

Výskyt *Candida dubliniensis* v klinickém materiálu a možnosti její identifikace

Mahelová M., Růžička F.

Mikrobiologický Ústav, Lékařská fakulta, Masarykova univerzita a FN u sv. Anny v Brně

SOUHRN

Cíl práce: Druh *Candida dubliniensis* sdílí celou řadu fenotypových charakteristik s nejčastěji izolovanou kvasinkou z klinického materiálu, kterou je *Candida albicans*. To značně komplikuje jeho správnou identifikaci a záchyt v klinickém materiálu. Nedostatek informací o výskytu *C. dubliniensis* v České republice byl motivací ke zjištění jejího zastoupení ve vzorcích vyšetřených v Mikrobiologickém ústavu LF MU a FN u sv. Anny v Brně. Součástí práce je také posouzení spolehlivosti použitých kultivačních metod.

Materiál a metodika: Celkem bylo vyšetřeno 2260 izolátů kvasinek určených původně jako *C. albicans*. Pro odlišení *C. dubliniensis* a *C. albicans* byly použity čtyři kultivační metody – hodnocení barvy kolonií na médiu CHROMagar Candida, kultivace na médiu s 6,5% NaCl, růst při 42 °C a charakter kolonií na Staibově agaru. K verifikaci výsledků byla použita jednak latexová aglutinace pomocí soupravy Bichro-Dubli Fumouze, jednak druhově specifická polymerázová řetězová reakce (PCR).

Výsledky: Z testovaného souboru bylo pomocí fenotypových metod, latexové aglutinace a PCR identifikováno 50 kmenů *C. dubliniensis*. To odpovídá 2,2% z celkového počtu izolátů.

Většina izolátů *C. dubliniensis* pocházela z dýchacích cest (31), zbytek byl získán z moči (3), stolice (4), z cévky (1) a jeden kmen byl zachycen z krve. S výjimkou hodnocení barvy kolonií na CHROMagaru Candida, u kterého byla specifická pouhých 85,5%, vykazovaly všechny ostatní kultivační metody vysoké procento citlivosti a specifity.

Závěr: Byl potvrzen výskyt *C. dubliniensis* mezi izoláty *C. albicans* v různých klinických materiálech, nejčastěji pocházely tyto kmeny z horních cest dýchacích. Rozlišení *C. dubliniensis* od *C. albicans* na základě barvy kolonií na chromogenním médiu CHROMagar Candida lze doporučit pouze jako screeningový test pro odlišení od ostatních druhů rodu *Candida*. Zbylé metody poskytují vysoké procento spolehlivosti. Konečná identifikace by měla raději vždy spočívat na použití kombinací těchto metod, případně lze výsledek verifikovat pomocí druhově specifické PCR nebo latexové aglutinace.

KLÍČOVÁ SLOVA

***Candida dubliniensis* – fenotypové metody – identifikace – klinický materiál**

ABSTRACT

Mahelová M., Růžička F.: *Candida dubliniensis* in clinical specimens and possibilities for identification

Study objective: The species *Candida dubliniensis* shares a wide range of phenotypic characteristics with *Candida albicans*, the most common yeast species isolated from clinical specimens. This is a considerable complication for the detection and identification of *Candida dubliniensis* from clinical specimens. The lack of data on the incidence of *C. dubliniensis* in the Czech Republic was the motivation behind the efforts to detect this pathogen in specimens analyzed at the Institute for Microbiology, Faculty of Medicine Masaryk University and St. Anne's Faculty Hospital in Brno. Another aim was to test the reliability of the culture methods used.

Material and methods: Altogether 2260 yeast isolates initially identified as *C. albicans* were analysed. To differentiate *C. dubliniensis* from *C. albicans*, four phenotypic methods were used: colour-based differentiation on CHROMagar *Candida medium*, culture on medium with 6.5% of NaCl, growth at 42 °C, and colony characteristics on Staib agar. To verify the results, the Bichro-Dubli Fumouze latex agglutination test and species-specific polymerase chain reactions (PCR) were used.

Results: Using phenotypic methods, latex agglutination, and PCR, 50 (2.2%) strains from the study set were assigned to *C. dubliniensis*. Most (31) *C. dubliniensis* isolates were recovered from the respiratory tract and the remaining others were three urine isolates, four stool isolates, one central venous catheter isolate, and one blood isolate. With the exception of colour-based differentiation on CHROMagar *Candida medium* showing a specificity of 85.5%, all the culture methods used have a high sensitivity and a high specificity.

