svima uzorcima bila visoka te se njen doprinos na rezistenciju ne može isključiti. U istom istraživanju potvrđeno je da bi rezistencija na poliene mogla biti geografski bazirana jer je s testiranog područja 96,4 % testiranih izolata bilo rezistentno, neovisno o mjestu uzorkovanja. Rezistencija se nije mogla povezati s izloženošću polienima jer su klinički uzroci bili uzorkovani na pacijentima koji nisu prethodno bili na terapiji polienima, a okolišni uzorci su bili uzorkovani na farmama koje nisu koristile polienske antifungike. U ovom istraživanju vrijednost MIK-a > 2 mg/L definirala se kao rezistencija soja (Ashu i sur., 2018).

Osjetljivost na triazolne antimikotike bila je različita ovisno o soju i vrsti antimikotika. Svi uzorci bili su rezistentni na flukonazol, što odgovara podacima o intrinzičnoj rezistenciji *Aspergillus* spp. i *A. versicolor* na flukonazol (Katzung, 2018; Azevedo i sur., 2015; Stensvold i sur., 2012; Torres-Rodríguez i sur., 1998). U ispitivanim uzorcima najučinkovitiji triazolni antimikotik bio je posakonazol na kojeg su svi uzorci bili osjetljivi i imali najveći promjer zone inhibicije. Sljedeći po učinkovitosti bio je itraconazol s rezistencijom prisutnom u 25% testiranih uzoraka, dok je rezistencija na vorikonazol bila prisutna u 60% testiranih uzoraka. Također primijećen je manji promjer zone inhibicije na posakonazol ako je uzorak bio rezistentan na itraconazol te su svi uzorci rezistentni na itraconazol u dozi od 50 µg također bili rezistentni na vorikonazol u dozi od 1µg, no suprotno nije vrijedilo. Budući da su svi uzorci koji su testirani s antimikoticima uzorkovani iz okoliša, primijećena rezistencija na azole ne može se pripisati kliničkoj upotrebi azola, već selektivnom pritisku azolnih antimikotika prisutnih u okolišu zbog upotrebe azolnih fungicida u poljoprivredi. Naime azoli su vrlo stabilne molekule, koje mogu ostati aktivne u tlu i vodi nekoliko mjeseci jer im je vrijeme poluraspada obično dulje od godinu dana (Azevedo i sur., 2015). Također svi azolni lijekovi međusobno ciljaju isto aktivno mjesto u gljivičnom enzimu te razvoj rezistencije na poljoprivredne azole rezultira rezistencijom na medicinske azole (Bowyer i Denning, 2014; Alvarez-Moreno i sur., 2019). Mehanizam rezistencije na azole temelji se na mutaciji u genu *cyp51A*, koji kodira lanosterol 14 $\alpha$ -demetilazu, ključan enzim u sintezi ergosterola (Mortensen i sur., 2010 ). U vrsti *A. fumigatus* dokazana su dva obrasca otpornosti, prvi se povezuje s dugotrajnom terapijom azolima u pacijenata oboljelih od aspergiloma ili kronične plućne aspergiloze. Dugotrajna terapija itraconazolom rezultirala je točkastom mutacijom u genu *cyp51A* i povećanjem MIK-a za itraconazol i posakonazol na ispitivanim uzorcima (Tashiro i sur., 2012). Drugi pronađeni tip rezistencije bio je rezultat pojave tandemskog

ponavljanja od 34bp u promotoru gena, koji djeluje kao pojačivač transkripcije i zamijene jedne aminokiseline u aktivnom mjestu enzima. Ovakva polialelna rezistencija (TR/L98H) mogla se razviti samo u okolišu kroz izlaganje fungicidima jer se umetanje tandemskog ponavljanja od 34bp lakše može dogoditi u slučaju spolnog razmnožavanja plijesni, dok je unutar ljudskog organizma reprodukcija *A. fumigatusa* primarno aseksualna (Verweij i sur., 2009). Ovu hipotezu potvrdio je pronalazak mutacije TR34/L98H u kliničkim izolatima rezistentnim na azole i izolatima pronađenim u okolišu, u gradskim i bolničkim okruženjima te poljoprivrednim okruženjima u Nizozemskoj, Danskoj, Austriji i Španjolskoj (Mortesen i sur., 2010). Dodatan dokaz je da su izolati TR34/L98H otporni na 5 triazolnih fungicida (propikonazol, bromukonazol, epoksikonazol, difenokonazol i tebulkonazol) koji su molekularnom strukturom slični medicinskim azolima te da tebukonazol u laboratorijskim uvjetima može inducirati tandemsku ponavljanja u promotorskoj regiji *cyp51A* (Stensvold i sur., 2012; Bowyer i Denning, 2014). U istraživanju provedenom na povrtnim usjevima tretiranim azolnim fungicidima u Kolumbiji, pronađeni su uzorci *A. fumigatusa* s nekoliko različitih promjena u promotorskoj regiji gena *cyp51A*. Pronađena tandemsku ponavljanja uključuju i TR34/L98H mutaciju, koja predstavlja dominantan mehanizam otpornosti u Europi i Aziji. Dodatna potvrda teze je što nije pronađena ni jedna točkasta mutacija u genu *cyp51A* kakva je otkrivena u kliničkim uzorcima nakon izloženosti terapije azolima (Alvarez-Moreno i sur., 2019). U Francuskoj je 8% pacijenata s cističnom fibrozom imalo rezistentne izolate *A. fumigatusa*, od kojih je 50% nosilo mutaciju TR34/L98H. U svjetskom istraživanju iz 2008. i 2009. godine sudjelovala su 62 medicinska centra, a najviše otpornih izolata (80% TR34/L98H) bilo je iz Hangzhoua u Kini. Pacijenti zaraženi izolatom rezistentnim na više azola TR34/L98H imaju smrtnost od 88%, za razliku od onih zaraženih osjetljivim izolatima kod kojih je smrtnost 30-50% (Bowyer i Denning, 2014).