Conclusion: Identification of *C. dubliniensis* as *C. albicans* was confirmed in various clinical specimens, most often from the upper respiratory tract. The colour-based differentiation of *C. dubliniensis* from *C. albicans* on chromogenic CHROMagar *Candida medium* can only be recommended as a screening test for the differentiation of *C. dubliniensis* from other species of the genus *Candida*. The remaining three methods are highly reliable. The final identification should be based on a combination of these methods, with the species-specific PCR or latex agglutination test used for verification.

KEYWORDS

***Candida dubliniensis* – phenotypic methods – identification – clinical specimens**

Epidemiol. Mikrobiol. Imunol., 63, 2014, č. 2, s. 125-129

SOUHRNNÁ SDĚLENÍ • PŮVODNÍ PRÁCE • KAZUISTIKY

ÚVOD

Infekce způsobené kvasinkami rodu *Candida* představují závažný medicínský problém. Ačkoliv nejčastěji izolovaným druhem z klinického materiálu zůstává stále *Candida albicans*, v posledních letech nabývají více na významu také tzv. druhy non-*albicans*. Jedním z nich je také *Candida dubliniensis*. Tato kvasinka, která je fenotypově i genotypově velmi podobná druhu *Candida albicans*, byla poprvé popsána jako samostatný druh až v roce 1995 Sullivanem et al. na University of Dublin. Šlo o soubor izolátů z orofaryngeální oblasti převážně HIV pozitivních osob [1]. Sekvenováním genomu *C. dubliniensis* a jeho porovnání s genomem *C. albicans* byla zjištěna značná genetická podobnost obou druhů. Konkrétně 96,3% genů těchto dvou druhů je z více než 80% totožných a 98% genů má blízký fylogenetický vztah [2].

Mnohé práce dokazují, že se jedná o celosvětově rozšířený druh s různou prevalencí v klinickém materiálu v závislosti na epidemiologickém profilu vyšetřených pacientů. Nejčastěji je *C. dubliniensis* prokazována v dýchacích cestách u HIV pozitivních, méně často i u HIV negativních či u relativně zdravých osob [3].

Vedle záhytu z dýchacích cest byla *C. dubliniensis* izolována také z dalších klinických materiálů a podobně jako u *C. albicans* byl prokázán její podíl na vzniku povrchových i orgánových či systémových mykóz [4].

Zajímavá je izolace *C. dubliniensis* z vnějšího prostředí. Konkrétně izolace tohoto druhu z povrchu klíšťat *Ixodes uriae* získaných z útesů pokrytých výkaly mořských ptáků (*Alkoun úzkozobý - Uria Arge*) [5].

Pro zjištění přesného klinického významu a výskytu kvasinky *C. dubliniensis* v klinickém materiálu je zapotřebí její správná a rychlá identifikace. Ta je komplikována podobností většiny fenotypových vlastností *C. dubliniensis* s *C. albicans*, a proto bývá *C. dubliniensis* v rutinních mikrobiologických laboratořích často chybně identifikována [6]. Oba druhy jsou totiž jako jediné z rodu *Candida* schopny vytvářet chlamydospóry a zárodečné klíčky, čehož bylo dříve využíváno právě pro identifikaci druhu *C. albicans*. Také na běžných médiích používaných ke kultivaci kvasinek, a to včetně chromogenních médií, je obtížné tyto dva druhy odlišit [1].

Řádná identifikace umožňuje správné zhodnocení klinického významu *C. dubliniensis* a je důležitá pro nasazení adekvátní léčby. U *C. dubliniensis* totiž dochází k častějšímu a snazšímu rozvoji rezistence k azolovým antimykotikům, především k flukonazolu. Rezistence k flukonazolu poprvé popsanou v roce 1997 [7] později potvrdily i další práce [8, 9]. U původně citlivých klinických izolátů byla prokázána schopnost rychlého rozvoje rezistence po působení flukonazolem *in vitro*. Také po léčbě pacientů flukonazolem byl zaznamenán nárůst rezistentních kmenů [7].

Během posledních let proto byla vyvinuta celá řada kultivačních metod, které umožňují více či méně spolehlivě rozlišení těchto kvasinek. Patří mezi ně například kultivace při 42 °C, případně 45 °C [10], uspořádání a produkce chlamydospór [11], rozdílný charakter kolonií po kultivaci na médiích s různými rostlinnými extrakty - Staibův agar [11], agar se slunečnicovými [12] nebo hořčičnými semeny [13] či s přidavkem tabáku [14]. Růst *C. dubliniensis* na médiích inhibuje vyšší koncentrace solí [15] nebo také neschopnost kmenů asimilovat xylozu [16]. Vzhledem k výskytu falešně pozitivních i falešně negativních výsledků u výše uvedených metod se ke konfirmaci identifikace využívají spolehlivější molekulárně biologické metody či průkaz specifického povrchového antigenu, např. latexovou aglutinací [17].