## 6. ZAKLJUČAK

Na temelju ispitivanja morfoloških karakteristika nasađivanjem na različite podloge može se zaključiti sljedeće:

- Sve ispitane vrste aspergila iz serije *Versicolores* dobro podnose smanjen aktivitet vode u podlozi
- Potrebno je barem 7 dana rasta kolonija za morfološku karakterizaciju i očitavanje vrste iz serije *Versicolores*
- Podloge koje omogućuju najbolju diferencijaciju među vrstama te bi se mogle koristiti u fenotipskoj identifikaciji su: CYA, CYA20 i DRBC

Morfološki ključ za prepoznavanje serije *Versicolores* razvijen u sklopu ovog diplomskog rada bit će od značajne vrijednosti za daljnje očitavanje rezultata fenotipskom metodom.

Testiranje osjetljivosti na antifungalne lijekove neophodno je za optimalno liječenje ali i za otkrivanje moguće rezistencije. Iz provedenog istraživanja osjetljivosti izolata serije *Versicolores* može se zaključiti da bi liječenje potencijalne mikoze ili aspergiloze uzrokovane njima bilo uspješno jedino u slučaju terapije posakonazolom ili itrakonazolom. Terapija amfotericinom B, kaspofunginom ili flukonazolom bila bi neuspješna te rezultirala samo potencijalnim nuspojavama u pacijenta. Zbog smanjene količine lijekova dostupnih za terapiju bolesti uzrokovanih serijom *Versicolores* nužno je sprječavanje zaraze, posebice imunokompromitiranih osoba, koje bi zbog svog infestiranog doma ili radnog mjesta (škola, farma...) mogli biti izloženi konidijama. Također trend pojave rezistencije prisutan je u ispitanim izolatima i to primarno na vorikonazol i itrakonazol. Pojava rezistencije upozorava na potrebu za racionalnom upotrebom azolnih fungicida i medicinskih triazola.

## 7. LITERATURA

- Agarwal R, Chakrabarti A. Clinical Manifestations and Natural History of Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis. *Aspergillosis: from Diagnosis to Prevention*, 2009, Springer, 2009.
- Alvarez-Moreno C, Lavergne RA, Hagen F, Morio F, Meis JF, Le Pape P. Fungicide-driven alterations in azole-resistant *Aspergillus fumigatus* are related to vegetable crops in Colombia, South America. *Mycologia*, 2019, 111, 217-224.
- Arendrup MC, Perkhofer S, Howard SJ, Garcia-Effron G, Vishukumar A, Perlin D, Lass-Flörl C. Establishing in vitro-in vivo correlations for *Aspergillus fumigatus*: the challenge of azoles versus echinocandins. *Antimicrob Agents Chemother*, 2008, 52, 3504-3511.
- Ashu EE, Korfanty GA, Samarasinghe H, Pum N, You M, Yamamura D, Xu J. Widespread amphotericin B-resistant strains of *Aspergillus fumigatus* in Hamilton, Canada. *Infect Drug Resist*, 2018, 1549-1555.
- Azevedo MM, Faria-Ramos I, Cruz LC, Pina-Vaz C, Goncalves Rodrigues A. Genesis of azole antifungal resistance from agriculture to clinical settings. *J Agric Food Chem*, 2015, 63(34), 7463-7468.
- Baker SE, Bennett JW. An overview of the genus *Aspergillus*. U: *The Aspergilli: Genomics, medical aspects, biotechnology, and research methods*. Goldman GH, Osmani SA, urednici, Boca Raton, CRC Press, 2007, str. 3-13.
- Berkow EL, Lockhart SR, Ostrosky-Zeichner L. Antifungal susceptibility testing: current approaches. *Clin Microbiol Rev*, 2020, 33, e00069-19.
- Bifrare YD, Wolfensberger TJ. Protracted *Aspergillus versicolor* endophthalmitis caused by corneal microperforation. *Klin Monatsbl Augenheilkd*, 2007, 224, 314-316.
- Borsa BA, Ozgun G, Houbraken J, Okmen F. The first case of persistent vaginitis due to *Aspergillus protuberus* in an immunocompetent patient. *Mikrobiyol Bul*, 2015, 49, 130-134.
- Bowyer P, Denning DW. Environmental fungicides and triazole resistance in *Aspergillus*. *Pest Manag Sci*, 2014, 70, 173-178.
- Cantón E, Espinel-Ingroff A, Pemán J. Trends in antifungal susceptibility testing using CLSI reference and commercial methods. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2009, 7, 107-119.
- Carolus H, Pierson S, Lagrou K, Van Dijck P. Amphotericin B and other polyenes-discovery, clinical use, mode of action and drug resistance. *J Fungi*, 2020, 6, 321.
- Charles MP, Noyal MJ, Easow JM, Ravishankar M. Invasive pulmonary aspergillosis caused by *Aspergillus versicolor* in a patient on mechanical ventilation. *Australas Medical J*, 2011, 4, 632-634.

Chen AJ, Frisvad JC, Sun BD, Varga J, Kocsubé S, Dijksterhuis J, Kim DH, Hong S-B, Houbraken J, Samson RA. *Aspergillus* section *Nidulantes* (formerly *Emericella*): Polyphasic taxonomy, chemistry and biology. *Studi Mycol*, 2016, 84, 1-118.

Chen SCA, Slavin MA, Sorrell TC. Echinocandin Antifungal Drugs in Fungal Infections. *Drugs*, 2011, 71, 11–41.

Denning DW. Echinocandin antifungal drugs. *The Lancet*, 2003, 362, 1142–1151.

Dismukes WE. Introduction to Antifungal Drugs. *Clin Infect Dis*, 2000, 30, 653–657.

Engelhart S, Looock A, Skutlsrek D, Sagunski H, Lommel A, Färber H, Exner M. Occurrence of toxigenic *Aspergillus versicolor* isolates and sterigmatocystin in carpet dust from damp indoor environments. *Appl Environ Microbiol*, 2002, 68, 3886–3890.

e Silva AP, Miranda IM, Branco J, Oliveira P, Faria-Ramos I, Silva RM, Rodrigues AG, Costa-de-Oliveira S. FKS1 mutation associated with decreased echinocandin susceptibility of *Aspergillus fumigatus* following anidulafungin exposure. *Sci Rep*, 2020, 10, 11976.

Gardiner RE, Souteropoulos P, Park S, Perlin DS. Characterization of *Aspergillus fumigatus* mutants with reduced susceptibility to caspofungin. *Med Mycol*, 2005, 43, 299-305.

Géry A, Séguin V, Eldin de Pécoulas P, Bonhomme J, Garon D. *Aspergilli* series *Versicolores*: importance of species identification in the clinical setting. *Crit Rev Microbiol*, 2022, 1-14.

Ghaffarianhoseini A, AlWaer H, Omrany H, Ghaffarianhoseini A, Alalouch C, Clements-Croome D, Tookey J. Sick building syndrome: are we doing enough? *Archit Sci Rev*, 2018, 61, 99-121.

Gonçalves SS, Souza ACR, Chowdhary A, Meis JF, Colombo AL. Epidemiology and molecular mechanisms of antifungal resistance in *Candida* and *Aspergillus*. *Mycoses*, 2016, 59, 198-219.

Heo MS, Shin JH, Choi MJ, Park YJ, Lee HS, Koo SH, Lee WG, Kim SH, Shin MG, Suh SP, Ryang DW. Molecular identification and amphotericin B susceptibility testing of clinical isolates of *Aspergillus* from 11 hospitals in Korea. *Ann Lab Med*, 2015, 35, 602-610.

Hiemenz JW, Raad II, Maertens JA, Hachem RY, Saah AJ, Sable CA, Chodakewitz JA, Severino ME, Saddier P, Berman RS, Ryan DM, DiNubile MJ, Patterson TF, Dennind DW, Walsh TJ. Efficacy of caspofungin as salvage therapy for invasive aspergillosis compared to standard therapy in a historical cohort. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2010, 29, 1387–1394.

Houbraken J, Kocsubé S, Visagie CM, Yilmaz N, Wang XC, Meijer M, Kraak M, Hubka V, Bensch K, Samson RA, Frisvad JC. Classification of *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces* and related genera (Eurotiales): An overview of families, genera, subgenera, sections, series and species. *Stud Mycol*, 2020, 95, 5-169.

Houš J, Spižek J, Havlíček V. Antifungal Drugs. *Metabolites*, 2020, 10, 106.

Jakšić D, Jelić D, Kopjar N, Šegvić Klarić M. Combined toxicity of the most common indoor Aspergilli. *Pathogens*, 2023, 12, 459.