Mezi molekulárně biologické metody, které mohou být použity k odlišení *C. albicans* a *C. dubliniensis* patří RFLP (polymorfismus délky restričních fragmentů), RAPD (náhodná ampli-

fikace polymorfní DNA) či PFGE (pulzní gelová elektroforéza) [3]. Většina těchto metod je časově náročná, a tudíž nevhodná pro rutinní analýzu většího počtu kmenů. Nejvhodnější metodou z hlediska času i finanční náročnosti se zdá být polymérazová řetězová reakce (PCR). Bylo popsáno několik genů, které se u těchto dvou druhů liší a které lze amplifikovat pomocí PCR. Jedním z nich je například *phr1* u *C. albicans* a jeho homolog *Cdphr1* u *C. dubliniensis* [18], *hwp1* u *C. albicans* a jeho homolog u *C. dubliniensis* [19] či rozdíly v intronu genu *act1* [20].

Mezi další možnosti identifikace s dobrou odlišovací schopností, které byly popsány v posledních letech, patří hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF MS (Matrix assisted laser desorption-ionization - time of flight mass spectrometry) [21], případně také izoelektrická fokuse využívající rozdíly v izoelektrických bodech mezi těmito druhy [22]. Jedná se však o techniky, které jsou časově či technicky náročné a nejsou dostupné všem laboratořím.

Cílem této práce je hodnocení lokálního výskytu *C. dubliniensis* a popis jejího zastoupení v různých typech klinického materiálu. Dále byla v rámci této práce hodnocena spolehlivost čtyř kultivačních metod a navrženo vhodné diagnostické schéma pro rutinní použití v klinicko-mikrobiologické laboratoři.

MATERIÁL A METODY

Do testovaného souboru bylo zařazeno 2260 izolátů, které byly rutinně určeny jako *C. albicans* na základě tvorby zelených kolonií na CHROMagaru *Candida* (CHROMagar, Francie). Tyto kmeny byly v letech 2010 a 2011 izolovány z různých klinických materiálů v Mikrobiologickém ústavu LF MU a FN v Brně. Dále byly použity *C. dubliniensis* CBS 7987 (Centraalbureau voor Schimmelcultures) a CCY 29-177-1 (Culture Collection of Yeasts), a *C. albicans* CCM 8261 a CCM 8320 (Czech Collection of Microorganisms, Česká sbírka mikroorganismů) jako kontrolní kmeny.

Pro zjištění přítomnosti *C. dubliniensis* byly všechny izoláty testovány pomocí čtyř fenotypových kultivačních metod:

- Inhibice růstu při 42 °C [10] byla ověřena 48hodinovou kultivační kmenů na Sabouraudově agaru (Merck KGaA, Německo) při této teplotě. Kmeny, které nevykazovaly růst za daných podmínek, byly předběžně určeny jako *C. dubliniensis*. Ty, které rostly, byly určeny jako *C. albicans*.
- Byl hodnocen charakter růstu na Staibově agaru obsahující extrakt z rozdrčených semen rostliny *Guizotia abyssinica* [11]. Po 48hodinové inkubaci při 37 °C rostou na tomto médiu kmeny *C. albicans* ve formě hladkých kolonií, zatímco kmeny *C. dubliniensis* tvoří výrazné pseudomycelium a jejich kolonie jsou tedy drsné s paprskovitými okraji (obr. 1).
- K testování inhibice růstu zvýšenou koncentrací solí byl použit Sabouraudův agar (Merck KGaA, Německo) s přidavkem 6,5% NaCl [23]. Deset mikrolitrů suspenze testovaného izolátu ve fyziologickém roztoku (0,2 McF) bylo napipetováno na dané médium. Inhibice růstu byla hodnocena po sedmidenní inkubaci při 37 °C.
- Barva kolonií byla hodnocena po 48hodinové kultivaci kmenů při 37 °C na médiu CHROMagar *Candida* (CHROMagar, Francie). Izoláty s tmavě zelenou barvou kolonií byly považovány za *C. dubliniensis*, izoláty se světle zelenou barvou byly předběžně určeny jako *C. albicans* [24]. Dále byl k identifikaci použit také test latexové aglutinace pomocí komerční soupravy Bichro-Dubli Fumouze (Fumouze Diagnostics, France). Izoláty *C. dubliniensis* vytváří po rozmíchání v reakční směsi viditelné fialové shluky [17].