Jakšić Despot D, Kocsubé S, Bencsik O, Kecskeméti A, Szekeres A, Vágvölgyi C, Varga J, Šegvić Klarić M. New sterigmatocystin-producing species of *Aspergillus* section *Versicolores* from indoor air in Croatia. *MycolProg*, 2016, 16, 63-72.

Jakšić Despot D, Kocsubé S, Bencsik O, Kecskeméti A, Szekeres A, Vágvölgyi C, Varga J, Šegvić Klarić M. Species diversity and cytotoxic potency of airborne sterigmatocystin-producing Aspergilli from the section *Versicolores*. *Sci Total Environ*, 2016, 562, 296-304.

Jakšić D, Puel O, Canlet C, Kopjar N, Kosalec I, Šegvić Klarić M. Cytotoxicity and genotoxicity of versicolorins and 5-methoxysterigmatocystin in A549 cells. *Arch Toxicol*, 2012, 86, 1583-1591.

Jakšić D, Sertić M, Kifer D, Kocsube S, Mornar Turk A, Nigović B, Šarkanj B, Krska R, Sulyok M, Šegvić Klarić M. Fungi and their secondary metabolites in water-damaged indoors after a major flood event in eastern Croatia. *Indoor Air*, 2021, 31, 730-744.

Jiménez-Ortigosa C, Moore C, Denning DW, Perlin DS. Emergence of echinocandin resistance due to a point mutation in the *fkp1* gene of *Aspergillus fumigatus* in a patient with chronic pulmonary aspergillosis. *Antimicrob Agents Chemother*, 2017, 61, e01277-17.

Jurjević Ž, Peterson SW, Horn BW. Aspergillus section *Versicolores*: nine new species and multilocus DNA sequence based phylogeny. *IMA Fungus*, 2012, 3, 59-79.

Jurjević Ž, Peterson SW, Solfrizzo M, Peraica M. Sterigmatocystin production by nine newly described *Aspergillus* species in section *Versicolores* grown on two different media. *Mycotoxin Res*, 2013, 29, 141-145.

Jussila J, Komulainen H, Kosma VM, Nevalainen A, Pelkonen J, Hirvonen MR. Spores of *Aspergillus versicolor* isolated from indoor air of a moisture-damaged building provoke acute inflammation in mouse lungs. *InhalToxicol*, 2002, 14, 1261-1277.

Kalenić S, Abram M, Batinić D, Beader N, Bedenić B, Bošnjak Z, Budimir A, Drenjančević D, Katalinić-Janković V, Lukić-Grlić A, Ljubin-Sternak S, Mareković I, Mlinarić-Galinović G, Mlinarić-Missoni E, Orlović M, Plečko V, Presečki-Stanko A, Presečki V, Punda-Polić V, Rukavina T, Sviben M, Tabain I, Tambić-Andrašević A, Tićac B, Vilibić Čavlek T, Vraneš J, Vuković D, Žmak Lj. Medicinska mikrobiologija. Zagreb, Medicinska naklada, 2013, str. 561-565.

Katzung BG. Basic & Clinical Pharmacology. New York, McGraw Hill Education, 2018, str. 853-862.

Krijgsheld P, Bleichrodt R, van Veluw GJ, Wang F, Müller WH, Dijksterhuis J, Wösten HAB. Development in *Aspergillus*. *Stud Mycol*, 2013, 74, 1-29.

Fischer R, Kües U. Asexual sporulation in mycelial fungi. U: The mycota. Esser K, urednik, Berlin, Springer, 1994, str. 266.