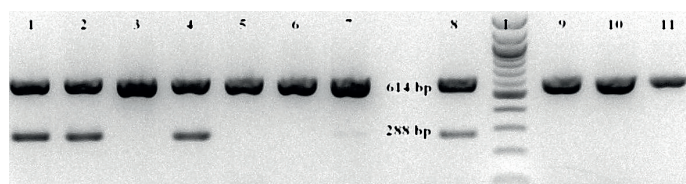
Pro konfirmaci výsledků byla použita druhově specifická polymerázová řetězová reakce [20]. Z 48hodinové kultury

SOUHRNNÁ SDĚLENÍ • PŮVODNÍ PRÁCE • KAZUISTIKY



Obr. 1. Vzhled kolonií *C. dubliniensis* na Staibově agaru
Fig 1. The appearance of *C. dubliniensis* colonies on Staib medium

testované kvasinky na Sabouraudově agaru byly 1–2 kolonie resuspendovány v 75 μ l sterilní vody a zahřáty na 95 $^{\circ}$ C (10 min.). Po centrifugování (14 000 g/7 min.) bylo odebráno 50 μ l supernatantu obsahující DNA. Pro PCR byly použity dva páry primerů – univerzální a druhově specifické [20]. Reakční směs o celkovém objemu 25 μ l obsahovala 12,5 μ l master mix (PPP Master Mix, Top-Bio, s.r.o.), 100 mM každého primeru, a 1 μ l templátové DNA. Podmínky reakce byly následující: úvodní denaturace (95 $^{\circ}$ C/5 min.), 30 cyklů denaturace (95 $^{\circ}$ C/1 min.), připojení primerů (59 $^{\circ}$ C/30 s) a prodlužování řetězce (72 $^{\circ}$ C/30 s), konečná prodlužovací fáze při 72 $^{\circ}$ C po dobu 10 min. (Termocycler PTC-200, MJ Research, USA). Produkty reakce byly detekovány agarózovou gelovou elektroforézou a vizualizovány UV transiluminátorem (UVT-20 M, Herolab GmbH Laborgeräte, Německo). U *C. albicans* byla výsledkem PCR přítomnost jednoho pruhu (614 bp), zatímco izoláty *C. dubliniensis* tvořily dva produkty (614 bp a 288 bp) (obr. 2).



Obr. 2. Výsledek gelové elektroforézy produktů PCR
Fig 2. The result of gel electrophoresis of PCR products

Legenda:
1, 2, 4, 7, 8 *C. dubliniensis*
3, 5, 6, 9, 10, 11 *C. albicans*
L – hmotnostní marker (100–000 bp)

Legend:
1, 2, 4, 7, 8 *C. dubliniensis*
3, 5, 6, 9, 10, 11 *C. albicans*
L – mass marker

VÝSLEDKY

Z testovaných 2260 izolátů určených primárně jako *C. albicans* bylo 50 (2,2%) reidentifikováno jako druh *C. dubliniensis*. Čtyři z těchto kmenů rostly ve směsi s *C. albicans*.

Nejvíce izolátů pocházelo z dutiny ústní a z horních cest dýchacích, ze kterých byla více než polovina z celkového počtu (31). Z dolních cest dýchacích bylo zachyceno 10 izolátů. Ostatní kmeny pocházely ze stolice (4), moče (3), z povrchu centrálního žilního katétru (1) a z hemokultury (1).

Izoláty *C. dubliniensis* pocházely od 42 pacientů. Od 6 pacientů byly získány dva (4 pacienti) nebo tři izoláty (2 pacienti), které pocházely z různých klinických materiálů nebo byly izolovány v různém časovém horizontu. U dvou pacientů se jednalo o izoláty z totožných klinických materiálů, ale s odstupem minimálně tří měsíců. Jeden z pacientů měl kolonizované horní i dolní dýchací cesty a moč, další moč a hemokulturu a u jiného byl získán izolát z dýchacích cest a centrálního žilního katétru.

Výsledky spolehlivosti použitých metod zachycuje tabulka 1. Ta ukazuje, že nejvyšší stupeň spolehlivosti poskytuje hodnocení vzhledu kolonií *C. dubliniensis* na Staibově agaru s 96% citlivostí a 99% specifivitou. Hodnocení inhibice růstu při 42 $^{\circ}$ C a růst na médiu s 6,5% NaCl dávají velmi podobné výsledky. U těchto tří metod byly zachyceny falešně negativní výsledky (2 pro Staibův agar, 4 pro médium s NaCl i inhibici růstu při 42 $^{\circ}$ C), a falešně pozitivní výsledky u inhibice růstu při 42 $^{\circ}$ C (n = 40) a tvorby drsných kolonií na Staibově agaru (n = 18). U CHROMagaru Candida můžeme pozorovat 96% citlivost, ale nižší hodnotu specifity (85,5%), což je důsledek vysokého počtu falešně pozitivních výsledků (n = 320).

Tabulka 1. Srovnání použitých metod

Table 1. Comparison of used methods

| Kultivační metoda | citlivost | specifita |
|----------------------------|-----------|-----------|
| PCR | 100 | 100 |
| LA | 100 | 100 |
| Růst na médiu s 6,5 % NaCl | 92 | 100 |
| Růst při 42 $^{\circ}$ C | 91,5 | 98,2 |
| Růst na Staibově agaru | 96 | 99,2 |
| CHROMagar Candida | 96 | 85,5 |

DISKUSE

V celé řadě epidemiologických studií byla prokázána prevalence u HIV pozitivních v širokém rozmezí 1,2–48%. U HIV negativních osob je výskyt *C. dubliniensis* obvykle nižší, 1,6–9% [8, 25, 26]. Na druhou stranu Bilgnaut et al. [27] překvapivě zjistili u zdravé bělošské populace v Jihoafrické republice vyšší záchyt této kvasinky než u HIV pozitivních osob, naopak u černošské populace byl vyšší záchyt u HIV pozitivních. Relativně vysoká prevalence je zaznamenávána také u osob s cystickou fibrózou [28], diabetes mellitus [29] či s onkologickými diagnózami [30, 31].

U testovaných izolátů převládá výskyt kmenů *C. dubliniensis* v dutině ústní a horních cestách dýchacích (n = 31). Vyšší výskyt byl zaznamenán také u kmenů získaných z dolních cest dýchacích a plic (n = 10). Nejčastěji pochází kmeny *C. dubliniensis* z ústní dutiny a faryngu, jakožto původci slizničních kandidóz [7, 32].

Přítomnost tohoto druhu byla prokázána i z dalších klinických materiálů, např. ze stolice, moče, kůže, hemokultury či centrálního nervového systému. Výskyt v těchto materiálech je daleko nižší než v dýchacích cestách [31].

SOUHRNNÁ SDĚLENÍ • PŮVODNÍ PRÁCE • KAZUISTIKY

V testovaném souboru byl zachycen relativně vysoký počet kmenů *C. dubliniensis* také z jiných klinických materiálů než z dýchacích cest, jednalo se o moč (n = 3) a stolici (n = 4).

Izolace *C. dubliniensis* z moče byla popsána také v jiných publikacích [31]. Mimoto byla *C. dubliniensis* již dříve prokázána také jako kolonizátor močových katétrů, na kterých je dokonce schopna vytvářet biofilm [33]. Rímeck et al. [34] se zaměřili na výskyt *C. dubliniensis* ve vzorcích stolice německé populace se zjištěním, že 2,7% kmenů určených původně jako *C. albicans* náleželo ve skutečnosti ke druhu *C. dubliniensis*. Procentuální zastoupení *C. dubliniensis* ze stolice v našem souboru je 2,9% (3 izoláty *C. dubliniensis* ze 104 izolátů *C. albicans*).

Izolace dvou kmenů z krevního řečiště (katétru a hemokultury) od dvou různých pacientů dokazuje možnost účasti těchto kvasinek také na rozvoji závažných invazivních onemocnění. V literatuře bylo popsáno několik případů katérových sepsi způsobených *C. dubliniensis* a izolace této kvasinky z hemokultur [31, 35]. Výskyt *C. dubliniensis* byl zaznamenán také u dalších invazivních infekcí, např. u případů meningitidy [36], endokarditidy [37] či osteomyelitidy [38].

Tři z pacientů, od kterých pocházely izoláty *C. dubliniensis*, byli nejspíše postupně kolonizováni *C. dubliniensis*, protože izoláty byly získány z různých klinických materiálů. U jednoho z nich se jednalo o izoláty z krku, sputa a moče během jednoho měsíce. U dalšího pacienta byla prokázána kolonizace krku a za 7 dní byla kvasinka *C. dubliniensis* izolována také z centrálního žilního katétru. U třetího pacienta byla tato kvasinka získána z moče a hemokultury ve stejný den odběru. Tyto údaje jen dokazují, že kvasinka *C. dubliniensis* může být původcem také invazivních život ohrožujících mykóz i v našich podmínkách, a proto má správné dourčení tohoto druhu v laboratorních lékařské mikrobiologie určitě význam. Kultivace na médiu se zvýšenou koncentrací NaCl poskytovala výsledky s 92% citlivostí a 100% specificitou, což bylo dáno čtyřmi falešně negativními a nulovým počtem falešně pozitivních výsledků. Falešně pozitivní výsledky byly důsledkem smíšených kultur *C. dubliniensis* s *C. albicans*. Jiné publikace [15, 23] prokázaly 100% citlivost i specificitu, což bylo však nejspíše dáno tím, že autoři testovali již čisté kultury kmenů *C. dubliniensis*. Jednou z dalších nevýhod této metody může být poněkud složitější příprava vzorků a také delší doba kultivace, s čímž souvisí i prodloužená doba identifikace. Tento aspekt společně s nemožností diferenciaci *C. albicans* a *C. dubliniensis* na tomto médiu je příčinou nepříliš praktického použití této metody v rutinní diagnostice.