- Lo Cascio G, Bazaj A, Trovato L, Sanna S, Andreoni S, Blasi E, Conte M, Fazii P, Oliva E, Lepera V, Lombardi G, Farina C. Multicenter Italian study on “In Vitro Activities” of isavuconazole, voriconazole, amphotericin b, and caspofungin for *Aspergillus* species: Comparison between Sensititre™ YeastOne™ and MIC test strip. *Infect Drug Resist*, 2022, 5839-5848.
- Maertens J. History of the development of azole derivatives. *Clin Microbiol Infect*, 2004, 10, 1–10.
- Meyer V, Wu B, Ram AFJ. *Aspergillus* as a multi-purpose cell factory: current status and perspectives. *Biotechnol Lett*, 2011, 33, 469–476.
- Mortensen KL, Mellado E, Lass-Flörl C, Rodriguez-Tudela JL, Johansen HK, Arendrup MC. Environmental study of azole-resistant *Aspergillus fumigatus* and other aspergilli in Austria, Denmark, and Spain. *Antimicrob Agents Chemother*, 2010, 54, 4545-4549.
- Nami S, Aghebati-Maleki A, Morovati H, Aghebati-Maleki L. Current antifungal drugs and immunotherapeutic approaches as promising strategies to treatment of fungal diseases. *Biomed Pharmacother*, 2019, 110, 857-868.
- Novey HS. Epidemiology of allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Immunol Allergy Clin North Am*, 1998, 18, 641–653.
- Parody R, Martino R, Sánchez F, Subirá M, Hidalgo A, Sierra J. Predicting survival in adults with invasive aspergillosis during therapy for hematological malignancies or after hematopoietic stem cell transplantation: Single-center analysis and validation of the Seattle, French, and Strasbourg prognostic indexes. *Am J Hematol*, 2009, 84, 571–578.
- Perfect J. The antifungal pipeline: a reality check. *Nat Rev Drug Discov*, 2017, 16, 603–616.
- Perlin DS. Mechanisms of echinocandin antifungal drug resistance. *Ann N Y Acad Sci*, 2015, 1354, 1–11.
- Perri P, Campa C, Incorvaia C, Parmeggiani F, Lamberti G, Costagliola C, Sebastiani A. Endogenous *Aspergillus versicolor* Endophthalmitis in an Immuno-competent HIV-positive Patient. *Mycopathologia*, 2005, 160, 259–261.
- Peterson SW. Phylogenetic analysis of *Aspergillus* species using DNA sequences from four loci. *Mycologia*, 2008, 100, 205-226
- Peyton LR, Gallagher S, Hashemzadeh M. Triazole antifungals: a review. *Drugs Today*, 2015, 51, 705-718.
- Pfaller MA, Messer SA, Hollis RJ, Jones RN. Antifungal activities of posaconazole, ravuconazole, and voriconazole compared to those of itraconazole and amphotericin B against 239 clinical isolates of *Aspergillus* spp. and other filamentous fungi: report from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 2000. *Antimicrob Agents Chemother*, 2002, 46, 1032-1037.
- Rayner, RW. A mycological colour chart. Kew, Commonwealth Mycological Institute, 1970.



- Rhame FS. Prevention of nosocomial aspergillosis. *J Hosp Infect*, 1991, 18, 466-472.
- Rozaliyani A, Rosianawati H, Handayani D, Agustin H, Zaini J, Syam R, Adawiyah R, Tugiran M, Setianingrum F, Burhan E, Kosmidis C, Wahyuningsih R. Chronic pulmonary aspergillosis in post tuberculosis patients in Indonesia and the role of LDBio *Aspergillus* ICT as part of the diagnosis scheme. *J Fungi*, 2020, 6, 318.
- Ruchlemer R, Yinnon AM, Hershko C. Changes in the natural history of invasive pulmonary aspergillosis in neutropenic leukemic patients. *Isr J Med Sci*, 1996, 32, 1089-1092.
- Schwab CJ, Straus DC. The roles of *Penicillium* and *Aspergillus* in Sick building syndrome. *Adv Appl Microbiol*, 2004, 55, 215-240.
- Sheehan DJ, Brown SD, Pfaller MA, Warnock DW, Rex JH, Chaturvedi V, Espinel-Ingroff A, Ghannoum MA, Moore LS, Odds Fc, Rinaldi MG, Walsh TJ. Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts; Approved guideline. NCCLS document M44-A. Wayne, NCCLS, 2004.
- Siqueira JPZ, Sutton DA, García D, Gené, J, Thomson P, Wiederhold N, Guarro, J. Species diversity of *Aspergillus* section *Versicolores* in clinical samples and antifungal susceptibility. *Fungal Biol*, 2016, 120, 1458-1467.
- Stensvold CR, Jørgensen LN, Arendrup MC. Azole-resistant invasive aspergillosis: Relationship to agriculture. *Curr Fungal Infect Rep*, 2012, 6, 178–191.
- Sub-Committee of the Scientific Advisory Committee. National guidelines for the prevention of nosocomial invasive aspergillosis during construction/renovation activities. NDCC, 2002.
- Swain SK, Debta P, Sahu MC, Mohanty JN. Otomycosis due to *Aspergillus versicolor*. *Int J Health Allied Sci*, 2020, 9, 192-194.
- Tashiro M, Izumikawa K, Hirano K, Ide S, Mihara T, Hosogaya N, Takazono T, Morinaga Y, Nakamura S, Kurihara S, Imamura Y, Miyazaki T, Nishino T, Tsukamoto M, Kakeya H, Yamamoto Y, Yanagihara K, Yasuoka A, Tashiro T, Kohno S. Correlation between triazole treatment history and susceptibility in clinically isolated *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2012, 56, 4870-4875.
- Torres-Rodríguez JM, Madrenys-Brunet N, Siddat M, López-Jodra O, Jimenez T. *Aspergillus versicolor* as cause of onychomycosis: report of 12 cases and susceptibility testing to antifungal drugs. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 1998, 11, 25-31
- Tsang CC, Hui TW, Lee KC, Chen JH, Ngan AH, Tam EW, Chan JFW, Wu AL, Cheung M, Tse BPH, Wu AKL, Lai CKC, Tsang DNC, Que TL, Lam CW, Yuen KY, Lau SKP, Woo PCY. Genetic diversity of *Aspergillus* species isolated from onychomycosis and *Aspergillus hongkongensis* sp. nov., with implications to antifungal susceptibility testing. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2016, 84, 125-134.
- Valluri S, Moorthy RS, Liggett PE, Rao NA. Endogenous *Aspergillus* endophthalmitis in an immunocompetent individual. *Int Ophthalmol*, 1993, 17, 131 –135.

Van Daele R, Spriet I, Wauters J, Maertens J, Mercier T, Van Hecke S, Brüggemann R. Antifungal drugs: What brings the future?. *Med Mycol*, 2019, 57, 328–343.

Van Der Linden JW, Warris A, Verweij PE. *Aspergillus* species intrinsically resistant to antifungal agents. *Med Mycol*, 2011, 49, S82-S89.

Vandewoude KH, Blot SI, Depuydt P, Benoit D, Temmerman W, Colardyn F, Vogelaers. Clinical relevance of *Aspergillus* isolation from respiratory tract samples in critically ill patients. *Crit Care*, 2006, 10, R31.

Varga J, Samson RA. *Aspergillus* in the genomic era. Wageningen Academic Publishers , 2008, str. 7.

Verweij PE, Snelders E, Kema GH, Mellado E, Melchers WJ. Azole resistance in *Aspergillus fumigatus*: a side-effect of environmental fungicide use?. *Lancet Infect Dis*, 2009, 9, 789-795.

Wang XC, Zhuang WY. New species of *Aspergillus* (Aspergillaceae) from tropical islands of China. *J Fungi*, 2022, 8, 225.

White JK, Nielsen JL, Poulsen JS, Madsen AM. Antifungal resistance in isolates of aspergillus from a pig farm. *Atmosphere*, 2021, 12, 826.

Zhang S, Corapi W, Quist E, Griffin S, Zhang M. *Aspergillus versicolor*, a new causative agent of canine disseminated aspergillosis. *J Clin Microbiol*, 2012, 50, 187-191.

## 8. SAŽETAK

Izloženost konidijama iz roda *Aspergillus* serije *Versicolores* povezana je sa brojnim patološkim problemima poput sindroma bolesne zgrade, plućne aspergiloze, otomikoza, endoftalmitisa, onihomikoza te raznih drugih prijavljivanih infekcija. One se uglavnom pojavljuju u imunokompromitiranih osoba, no prijavljeni su i slučajevi imunokompetentnih osoba i životinja kod kojih je zaraza rezultirala infekcijom. Povećanje broja starije populacije, koja je također pod povišenim rizikom od pobola te osoba koje su na terapiji kortikosteroidima i imunosupresivima povećava broj osoba kod kojih bi izloženost odnosno udisanje konidija roda *Aspergillus* moglo rezultirati najtežim oblikom infekcije, plućnom aspergilozom. Prisutnost serije *Versicolores* u zraku i prašini domova i škola na području Hrvatske te povećana učestalost prijavljivanih infekcija uzrokovanih njima, potiče pitanje sigurnosti izloženih stanovnika. Vrste roda *Aspergillus*, koje se često pojavljuju kao uzročnici oportunističkih mikoza (npr. *A. flavus* i *A. fumigatus*), pokazuju visoki stupanj rezistencije na antimikotike. S obzirom da su vrste serije *Versicolores* dominantni aspergili unutarnjeg prostora, posebice u vlažnim uvjetima, postavlja se pitanje njihove uloge u nastanku oportunističkih mikoza kao i osjetljivosti na antimikotike, o čemu ima vrlo malo podataka u znanstvenoj literaturi. Stoga su ciljevi ovog rada bili: 1) oblikovati “in-house” ključ za determinaciju vrsta serije *Versicolores* na temelju morfologije kolonija u različitim uvjetima što može olakšati identifikacijski postupak; 2) ispitati osjetljivost izolata iz unutarnjih prostora Hrvatske na antimikotike koji se primjenjuju u sistemskim mikozama. U sklopu ispitivanja morfoloških karakteristika kolonije su uzgajane 7 dana u tami na 6 različitih hranjivih podloga (CYA, CYA20, DG-18, DRBC, MEA i SGA) te je razvijen je morfološki ključ za prepoznavanje vrsta iz serije *Versicolores*. Sve ispitane vrste aspergila iz serije *Versicolores* dobro podnose smanjen aktivitet vode u podlozi. Potrebno je najmanje 7 dana rasta kolonija za morfološku karakterizaciju i očitavanje vrste iz serije *Versicolores*. Podloge koje omogućuju najbolju diferencijaciju među vrstama te bi se mogle koristiti u fenotipskoj identifikaciji su: CYA, CYA20 i DRBC. Ispitivanje osjetljivosti serije na antimikotike provedeno je disk-difuzijskom metodom na prilagođenom Mueller-Hinton agaru s dodanom glukozom i metilenskim modrilom. Dobiveni rezultati su u skladu s postojećim podacima o rezistenciji vrsta iz roda *Aspergillus*. Utvrđena je rezistencija svih vrsta na kaspofungin te su predloženi mogući mehanizmi rezistencije. Prijavljena je gotovo poptuna rezistencija serije na amfotericin B, koja bi mogla biti regionalno prisutna i potvrđena je intrinzična rezistencija na flukonazol. Osjetljivost na ostale triazolne antimikotike bila je raznovrsna, a primijećen je