Růst na Staibově agaru je jednoduchá, nepřilíš nákladná metoda, která by mohla být použita pro snadný a rychlý screening. Její mírnou nevýhodou je pouze nízký počet falešně pozitivních a falešně negativních výsledků mírně snižující citlivost (96%) a specificitu metody (99,2%). Také jiné publikace potvrzují sníženou spolehlivost metody s určitým procentem falešně pozitivních i falešně negativních výsledků [39]. Výhodou je však oproti ostatním dvěma fenotypovým metodám možnost dobrého rozlišení *C. albicans* a *C. dubliniensis* na základě rozdílného vzhledu kolonií.

U inhibice růstu při 42 °C jsme pozorovali falešně negativní (n = 4) a především falešně pozitivní výsledky (n = 40). Falešně negativní výsledky byly stejně jako u kultivace na médiu s NaCl způsobeny přítomností smíšených kultur. Naše výsledky se shodují s těmi od jiných autorů, kteří také pozorovali výsledky s vyšší specificitou a nižší citlivostí [40]. Mnohé práce se mimo jiné zabývaly tím, zda je spolehlivější použití teploty 42 °C nebo 45 °C, jejich výsledky se od sebe poněkud liší. Pinjon et al. [41] sice došli k závěru, že kultivace při 45 °C je pro odlišení *C. dubliniensis* a *C. albicans* přesnější, avšak jiné publikace naopak poukazují na vysoké procento falešně pozitivních výsledků při použití této teploty [42]. Jiní [40]

poukazují na nižší procento falešně pozitivních výsledků při použití 42 °C.

Díky vysokému počtu falešně pozitivních výsledků (n = 320) u kultivace na médiu CHROMagar Candida lze tuto metodu doporučit pouze pro odlišení zeleně pigmentujících kvasinek od ostatních druhů rodu *Candida*. I když citlivost této metody vyšla díky nulovému počtu falešně negativních výsledků 100%, specificita pro tuto metodu je v porovnání s ostatními kultivačními metodami mnohem nižší (85,5%). Také jiní autoři poukazují na určité procento falešně pozitivních výsledků [20]. Na rozdíl od některých publikací [10] se však u našich izolátů neobjevil ani jeden falešně negativní výsledek a všechny kmeny *C. dubliniensis* rostly na médiu CHROMagar Candida s tmavě zelenou pigmentací. Za ztrátu schopnosti izolátů *C. dubliniensis* tvořit tmavě zelené kolonie je s největší pravděpodobností zodpovědné opakované zamrazování a uchovávaní kultur [24]. Všechny naše izoláty byly získány z primokultur, což může být vysvětlením, proč ani jeden z nich netvořil světle zelené kolonie.

ZÁVĚRY

Rutinní dourčování *C. dubliniensis* v klinických laboratořích by mohlo přispět k objasnění skutečného výskytu této kvasinky a ke zjištění její incidence v klinickém materiálu. Ukazuje se, že *C. dubliniensis* může být původcem jak běžných mykóz, tak také závažných invazivních kandidóz. Vzhledem k jejímu vyššímu potenciálu rozvoje rezistence k některým antimykotikům je potřebné její přesné dourčení.

Kombinace více fenotypových metod může dobře posloužit jako levná a dostupná alternativa pro identifikaci *C. dubliniensis* v laboratořích, které nemají možnost provádět molekulárněbiologické metody. Je však potřeba vzít v úvahu také smíšené kultury *C. albicans* a *C. dubliniensis*, což může zkreslit výsledek některých fenotypových metod. Další dobře dostupnou metodou může být samozřejmě latexová aglutinace, jejíž nevýhodou může být vyšší cena.

Poděkování: Tato práce byla podpořena grantem GAČR P205/11/1687 a IGA MZ NS-9678.