trend pojave rezistencije na vorikonazol i itrakonazol. Najveću učinkovitost imao je posakonazol sa osjetljivošću svih ispitanih izolata, zatim itrakonazol sa samo 5 rezistentnih izolata od 20 ispitanih, dok je najslabiju učinkovitost imao vorikonazol sa 12 rezistentnih izolata na 20 ispitanih.

## SUMMARY

Exposure to conidia from the *Aspergillus Versicolores* series is associated with numerous pathological problems such as sick building syndrome, pulmonary aspergillosis, otomycosis, endophthalmitis, onychomycosis and various other reported infections. They mainly appear in immunocompromised people, but cases of immunocompetent people and animals in which the exposure resulted in an infection have also been reported. The increase in the number of elderly population and people who are on corticosteroid and immunosuppressive therapy, increases the number of people in whom exposure or inhalation of *Aspergillus* spp. conidia could result in the most severe form of an infection, pulmonary aspergillosis. The presence of the *Versicolores* series in the air and dust of homes and schools in Croatia and the increased frequency of reported infections caused by them, raises a question of safety for the exposed residents. Species of the genus *Aspergillus*, which often appear as causative agents of opportunistic mycoses (e.g., *A. flavus* and *A. fumigatus*), show a high degree of resistance to antifungals. Given that species of the *Versicolores* series are dominant indoor aspergilli, especially in humid conditions, the question of their role in the occurrence of opportunistic mycoses and their sensitivity to antimycotics arises, about which there is very little information in previous literature. Therefore, the goals of this research were: 1) to create an "in-house" key for the determination of the species belonging to *Versicolores* series based on the morphology of the colonies in different conditions, which can facilitate the identification process; 2) to test the susceptibility of the isolates present in indoor environment in Croatia to antifungal drugs used in treating systemic mycoses. As a part of the morphological characteristics examination, the colonies were grown for 7 days in the dark and on 6 different media (CYA, CYA20, DG-18, DRBC, MEA and SGA). As a result, a morphological key was developed to identify species from the *Versicolores* series. All tested types of aspergilli from the *Versicolores* series tolerate reduced water activity in the substrate well. A minimum of 7 days of colony growth is required for morphological characterization and identification of species from the *Versicolores* series. The best suited media for differentiation between species and for potential use in phenotypic identification are CYA, CYA20 and DRBC. Antifungal susceptibility test was performed by disc-diffusion method on modified Mueller-Hinton agar with added glucose and methylene blue dye. The obtained results correspond with the existing data on the resistance of species from the genus *Aspergillus*. Resistance of all species to caspofungin was determined and possible mechanisms of resistance were proposed. Resistance to amphotericin B was present in almost all tested species, which could

be regionally present. Intrinsic resistance to fluconazole has been confirmed. Susceptibility to other triazole antifungals varied and a trend of resistance to voriconazole and itraconazole was observed. Posaconazole was the most effective with all tested isolates being susceptible, followed by itraconazole with only 5 resistant isolates out of 20 tested. Least effective was voriconazole with 12 resistant isolates out of 20 subjects.

# Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Zavod za Mikrobiologiju  
Ul. kneza Domagoja 2, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

## REZISTENCIJA VRSTA RODA *ASPERGILLUS* SERIJE *VERSICOLORS* NA ANTIMIKOTIKE

Agneza Rukavina

### SAŽETAK

Vrste roda *Aspergillus*, koje se često pojavljuju kao uzročnici oportunističkih mikoza (npr. *A. flavus* i *A. fumigatus*), pokazuju visoki stupanj rezistencije na antimikotike. S obzirom da su vrste serije *Versicolores* dominantni aspergili unutarnjeg prostora, posebice u vlažnim uvjetima, postavlja se pitanje njihove uloge u nastanku oportunističkih mikoza i osjetljivosti na antimikotike, o čemu ima vrlo malo podataka u znanstvenoj literaturi. Stoga su ciljevi ovog rada bili: 1) oblikovati "in-house" ključ za determinaciju vrsta serije *Versicolores* na temelju morfologije kolonija u različitim uvjetima što može olakšati identifikacijski postupak; 2) ispitati osjetljivost izolata iz unutarnjih prostora Hrvatske na antimikotike koji se primjenjuju u sistemskim mikozama. U sklopu ispitivanja morfoloških karakteristika kolonije su uzgajane 7 dana u tami na 6 različitih hranjivih podloga (CYA, CYA20, DG-18, DRBC, MEA i SGA) te je razvijen je morfološki ključ za prepoznavanje vrsta iz serije *Versicolores*. Sve ispitane vrste aspergila iz serije *Versicolores* dobro podnose smanjen aktivitet vode u podlozi. Potrebno je najmanje 7 dana rasta kolonija za morfološku karakterizaciju i očitavanje vrste iz serije *Versicolores*. Podloge koje omogućuju najbolju diferencijaciju među vrstama te bi se mogle koristiti u fenotipskoj identifikaciji su: CYA, CYA20 i DRBC. Ispitivanje osjetljivosti serije na antimikotike provedeno je disk-difuzijskom metodom na prilagođenom Mueller-Hinton agaru s dodanom glukozom i metilenskim modrilom. Dobiveni rezultati su u skladu s postojećim podatcima o rezistenciji vrsta iz roda *Aspergillus*. Utvrđena je rezistencija svih vrsta na kaspofungin te su predloženi mogući mehanizmi rezistencije. Prijavljena je gotovo poptuna rezistencija serije na amfotericin B, koja bi mogla biti regionalno prisutna i potvrđena je intrinzična rezistencija na flukonazol. Osjetljivost na ostale triazolne antimikotike bila je raznovrsna, a primijećen je trend pojave rezistencije na vorikonazol i itrakonazol. Najveću učinkovitost imao je posakonazol sa osjetljivošću svih ispitanih izolata, zatim itrakonazol sa samo 5 rezistentnih izolata od 20 ispitanih, dok je najslabiju učinkovitost imao vorikonazol sa 12 rezistentnih izolata na 20 ispitanih.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 58 stranica, 0 grafičkih prikaza, 1 tablicu i 75 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku

Ključne riječi: *Aspergillus Versicolores*, morfološki ključ, antimikotici, disk-difuzijska metoda

Mentor: **Dr. sc. Maja Šegvić Klarić**, redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Maja Šegvić Klarić**, redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.  
**Dr. sc. Daniela Jakšić**, docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.  
**Dr. sc. Dubravka Vitali Čepo**, izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: studeni 2023.

## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Department of Microbiology  
Ul. kneza Domagoja 2, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

### RESISTANCE OF SPECIES *ASPERGILLUS* SERIES *VERSICOLORS* TO ANTIMYCOTICS

Agneza Rukavina

#### SUMMARY

Species of the genus *Aspergillus*, which often appear as causative agents of opportunistic mycoses (e.g., *A. flavus* and *A. fumigatus*), show a high degree of resistance to antifungals. Given that species of the *Versicolores* series are dominant indoor aspergilli, especially in humid conditions, the question of their role in the occurrence of opportunistic mycoses and their sensitivity to antimycotics arises, about which there is very little information in previous literature. Therefore, the goals of this research were: 1) to create an "in-house" key for the determination of the species belonging to *Versicolores* series based on the morphology of the colonies in different conditions, which can facilitate the identification process; 2) to test the susceptibility of the isolates present in indoor environment in Croatia to antifungal drugs used in treating systemic mycoses. As a part of the morphological characteristics examination, the colonies were grown for 7 days in the dark and on 6 different media (CYA, CYA20, DG-18, DRBC, MEA and SGA). As a result, a morphological key was developed to identify species from the *Versicolores* series. All tested types of aspergilli from the *Versicolores* series tolerate reduced water activity in the substrate well. A minimum of 7 days of colony growth is required for morphological characterization and identification of species from the *Versicolores* series. The best suited media for differentiation between species and for potential use in phenotypic identification are CYA, CYA20 and DRBC. Antifungal susceptibility test was performed by disc-diffusion method on modified Mueller-Hinton agar with added glucose and methylene blue dye. The obtained results correspond with the existing data on the resistance of species from the genus *Aspergillus*. Resistance of all species to caspofungin was determined and possible mechanisms of resistance were proposed. Resistance to amphotericin B was present in almost all tested species, which could be regionally present. Intrinsic resistance to fluconazole has been confirmed. Susceptibility to other triazole antifungals varied and a trend of resistance to voriconazole and itraconazole was observed. Posaconazole was the most effective with all tested isolates being susceptible, followed by itraconazole with only 5 resistant isolates out of 20 tested. Least effective was voriconazole with 12 resistant isolates out of 20 subjects.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 58 pages, 0 figures, 1 table and 75 references. Original is in Croatian language.

Keywords: *Aspergillus Versicolores*, morphological key, antimycotics, disk-diffusion method

Mentor: **Maja Šegvić Klarić, Ph.D.** Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Reviewers: **Maja Šegvić Klarić, Ph.D.** Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.  
**Daniela Jakšić, Ph.D.** Postdoctoral research and teaching assistant, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.  
**Dubravka Vitali Čepo, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

The thesis was accepted: November 2023.