Literatura

- Sullivan DJ, Westerneng TJ, Haynes KA, Bennett DE, Coleman DC. *Candida dubliniensis* sp. nov.: phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals. *Mikrobiologie*, 1995;141:1507-1521.
- Jackson AP, Gamble JA, Yeomans T, Moran GP, Saunders D, et al. Comparative genomics of the fungal pathogens *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*. *Genome Res*, 2009;19:2231-2244.
- Loreto ES, Scheid LA, Nogueira CW, Zeni G, et al. *Candida dubliniensis*: epidemiology and phenotypic methods for identification. *Mycopathologia*, 2010;169:431-443.
- Sullivan DJ, Moran GP, Coleman DC. *Candida dubliniensis*: ten years on. *FEMS Microbiol Lett*, 2005;253:9-17.
- Nunn MA, Schaefer SM, Petrou MA, Brown JR. Environmental source of *Candida dubliniensis*. *Emerg Infect Dis*, 2007;13:747-750.
- Pfaller MA, Woosley LN, Messer SA, Jones RN, Castanheira M. Significance of molecular identification and antifungal susceptibility of clinically significant yeasts and moulds in a global antifungal surveillance programme. *Mycopathologia*, 2012;174:259-271.
- Moran GP, Sullivan DJ, Henman MC, McCreary CE, et al. Antifungal drug susceptibilities of oral *Candida dubliniensis* isolates from human immunodeficiency virus (HIV)-infected and non-HIV-infected subjects and generation of stable fluconazole-resistant derivatives in vitro. *Antimicrob Agents Chemother*, 1997;41:617-623.

SOUHRNNÁ SDĚLENÍ • PŮVODNÍ PRÁCE • KAZUISTIKY

8. Fotedar R, Al Hedaithy SS. Prevalence of *Candida dubliniensis* among germ tube-positive yeasts recovered from the respiratory specimens in HIV-negative patients. *Mycoses*, 2004;47:150–155.
9. Scheid LA, Mario DA, Kubiça TF, Santurio JM, Alves SH. In vitro activities of antifungal agents alone and in combination against fluconazole-susceptible and -resistant strains of *Candida dubliniensis*. *Braz J Infect Dis*, 2012;16:78–81.
10. Alvarez MI, Suárez BL, Caicedo LD. Isolation of *Candida dubliniensis* for the first time in Cali, Colombia, and its identification with phenotyping methods. *Mycopathologia*, 2009;167:19–24.
11. Staib P, Morschhäuser J. Chlamydospore formation on Staib agar as a species-specific characteristic of *Candida dubliniensis*. *Mycoses*, 1999;42:521–524.
12. Khan ZU, Ahmad S, Mokaddas E, Chandy R. Simplified sunflower (*Helianthus annuus*) seed agar for differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. *Clin Microbiol Infect*, 2004;10:590–592.
13. Girish Kumar CP, Menon T, Prabu D, Nandhakumar B. Chlamydo sporulation of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* on mustard agar. *Mycoses*, 2007;50:71–73.
14. Khan ZU, Ahmad S, Mokaddas E, Chandy R. Tobacco agar, a new medium for differentiating *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. *J Clin Microbiol*, 2004;42:4796–4798.
15. Chowdhary A, Randhawa HS, Kowshik T, Kathuria S, et al. Application of hypertonic Sabouraud glucose agar for differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2011;69:440–442.
16. Khan Z, Ahmad S, Chandy R, Joseph L. A simple xylose-based agar medium for the differentiation of *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2012;72:285–287.
17. Chryssanthou E, Fernandez V, Petrini B. Performance of commercial latex agglutination tests for the differentiation of *Candida dubliniensis* and *Candida albicans* in routine diagnostics. *APMIS*, 2007;115:1281–1284.
18. Kurzai O, Heinz WJ, Sullivan DJ, Coleman DC et al. Rapid PCR test for discriminating between *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* isolates using primers derived from the pH-regulated PHR1 and PHR2 genes of *C. albicans*. *J Clin Microbiol*, 1999;37:1587–1590.
19. Romeo O, Racco C, Criseo G. Amplification of the hyphal wall protein 1 gene to distinguish *Candida albicans* from *Candida dubliniensis*. *J Clin Microbiol*, 2006;44:2590–2592.
20. Mähnß B, Stehr F, Schäfer W, Neuber K. Comparison of standard phenotypic assays with a PCR method to discriminate *Candida albicans* and *C. dubliniensis*. *Mycoses*, 2005;48:55–61.
21. Hof H, Eigner U, Maier T, Staib P. Differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans* by means of MALDI-TOF mass spectrometry. *Clin Lab*, 2012;58:927–931.
22. Horká M, Růžicka F, Holá V, Slais K. Separation of similar yeast strains by IEF techniques. *Electrophoresis*, 2009;30:2134–2141.
23. Akgül O, Cerikcioğlu, N. Hypertonic sabouraud dextrose agar as a substrate for differentiation of *Candida dubliniensis*. *Mycopathologia*, 2009;167:357–379.
24. Hospenthal DR, Beckius ML, Floyd KL, Horvath LL, Murray CK. Presumptive identification of *Candida species* other than *C. albicans*, *C. krusei*, and *C. tropicalis* with the chromogenic medium CHROMagar *Candida*. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, 2006;5:1.
25. Ge, YP, He, GX, Lin, T, Lu, GX et al. First isolation of *Candida dubliniensis* from oral cavities of dermatological patients in Nanjing, China. *Mycopathologia*, 2011;172:465–471.
26. Marcos-Arias C, Vicente JL, Sahand IH, Eguia A, De-Juan A et al. Isolation of *Candida dubliniensis* in denture stomatitis. *Arch Oral Biol*, 2009;54:127–131.
27. Blignaut E, Pujol C, Joly S, Soll DR. Racial distribution of *Candida dubliniensis* colonization among South Africans. *J Clin Microbiol*, 2003;41:1838–1842.
28. Peltroche-Llacsahuanga H, Döhmen H, Haase G. Recovery of *Candida dubliniensis* from sputum of cystic fibrosis patients. *Mycoses*, 2002;45:15–18.
29. Willis AM, Coulter WA, Sullivan DJ, Coleman DC et al. Isolation of *C. dubliniensis* from insulin-using diabetes mellitus patients. *J Oral Pathol Med*, 2000;29:86–90.
30. Mokaddas E, Khan ZU, Ahmad. Prevalence of *Candida dubliniensis* among cancer patients in Kuwait: a 5-year retrospective study. *Mycoses*, 2011;54:29–34.
31. Meis JF, Ruhnke M, De Pauw BE, Odds FC, et al. *Candida dubliniensis* candidemia in patients with chemotherapy-induced neutropenia and bone marrow transplantation. *Emerg Infect Dis*, 1999;5:150–153.
32. Owotade FJ, Patel M, Ralephenya TR, Vergotine G. Oral *Candida* colonization in HIV-positive women: associated factors and changes following antiretroviral therapy. *J Med Microbiol*, 2013;62:126–132.
33. Růžicka F, Holá V, Mahelová M, Procházková A. Kvasinková kolonizace močových katétrů a význam tvorby biofilmu. *Klin Mikrobiol Infekc Lek*, 2012;18:115–119.
34. Rimek D. Prevalence, phenotypic identification, and antimycotic susceptibility of *Candida dubliniensis* from fecal samples of outpatients in Thuringia/Germany. In The 17th Congress of The International Society for Human and Animal Mycology, Tokyo, 2009:57.
35. Lai Cc, Tsai HY, Chang TC, Hsueh PR. Catheter-related fungemia caused by *Candida dubliniensis*. *J Microbiol Immunol Infect*, 2012;46:306–308.
36. van Hal SJ, Stark D, Harkness J, Marriott D. *Candida dubliniensis* meningitis as delayed sequela of treated *C. dubliniensis* fungemia. *Emerg Infect Dis*, 2008;14:327–329.
37. Carr MJ, Clarke S, O'Connell F, Sullivan DJ, et al. First reported case of endocarditis caused by *Candida dubliniensis*. *J Clin Microbiol*, 2005;43:3023–3026.
38. Wellinghausen N, Moericke A, Bundschuh S, Friedrich W, et al. Multifocal osteomyelitis caused by *Candida dubliniensis*. *J Med Microbiol*, 2009;58:386–390.
39. Pasligh J, Radecke C, Fleischhacker M, Ruhnke M. Comparison of phenotypic methods for the identification of *Candida dubliniensis*. *J Microbiol Immunol Infect*, 2010;43:147–154.
40. Us E, Cengiz SA. Prevalence and phenotypic evaluation of *Candida dubliniensis* in pregnant women with vulvovaginal candidosis in a university hospital in Ankara. *Mycoses*, 2007;50:13–20.
41. Pinjon E, Sullivan D, Salkin I, Shanley D, Coleman D. Simple, inexpensive, reliable method for differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. *J Clin Microbiol*, 1998;36:2093–2095.
42. Gales AC, Pfaller MA, Houston AK, Joly S, Sullivan DJ, et al. Identification of *Candida dubliniensis* based on temperature and utilization of xylose and alpha-methyl-D-glucoside as determined with the API 20C AUX and vitek YBC systems. *J Clin Microbiol*, 1999;37:3804–3808.

Do redakce došlo dne 3. 11. 2013.

Adresa pro korespondenci:

Mgr. Martina Mahelová

Mikrobiologický ústav, LF MU a FN u sv. Anny v Brně
Pekařská 53
656 91 Brno
e-mail: 150878@mail.muni.cz

Doc. MUDr. Filip Růžicka, Ph.D.

Mikrobiologický ústav, LF MU a FN u sv. Anny v Brně
Pekařská 53
656 91 Brno
e-mail: fruzic@fnusa.cz